



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE RESIDUOS ORGÁNICOS Y
AGROINDUSTRIALES

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor en Ciencia y Tecnología Mención Química

Por: Verónica Elizabeth Córdoba

Director de Tesis: Darío Gómez

Co-directora: Estela Santalla

**Lugar de Trabajo: Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Centro de la
Provincia de Buenos Aires (UNCPBA)**

- marzo de 2016 -

“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad.”

—Karl Popper

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a todas aquellas personas que han permitido que finalice este arduo trabajo. A mis directores de tesis, Darío Gómez y Estela Santalla, quienes han aceptado dirigirme y por haber brindado todo su apoyo en cada situación. A Gabriel quien junto con Estela han sido pilares fundamentales para mi crecimiento profesional. Una mención especial para Mónica Fernández, una amiga y compañera de trabajo, con quien he podido charlar, discutir y argumentar cada uno de los resultados y logros obtenidos durante todo esta etapa, más aun porque sin ella todo hubiese tenido el doble de dificultad.

A mi familia, mis papas, mis hermanos, mis cuñados y mis sobrinos, gracias por estar siempre ahí. A mi mamá y a mi papa, especialmente porque cada vez que necesite un consejo, en cualquier situación o etapa de mi vida siempre conte con ustedes.

A Fernando, con quien nuestra relación ha crecido a la par de este doctorado, ha sufrido cada uno de mis cambios de humor, principalmente cuando las cosas no funcionaron y por apoyarme siempre en lo que emprendo.

A mis amigas, Marcela, Romina y Paola, por ser incondicionales, y entender que siempre las tengo presentes y las llevo en el corazón. A Franco, por las tardes de mate y charlas sobre nuestra vida como becarios.

A todas aquellas personas que de una u otra manera participaron de alguna etapa de este proyecto. A quienes nos proporcionaron las materias primas para llevar a cabo la parte experimental, Establecimiento Catanzaro y sus distintos empleados, Araceli Orifici y al personal que nos ayudó con la recolección de los residuos de la cooperativa Eléctrica, a Fernanda Garrido del establecimiento de La Casiana, quienes han abierto las puertas de sus establecimientos sin condicionamientos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIACIONES	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XII
CAPITULO I.....	1
1. Introducción a la bioenergía.....	1
2. Fuentes potenciales de provisión de recursos para el desarrollo de la bioenergía en Argentina...	5
3. Selección de las fuentes de residuos a utilizar	7
3.1. Sector residuos agropecuarios – Producción de carne porcina.....	7
3.2. Sector Agroindustrial - Producción industrial de leche	10
3.3. Sector residuos urbanos – Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos	14
4. La digestión anaeróbica como proceso biotecnológico	17
4.1. La digestión anaeróbica en el mundo.....	18
4.2. La situación Argentina	19
5. Marco legal para el desarrollo de la bioenergía	20
6. Objetivos	21
7. Esquema de las etapas del trabajo.....	24
CAPITULO II.....	26
1. El proceso de Digestión Anaeróbica	27
1.1. Productos del proceso de la digestión anaeróbica	27
2. Etapas de la DA.....	28
2.1. Hidrólisis	29
2.2. Acidogénesis	30
2.3. Acetogénesis.....	31
2.4. Metanogénesis	33
3. Parámetros que influyen sobre la DA.....	35
3.1. Temperatura.....	35
3.2. Sólidos totales	36
3.3. Sólidos volátiles	36
3.4. Alcalinidad y pH	37
3.5. Nutrientes	39
3.6. Compuesto tóxicos e inhibidores de la metanogénesis	40

3. 7.	Materia prima	44
3. 8.	Inóculo	48
4.	Co-digestión	51
5.	Cinética de la producción de metano	52
5. 1.	Fases de crecimiento microbiano en reactores tipo batch	52
5. 2.	Modelado de las curvas de crecimiento bacteriano	55
CAPITULO III		59
1.	Equipos Experimentales	60
1. 1.	Bioreactores batch	60
1. 2.	Sistema de medición de gases	60
2.	Técnicas Analíticas	62
2. 1.	Análisis de Sólidos Totales y Sólidos Volátiles	62
2. 2.	Determinación del pH	63
2. 3.	Determinación de la Alcalinidad Total, Parcial e Intermedia	63
2. 4.	Determinación de la demanda química de oxígeno	64
2. 5.	Determinación de Nitrógeno Amoniacal	65
2. 6.	Determinación de Amoníaco libre	67
2. 7.	Determinación de Nitrógeno Total	67
3.	Cálculos de los resultados	69
3. 1.	Determinación de la producción final de metano (B_0)	69
4.	Método utilizado para realizar las experiencias	71
4. 1.	Sustrato a utilizar	71
4. 2.	Inóculos a utilizar	71
5.	Análisis estadístico de los resultados	73
5. 1.	Modelado de los datos experimentales	73
CAPITULO IV		74
1.	Introducción	75
2.	Objetivos	78
3.	Materiales y Métodos	78
3. 1.	Caracterización de los sustratos e inóculos	78
3. 2.	Diseño experimental	79
4.	Análisis de los resultados	80
4. 1.	Producción de metano y eficiencia del proceso en términos de remoción de materia orgánica	81
4. 2.	Análisis de la cinética de la producción de metano	83
4. 3.	Análisis del proceso en términos de los distintos tipos de alcalinidades	86
4. 4.	Producción acumulada de metano	89

5. Conclusiones.....	91
CAPITULO V	92
1. Introducción	93
2. Objetivos	95
3. Materiales y Métodos	95
3.1. Caracterización de los sustratos e inóculos	95
3.2. Diseño Experimental.....	96
4. Análisis de los resultados	98
4.1. Producción de metano y eficiencia del proceso en términos de remoción de materia orgánica	101
4.2. Producción de biogás y metano	101
4.3. Análisis cinético de la producción de metano	105
4.4. Análisis del proceso en términos de AGV, AP y pH.....	109
4.5. Modelado de la producción de metano	116
5. Conclusiones.....	123
CAPITULO VI	125
1. Introducción	126
2. Objetivos	129
3. Materiales y Métodos	130
3.1. Diseño de experimentos con mezclas (Conceptos Generales)	131
3.2. Caracterización de los sustratos y del inóculo.....	139
3.3. Selección del diseño de mezcla	140
3.4. Diseño experimental y acondicionamiento de los reactores	141
4. Análisis de los resultados	144
4.1. Producción de metano y eficiencia del proceso en términos de remoción de materia orgánica	144
4.2. Estudio cinético: Ajuste de la producción de metano a la Ec de Gompert.....	146
4.3. Estudio cinético: Análisis de los parámetros de Gompertz mediante la metodología de superficie de respuesta.....	148
4.4. Estudio cinético: Optimización	156
5. Conclusiones.....	159
CAPITULO VII	161
BIBLIOGRAFÍA	166
ANEXO	180
1. Anexo Capítulo V	180
1.1. Tabla de ANOVA análisis de la composición del biogas.....	180
1.2. Tablas de ANOVA Análisis de metano y biogás	180

2.	Anexo Capítulo VI	182
2. 1.	ANOVA para la producción de biogás (ml/gr SV).....	182
2. 2.	ANOVA para la producción de Metano (ml/gr SV)	182
2. 3.	Análisis de ANOVA para los parámetros de Gompertz.....	183
2. 4.	ANOVA para la superficie de respuesta.....	184
	TRABAJOS PRESENTADOS.....	185

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1: Composición del biogás de diferentes sustratos (Carrillo, 2003).....	28
Tabla II.2: Productos de fermentación de la Glucosa (Boe, 2006).....	31
Tabla II.3: degradación de ácidos grasos (Boe, 2006).....	32
Tabla II.4: Sustratos utilizados para la producción de acetato por las homoacetogénicas (Khanal, 2008).....	32
Tabla II.5: Conversión de diferentes tipos de sustratos en metano.....	34
Tabla II.6: Residuos orgánicos de diversos orígenes. (Varnero Moreno, 2011).....	45
Tabla IV.1: Caracterización físico-química del sustrato y de los inóculos utilizados.....	79
Tabla IV.2: Diseño Experimental.....	80
Tabla IV.3: Características físico-químicas de los tratamientos.....	81
Tabla IV.4: Resumen del desempeño de los tratamientos.....	83
Tabla V.1: Caracterización físico-química del inóculo y de los sustratos.....	96
Tabla V.2: Diseño experimental.....	97
Tabla V.3: Características físico-químicas de los tratamientos para el PC, FORSU y SL.....	100
Tabla V.4: Resumen del desempeño de los tratamientos.....	102
Tabla V.5: Comparación de los valores de producción de metano obtenidos experimentalmente y los valores reportados.....	104
Tabla V.6: Variación en la concentración de NH_4^+ y NH_3 durante el proceso anaeróbico.....	115
Tabla V.7: Resultado del estudio cinético utilizando el modelo de primer orden (PO) y el modelo de Gompertz (MG).....	117
Tabla VI.1: Características Físico-químicas de los sustratos y del inóculo.....	139
Tabla VI.2: Límites en la concentración de los sustratos para el ensayo de co-digestión.....	140
Tabla VI.3: Concentración de los componentes de acuerdo al diseño de mezcla seleccionado.....	141
Tabla VI.4: Características físico-químicas de las mezclas de sustratos sin inóculo.....	142
Tabla VI.5: Caracterización físico-química de los tratamientos.....	143
Tabla VI.6: Parámetros de la Ecuación de Gompertz.....	148
Tabla VI.7: Resumen estadístico de los modelos aplicados para ajustar los parámetros de la ecuación de Gompertz (P , R_m y λ).....	149
Tabla VI.8: Coeficientes de regresión para los modelos cúbico específico (P , λ) y cuadrático (R_m).....	150
Tabla VI.9: Límites máximos y mínimos utilizados para realizar la optimización de P , R_m y λ	156
Tabla VI.10: Valores de las variables para la composición óptima.....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Porcentaje que representan las fuentes de energía respecto de la totalidad del suministro mundial de la energía primaria en 2008 (492 EJ). Fuente: (Chum et al., 2011) En IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation - Bioenergy.....	2
Figura I.2: Fuentes porcentuales de biomasa primaria para la generación de energía a nivel mundial	2
Figura I.3: Potencial técnico de bioenergía mundial por categoría principal de recurso para el año 2050 .	4
Figura I.4: a: Existencia anual de cabezas de porcinos. b: Contribución de cada región al stock nacional ..	8
Figura I.5: Ubicación de los establecimientos de cría de cerdos.....	9
Figura I.6: Emisiones de GEI en el sector Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura	10
Figura I.7: Producción mundial de SL.....	11
Figura I.8: a. Producción Argentina de leche entre los años 2008-2013. b. Distribución de la producción de leche por provincia.	11
Figura I.9: Emisiones de GEI en el sector Residuos	13
Figura I.10: Emisiones de metano a partir del efluente de la producción de queso	13
Figura I.11: a. Generación de RSU en Argentina para los años 2000-2012. b. Composición promedio de los RSU para el año 2012	14
Figura I.12: Emisiones globales a partir de residuos MtCO ₂ e/ año, las emisiones globales por PBI y las emisiones per cápita están referidos a los valores del año 1970.	15
Figura I.13: Tendencia de las emisiones de CH ₄ para el período 1978-2012	17
Figura I.14: Proceso integral de bio-conversión Anaeróbica	18
Figura I.15: Distribución inicial de las plantas	19
Figura II.1: Etapas en el proceso de digestión anaeróbica de materia orgánica compleja	29
Figura II.2: Velocidad relativa de crecimiento de las bacterias metanogénicas psicrofílicas, mesofílicas y termofílicas.	36
Figura II.3: Composición promedio en SV de 1) estiércol de ganado fresco, 2) estiércol de cerdos de engorde, 3) estiércoles de cerdas, 4) fracción sólida de los estiércoles de cerdo centrifugados, 5) la fracción sólida obtenida de la precipitación química de los estiércoles, 6) fracción líquida tratada previamente con una centrífuga de decantación y 7) el trigo de la paja.	46
Figura II.4: Composición promedio de PC (Moller et al., 2004), FORSU (Nielfa et al., 2015) y SL (Labatut et al., 2011).....	48
Figura II.5: Fases de crecimiento microbiano	53
Figura II.6: Curva de producción de metano esquemática para la descripción de los parámetros de la Ec. de Gompertz	57
Figura III.1: Reactores anaeróbicos de tipo batch y baño termostático	60
Figura III.2: Sistema de medición de gases y equipo LandGEM GA2000	61
Figura III.3: a. Balanza analítica. b. Estufa. c. Mufla.	62
Figura III.4: a. Titulador automático Hanna mod. HI902. b. Gráfico de titulación de la muestra a pH 5,75 y 4,3.....	64
Figura III.5: a. Termoreactor Hanna modelo HI 839800 para la medición de DQO. b. Tubos de DQO	65
Figura III.6: Determinación de NH ₄ ⁺ : a. Equipo de destilación; b. Gráfico obtenido de la titulación del nitrógeno amoniacal con H ₂ SO ₄ mediante el equipo Hanna HI 902.....	66
Figura III.7: Espectrofotómetro multiparamétrico Hanna modelo HI 83214.....	68
Figura IV.1: Producción acumulada de biogás y metano	82
Figura IV.2: Variación de los porcentajes de CH ₄ y CO ₂ a lo largo de la experiencia para cada tratamiento.	84
Figura IV.3: Velocidad de producción de metano (mL/día).	85

<i>Figura IV.4: Evolución de la Alcalinidad y los AGV a lo largo de la experiencia.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura IV.5: Variación de los valores de pH a lo largo de la experiencia</i>	<i>88</i>
<i>Figura IV.6: Relación de Alcalinidad (RA).....</i>	<i>89</i>
<i>Figura IV.7: Producción acumulada de CH₄ para los cuatro tratamientos</i>	<i>90</i>
<i>Figura V.1: a. Producción acumulada de biogás. b. Producción acumulada de metano para los tres sustratos y las tres RSI</i>	<i>101</i>
<i>Figura V.2: Remoción de materia orgánica (g SV) para cada sustratos y cada RSI</i>	<i>104</i>
<i>Figura V.3: Interacción entre el tipo de sustrato y la RSI sobre la producción de biogás y de metano</i>	<i>105</i>
<i>Figura V.4: Evolución de la generación de metano en la DA de los tres sustratos</i>	<i>106</i>
<i>Figura V.5: TDT para los tres sustratos y las tres RSI analizadas.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura V.6: Variación de la concentración de la AP y los AGV para los tres sustratos y para las tres RSI</i>	<i>111</i>
<i>Figura V.7: Variación de pH.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura V.8: RA para cada sustrato y cada RSI.....</i>	<i>114</i>
<i>Figura V.9: Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Primer Orden (PO) y a la Ecuación de Gompertz (MG) para PC.</i>	<i>118</i>
<i>Figura V.10: Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Primer Orden (PO) y a la Ecuación de Gompertz (MG) para FORSU.</i>	<i>118</i>
<i>Figura V.11: Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Primer Orden (PO) y a la Ecuación de Gompertz (MG) para SL.</i>	<i>119</i>
<i>Figura V.12: Ajuste de la Ecuación de Gompertz a los datos experimentales del tratamiento T3 del Capítulo IV.</i>	<i>120</i>
<i>Figura V.13: Velocidad de producción de metano (R_m) y fase de retardo (λ) para las diferentes RSI utilizadas durante la DA de PC.</i>	<i>121</i>
<i>Figura VI.1: Ejes de coordenadas simplex para una mezcla de tres componentes con coordenadas del diseño</i>	<i>131</i>
<i>Figura VI.2: Distribución de los puntos en el simplex para el diseño simplex-lattice {3,3}, donde P (mezclas primarias), T (mezclas ternarias) y C (centroide).....</i>	<i>133</i>
<i>Figura VI.3: Distribución de los puntos en el simplex para el diseño simplex-centroide. P (mezclas primarias), B (mezclas binarias) y C (centroide)</i>	<i>134</i>
<i>Figura VI.4: Ejemplos de regiones irregulares de mezcla para mezclas de tres y cuatro componentes. Las formas irregulares de estas regiones de la mezcla son causados por las restricciones relacionales a los límites inferior y superior distintos de 0 y 1.....</i>	<i>134</i>
<i>Figura VI.5: Ubicación de los puntos experimentales en el simplex</i>	<i>141</i>
<i>Figura VI.6: Producción acumulada de biogás, metano y remoción de SV en los tratamientos T1 a T7 ..</i>	<i>144</i>
<i>Figura VI.7: Remoción de materia orgánica (% SV) y producción de metano en función del contenido de PC en el reactor.....</i>	<i>145</i>
<i>Figura VI.8: RA y pH de los tratamiento al finalizar el proceso anaeróbico</i>	<i>145</i>
<i>Figura VI.9: Ajuste de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales</i>	<i>146</i>
<i>Figura VI.10: Superficie de contorno (izquierda) y superficie de respuesta (derecha) de las variables P, R_m y λ</i>	<i>153</i>
<i>Figura VI.11: Grafica de los residuos para la variable P, R_m y λ.....</i>	<i>155</i>
<i>Figura VI.12: Grafica de deseabilidad para la optimización</i>	<i>157</i>
<i>Figura VI.13: Grafica de contorno superpuesta para los limites de las variables respuesta</i>	<i>158</i>

ABREVIACIONES

AGV: ácidos grasos volátiles

AP: alcalinidad parcial

AT: alcalinidad total

b.h.: base húmeda

CNA: censo nacional agropecuario

DA: digestión anaeróbica

DQO: demanda química de oxígeno

ER: energías renovables

FORSU: fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

GEIS: gases de efecto invernadero

λ : fase de retardo (Ec de Gompertz)

OMM: Organización Meteorológica Mundial

P: producción final de metano (Ec de Gompertz)

PBM: potencial bioquímico de metano

PC: Purín de cerdo

RA: relación de alcalinidad

R_m: velocidad de producción de metano (Ec de Gompertz)

RSI: relación sustrato/inóculo en unidades de SV

RSU: residuos sólidos urbanos

SL: suero de leche

ST: sólidos totales

SV: sólidos volátiles

T: tratamiento

TDT: Tiempo de digestión técnica

VAG: Vigilancia de la Atmósfera Global

R², R² (ajustada) y R² (pronosticado): coeficientes de determinación

PRESS: suma de cuadrados estimados

RESUMEN

Muchos de los residuos que actualmente son producidos en Argentina generan una importante fuente de polución, tanto en el agua, el aire, o suelo como resultado de gestiones inadecuadas. La ciudad de Olavarría tiene una economía principalmente agrícola-ganadera, y algunos de los residuos producidos por estas actividades representan una amenaza ambiental pero también una oportunidad para la generación de bioenergía. La naturaleza de estos residuos por su alto contenido en materia orgánica los hace viables para producir biogás mediante el proceso de digestión anaeróbica (DA). Del relevamiento de las actividades productivas en la región que tienen un alto impacto en el uso de la tierra y sobre el ambiente se consideró el efluente de la cría intensiva de carne porcina, habitualmente denominado purín de cerdo (PC) como uno de los más críticos, tanto por la falta de acciones para su tratamiento y evacuación segura como por el incremento que esta actividad ha tenido en la zona durante los últimos años. Por esta razón, se seleccionó el PC como el sustrato base para el estudio, ya que además presenta ventajas para el proceso como un elevado contenido de agua, y elevada capacidad de amortiguamiento para los cambios bruscos de pH, que a priori lo hacen un sustrato ideal para la DA. El objetivo principal de la tesis es optimizar la producción de metano de este sustrato, mediante la identificación y evaluación de parámetros que influyen sobre el proceso. Posteriormente se procederá a analizar el efecto de la adición de dos residuos, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) y el suero de leche (SL), ambos procedentes de diferentes actividades humanas y productivas de la zona, y que presentan un alto impacto negativo en el ambiente si no son adecuadamente gestionados. La selección de estos últimos se basó principalmente en que son residuos con elevadas concentración de materia orgánica fácilmente degradable y que pueden compensar el exceso de nutrientes del PC, entendiéndose como tal la concentración de nitrógeno amoniacal.

En primer lugar se identificó como uno de los factores que puede ejercer mayor influencia sobre el proceso anaeróbico, al uso de inóculos y su naturaleza. En esta etapa, se procedió a identificar el efecto que ejercen diferentes tipos de inóculo sobre la DA de PC, utilizando como tales rumen, PC digerido y lodos de depuradora. Los resultados experimentales obtenidos mostraron que la utilización de cualquiera de ellos aumentó la producción tanto de biogás como de metano y que el PC digerido y los lodos de depuradora resultaron ser los más eficientes en términos de producción de metano, obteniendo incrementos de hasta 300%. Durante esta etapa se estudió la cinética del proceso evaluando la evolución de algunos parámetros como la concentración de los productos intermedios, en particular los ácidos grasos volátiles (AGV), lo que permitió identificar que bajo las condiciones experimentales estudiadas, la etapa metanogénica resultó limitante de la velocidad de producción de metano lo que se reflejó en la acumulación de dichos ácidos durante los primeros días del proceso.

Algunas observaciones realizadas a lo largo de los diferentes ensayos experimentales desarrollados durante la primera etapa de este estudio llevaron a plantear la hipótesis de que una concentración insuficiente de inóculo podría ser la responsable de tiempos excesivamente largos para alcanzar la máxima producción de metano, aspecto que también podría estar vinculado a una potencial acumulación de AGV. Sobre esta base, se procedió a identificar la influencia de la acción de diferentes concentraciones de inóculo, como factor de importancia en el proceso, definiendo el parámetro denominado relación sustrato/inóculo (RSI). Seleccionando lodos de depuradora como inóculo - demostró buen desempeño en el proceso y además es un residuo de elevada disponibilidad- se analizó su efecto sobre la digestión individual de PC, de FORSU y de SL utilizando tres RSI diferentes 1:1, 3:1 y 6:1. Los resultados indicaron que la DA evoluciona mejor cuanto mayor es la concentración de inóculo en el reactor, obteniendo para la RSI 1:1, 382, 503 y 455 mLCH₄/g SV para PC; FORSU y SL respectivamente. A partir del análisis de la concentración de los AGV, se identificó un cierto aumento en la inestabilidad del proceso a medida que aumenta la RSI, como resultado de la acumulación de AGV, aunque el grado de inestabilidad dependió fuertemente del sustrato utilizado. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de la cinética de la producción de metano, utilizando la ecuación de Primer Orden (PO) y el modelo de Gompertz (MG), dos modelos habitualmente aplicados para analizar el proceso anaeróbico. Estos modelos estiman parámetros cinéticos que son importantes para el control del proceso como son la producción final de metano, la velocidad de producción y el tiempo de retardo (representa el período de adaptación de los microorganismos al nuevo medio). El MG mostró el mejor ajuste de los datos experimentales para todas las RSI estudiadas, encontrando que la velocidad de producción de metano aumenta con el incremento de la concentración de inóculo en el sistema, a la vez que disminuye el tiempo de retardo.

Una vez analizado el tipo y la cantidad de inóculo, se procedió a estudiar el proceso de co-digestión anaeróbica identificando las proporciones de sustratos que optimicen el proceso asegurando un régimen de funcionamiento estable. Se utilizó un análisis estadístico denominado diseño de mezcla de tipo simplex centroide restringido. Partiendo de la consideración de que el PC debe ser el sustrato que se utiliza en mayor proporción y en base al conocimiento acerca del comportamiento de cada uno de los co-sustratos utilizados (SL y FORSU) se establecieron los siguientes límites para estudiar el sistema: 60-80% para PC, y 0-20% para SL y 20-40% para FORSU (expresados en porcentaje en volumen). Los resultados mostraron que dentro de los límites estudiados, la utilización de una mayor concentración de co-sustratos que aporten un elevado contenido de materia orgánica más fácilmente degradables que el PC, favorece tanto una mayor producción de metano como una mayor remoción de materia orgánica. Estos resultados demuestran que el proceso de co-digestión permite atenuar los aspectos negativos de algunos sustratos como es la acidificación que provoca el SL y FORSU, así como la baja producción específica de metano de presenta PC. Los resultados obtenidos de la producción acumulada de metano para cada tratamiento fueron ajustados al MG. Los parámetros cinéticos, esto es la producción final de metano, la velocidad de producción de metano y la fase de retardo, fueron analizados mediante la

metodología de superficie de respuesta, lo que permitió encontrar un modelo para cada uno, los cuales fueron capaces de explicar la variabilidad de los parámetros cinéticos con las distintas concentraciones de sustratos. La optimización del diseño de mezcla permitió encontrar que la concentración 60-20-20 (% PC, SL y FORSU respectivamente) optimiza las tres variables cinéticas, lo que implica que la producción de metano será mayor, más rápida y la fase de retardo será menor. La producción de metano para la concentración optimizada fue de 295 mL CH₄/g SV, 22% superior a la producción de metano obtenida en similares condiciones a partir de la digestión individual del PC (241 mL CH₄/g SV).

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de esta tesis demuestran que es posible obtener una fuente de energía renovable a partir de residuos que actualmente no tienen un uso específico. Debido a que el proceso anaeróbico es de tipo biológico, y que la degradación de la materia orgánica involucra una serie de etapas que llevan a cabo diferentes grupos de microorganismos, resulta necesario estudiar cada sistema en particular dado que la naturaleza del sustrato y su interacción con otros sustratos, así como con el tipo y cantidad de inóculo utilizado pueden afectar la viabilidad del proceso. En este sentido, si la capacidad buffer del medio (capacidad de amortiguamiento de pH) o la concentración de inóculo en el sistema son inadecuadas, el sistema puede presentar acumulación de AGV en el reactor, disminuyendo el pH del medio inhibiendo el proceso metanogénico; si el sistema no es reajustado rápidamente el proceso puede fallar completamente inhibiendo todo tipo de actividad bacteriana en el reactor. De igual manera, cuando se aplica co-digestión es indispensable identificar individualmente cada uno de los sustratos en términos de su aporte al proceso de degradación de la materia orgánica y además identificar las proporciones óptimas en que deben incorporarse al sistema con la finalidad de asegurar un proceso estable y maximizar la producción de metano.

ABSTRACT

Many of the wastes that are currently produced in Argentina are a major source of pollution as a result of improper management. Olavarría city has a mainly farming economy, and some of the waste produced by these activities represents a risk for the environment but also an opportunity for bioenergy generation. The high organic content of these wastes makes them viable to produce biogas through anaerobic digestion process (AD). The intensive breeding of swine was considered as one of the most critical activities, both wastewater are not properly managed and because of the increase that this activity has had in the area during the last years. The effluent from these farms usually referred to swine wastewater (SW), and it was selected as the main substrate for this study because it has some advantages for the AD process as a high water content and high buffering capacity. The main aim of the thesis is to optimize methane production from SW through the identification and evaluation of parameters that influence the process. After that, the effect of the addition of two different wastes such as organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and cheese whey (CW) will be analyzed, these two ones coming from different human and productive activities in the area, and they have a high negative impact on the environment if they are not properly managed. That selection was mainly based on that are wastes with high organic matter concentration easily degradable and also could balance the excess of ammonia nitrogen content from SW.

Firstly, the use of inoculants and their nature was identified as one of the factors that can exert more influence on the anaerobic process. At this stage, the effect of different types of inoculum on AD of SW was evaluated, using rumen, digested SW and sewage sludge. The results showed that the use of either of them increased methane and biogas production on SW, where the most efficient in terms of those parameters were digested SW and sewage sludge which allowed increments up to 300%. During this stage, kinetics process was assessed by analyzing the evolution of the concentration of volatile fatty acids (VFA), showing that under the experimental conditions, the methanogenic stage was the rate-limiting step, reflected in the accumulation of such acids during the early days of the process.

After analyzing the effect of the type and amount of inoculum, the anaerobic co-digestion were performed, the aim was to identify the proportions of substrates that optimize methane production and ensuring a stable operation. A statistical analysis called simplex centroid mixture design was used. Based on the consideration that the SW must be the substrate used in a higher proportion and based on knowledge about the behavior of each one of the co-substrates used (CW and OFMSW) the following limits were set: SW 60-80% and 0-20% for CW and 20-40% for OFMSW (expressed in percent by volume). The results showed that within the range studied, the use of a higher concentration of co-substrates with high organic matter content, promotes an increase in methane production and organic matter removal. These results demonstrate that the co-digestion process may be able to mitigate the negative aspects of the substrates as they are easy acidification and CW and OFMSW and the low

specific methane production of SW. The results of the cumulative production of methane for each treatment were adjusted to GM. The obtained kinetic parameters (final methane production, methane production rate and the lag phase) were analyzed using the response surface methodology, finding a model for each one, which will be able to explain the variability of the parameters with different concentrations of substrates. The mixture design optimization allowed to find that the concentration 60-20-20 (% SW, CW and OFMSW) is able to produce the greatest amount of methane, at the higher speed, with the lower lag phase. Methane production for optimized concentration was 295 mL CH₄/ g VS which was 22% higher than the production of methane obtained under similar conditions from individual digestion of SW (241 mL CH₄ / g VS).

The results show that it is possible to obtain a renewable energy from waste that does not currently have a specific use. Anaerobic treatment is a biological process, because of that it is necessary to study each particular system because the nature of the substrate and its interaction with other substrates as well as the type and amount of inoculum used can affect the viability of the process. In that respect, if the buffer capacity of the medium or inoculum concentration in the system is inadequate, the pH of the system can decrease sharply due to VFA accumulation causing inhibiting of methanogenic microorganisms; if the system is not adjusted quickly the process can fail completely inhibiting all types of bacterial activity in the reactor. Similarly, when applied co-digestion it is essential to identify individually each of the substrates in terms of its contribution to the process, identifying optimal proportions to be incorporated into the reactor in order to ensure stable process and maximize methane production.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción a la bioenergía

Entre los retos a los cuales se enfrenta actualmente la humanidad se puede mencionar no sólo el de dar solución a los problemas de contaminación ambiental, sino también la necesidad de hacer frente a las consecuencias del cambio climático, a la creciente demanda de combustibles fósiles, a la inseguridad energética así como a la continua explotación de las limitadas fuentes de recursos naturales (Budiyono et al., 2009; Khanal, 2008; Marchaim, 1992).

Desde 1850 aproximadamente, ha aumentado en todo el mundo la utilización de combustibles de origen fósil (carbón, petróleo y gas) hasta convertirse en el suministro de energía predominante, situación que ha dado lugar a un rápido aumento de las emisiones de dióxido de carbono (CO_2) y otros gases de efecto invernadero (GEI). Los datos recientemente obtenidos confirman que el consumo de combustibles de origen fósil representan la mayor parte de las emisiones mundiales de GEIs de origen antropogénico. En este sentido, el último análisis reportado por Organización Meteorológica Mundial (OMM, 2015) en el marco del programa de la Vigilancia de la Atmósfera Global (VAG) muestra que los promedios mundiales de las fracciones molares de los principales GEIs, esto es dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) han alcanzaron nuevos valores máximos en 2014 al registrar, respectivamente, $397,7 \pm 0,1$ ppm, $1\,833 \pm 1$ ppb y $327,1 \pm 0,1$ ppb, lo que representa el 143%, el 254% y el 121% de los niveles de la era preindustrial (1750).

Un posible reemplazo a los combustibles fósiles lo representan las energías renovables (ER). La utilización de fuentes de ER traería aparejada la reducción de las emisiones de GEIs mitigando en parte los efectos del cambio climático. La implantación de este tipo de energía ha aumentado rápidamente en los últimos años, donde ha sido fomentada por diversos tipos de políticas gubernamentales, por el abaratamiento de las tecnologías, por las fluctuaciones del precio de los combustibles de fósiles y por el aumento de la demanda de energía, entre otros (Chum et al., 2011). A nivel mundial, se estima que en 2008, las energías renovables representaron un 12,9% de los 492 EJ totales del suministro de energía primaria (Figura I.1), donde la fuente de energía renovable más utilizada fue la biomásica, la cual representó 10,2% de la energía total.

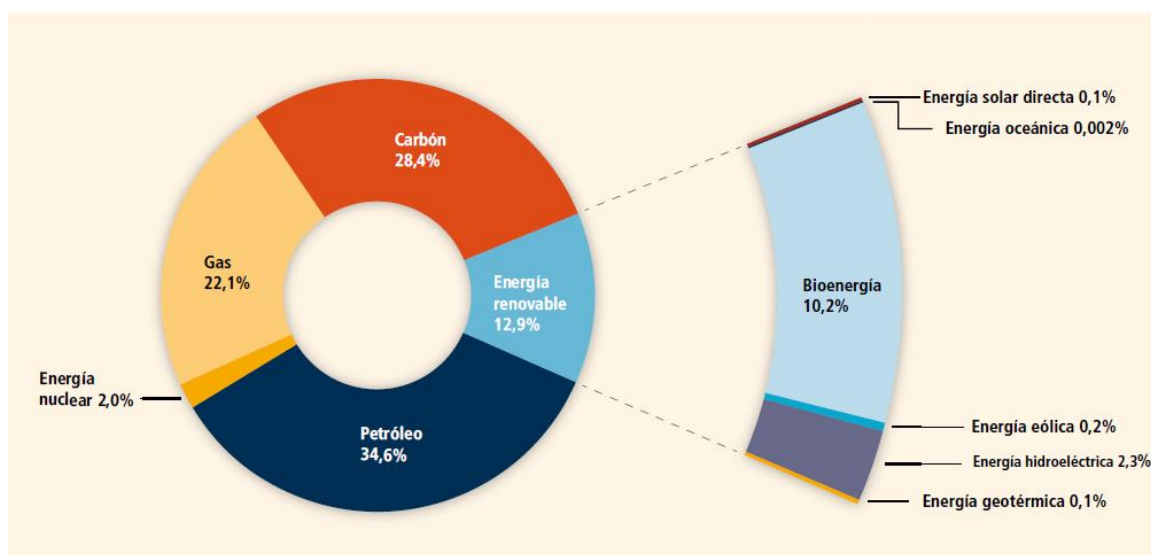


Figura I.1: Porcentaje que representan las fuentes de energía respecto de la totalidad del suministro mundial de la energía primaria en 2008 (492 EJ). Fuente: (Chum et al., 2011) En IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation - Bioenergy

Con el termino bioenergía se hace referencia a un tipo de energía renovable que puede obtenerse a partir del aprovechamiento de diferentes tipos o fuentes de materia orgánica denominadas biomásas (combustibles no fósiles), tal como muestra la Figura I.2.

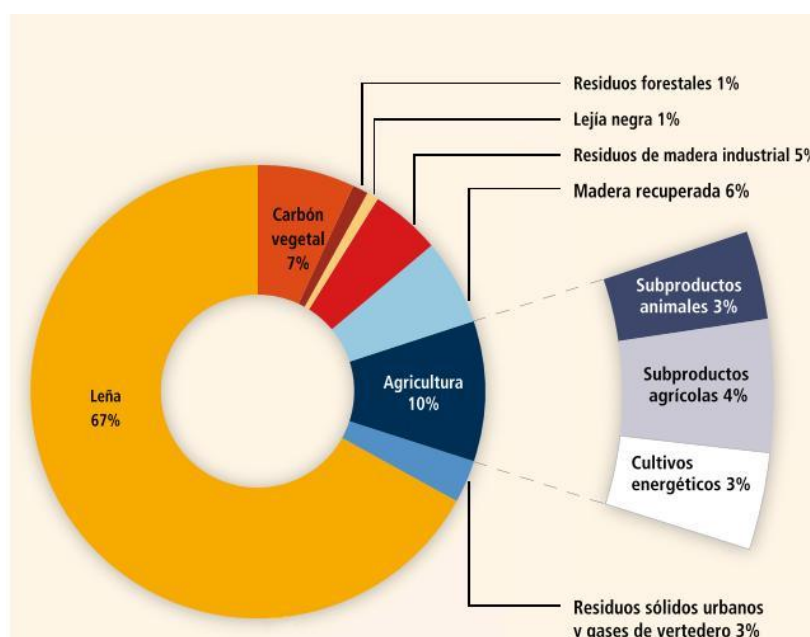


Figura I.2: Fuentes porcentuales de biomasa primaria para la generación de energía a nivel mundial Fuente: Chum et al., (2011) En IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation - Bioenergy

Los usos principales de la biomasa se dividen en dos grandes categorías:

- Biomasa tradicional de baja eficiencia (por ejemplo, madera, paja, estiércol u otros tipos de abonos), utilizada para la cocina, la iluminación y la calefacción de interiores, generalmente en

las poblaciones más pobres de los países en desarrollo. La mayor parte de esa biomasa es quemada, lo cual acarrea impactos negativos graves en la salud y las condiciones de vida.

- tecnologías bioenergéticas modernas altamente eficientes que hacen uso de sólidos, líquidos y gases como vectores de energía secundaria para generar calor, electricidad, cogeneración de calor y electricidad y combustibles para el transporte destinados a los diversos sectores. Entre los biocombustibles líquidos se pueden mencionar al etanol y biodiesel mientras que entre los gaseosos se encuentra el biogás obtenido como producto de la descomposición anaeróbica de residuos agrícolas, residuos sólidos urbanos y efluentes con alta carga de materia orgánica degradable. La contribución más importante se obtiene del material sólido en forma de virutas, gránulos y madera recuperada (Chum et al., 2011).

Según reporta Chum et al., (2011) y Smith et al., (2014), el potencial de suministro de energía a partir de biomasa podría ascender en 2050 a unos 500 EJ, para lo cual se presupone que se aplicarán marcos de políticas que aseguren un adecuado uso de la tierra e importantes mejoras de la gestión agrícola, teniendo en cuenta las limitaciones de agua, la protección de la biodiversidad, la degradación de los suelos y la competencia por los alimentos. De estos 500 EJ, un total de entre 8 y 34% de esta energía podrían ser provista a partir de residuos forestales, agrícolas y orgánicos (incluida la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, el estiércol, los residuos de procesos, etc.). Aunque según se reporta en Smith et al., (2014) existen discrepancias en cuanto a la cantidad de biomasa que podrá estar disponible al año 2050, ya que dependerá en gran medida de factores sociales, políticos y económicos.

La Figura I.3, muestra el potencial de bioenergía técnico a nivel mundial para el año 2050, el cual se compone de diferentes categorías que difieren en términos de su potencial absoluto. La envergadura de los rangos intenta reflejar el grado relativo de acuerdo/desacuerdo que se observa en la literatura, donde el color azul demuestra un gran acuerdo, mientras que el rojo indica un grado de acuerdo pequeño. En este sentido la cantidad de biomasa que podría ser aportada a partir de los residuos orgánicos ronda alrededor de 15EJ en promedio.

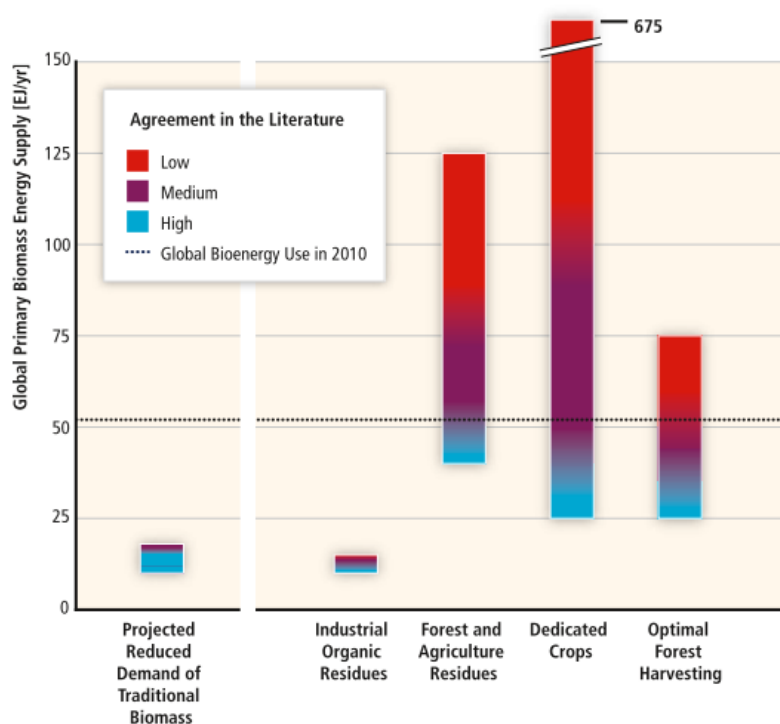


Figura I.3: Potencial técnico de bioenergía mundial por categoría principal de recurso para el año 2050

Fuente: (Smith et al., 2014). En Agriculture, Forestry and Other Land Use (AFOLU). In: Climate Change 2014:

Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change

2. Fuentes potenciales de provisión de recursos para el desarrollo de la bioenergía en Argentina

En lo que respecta a las distintas fuentes para la producción de la bioenergía, según un informe desarrollado por la FAO - Departamento Forestal Dendroenergía, (2009), Argentina posee un gran potencial energético a desarrollar a partir de diferentes fuentes de biomasa, incluyendo, a los biocombustibles (biodiesel y bioetanol), leña, residuos forestales y de la industria forestal, residuos agropecuarios, agrícolas y los derivados de la agroindustria, aunque este informe se centra en el relevamiento de la biomasa de tipo forestal. Otros trabajos han identificado diferentes fuentes de biomasa no convencionales como son los residuos generados a partir de las actividades agropecuarias y agroindustriales para la generación de bioenergía. USEPA, (2009) a través de su iniciativa Metano a los Mercados (M2M), realizó un relevamiento en el sector ganadero y de la agroindustria de Argentina con la finalidad de identificar los sectores que presentan el mayor potencial de mitigación de GEIs, pero que a su vez sirva para identificar fuentes potenciales de bioenergía. Los sectores industriales que identificó este estudio incluyó a los ingenios azucareros y destilerías, el manejo de estiércol proveniente de la cría de porcinos y tambos, efluentes de mataderos (porcinos y ganado vacuno) y el sector de procesamiento de cítricos. Siendo los dos primeros los más importantes en cuanto a su potencial de producción de metano, estimado en 41.000 y 19.500 tCH₄ anuales, donde además se considera que el metano puede servir para la producción de electricidad, lo que implicaría una reducción adicional de 150.000 y 72.500 tCO₂e/año respectivamente en las emisiones por el reemplazo del consumo de combustibles fósiles.

Santalla et al., (2008) realizaron un estudio enfocándose en el sector agropecuario, analizando las actividades de los sectores de producción porcina, avícola y bovina (feedlots y tambos), con la finalidad de realizar un diagnóstico sobre las problemáticas ambientales vinculadas a los mismos, identificando las prácticas comunes en el manejo del estiércol producido, además de las barreras tecnológicas, financieras e institucionales que impiden del desarrollo de la bioenergía en Argentina. Los resultados del mencionado trabajo indicaron que la cría intensiva de ganado (porcino y vacuno) así como el sector tambero si bien representan actividades de la producción primaria de alto impacto sobre factores ambientales como agua y suelo y aire, también constituyen una fuente potencial de mitigación de GEIs y de producción de bioenergía en las regiones de mayor concentración de esta producción. De la evaluación de las emisiones de metano por manejo del estiércol se observó que el sector tambero es el que muestra mayores niveles de emisiones (234.000 tCH₄/1000 animales), siendo las provincias de Córdoba y Santa Fe las que aportan la mayor contribución alcanzando 36,4% y 30,4% respectivamente, lo que refleja la alta concentración tanto de la producción lechera como de elaboración de productos lácteos en dichas provincias. El sector que sigue en magnitud de emisiones corresponde al sector porcino, siendo capaz de generar 45.400 tCH₄ por cada 1000 animales, donde la provincia de Buenos Aires es la principal responsable de dichas emisiones contribuyendo con el 64,5%.

El estudio sobre Evaluación de Necesidades Tecnológicas ante el Cambio Climático desarrollado en 2012 para el sector residuos de Argentina abarcó los subsectores, residuos sólidos urbanos (RSU), residuos agropecuarios y efluentes agroindustriales y domiciliarios, los que presentan un gran potencial tanto como para la mitigación de emisiones de GEIs como para la producción de bioenergía. En dicho trabajo se identificaron las diferentes tecnologías que pueden ser aplicadas en el sector, con el objetivo de determinar la potencialidad de cada tecnología y las barreras para su aplicación. Para los subsectores de residuos agropecuarios e industriales, que incluyen el manejo de estiércol de la cría de porcinos, y los efluentes que se generan en tambos, en la industria citrícola, láctea, azucarera y frigorífica, el estudio propone la tecnología de digestión anaeróbica (DA), cuyo potencial de producción de metano podría alcanzar 330.000 tCH₄ anuales, logrando una mitigación de casi 700.000 tCO₂e por año por la sustitución de combustibles fósiles para la generación de energía térmica o eléctrica. Este estudio también realiza un análisis de las barreras para la implementación de estos proyectos, indicando que los impedimentos al desarrollo de las tecnologías no están asociadas a cuestiones tecnológicas sino a un entorno habilitante inadecuado, que no propicia el desarrollo de tecnologías de aprovechamiento energético de los residuos, principalmente vinculado a aspectos regulatorios e institucionales.

Como puede observarse, la búsqueda de respuestas tecnológicas a la problemática de los residuos urbanos y agroindustriales ha sido constante en Argentina durante los últimos años, y más allá de las barreras encontradas, la DA se ha identificado como una tecnología que contribuirá no sólo a mitigar emisiones de GEIs en estos sectores sino también a disponer de una fuente alternativa de energía.

3. Selección de las fuentes de residuos a utilizar

La selección de las fuentes de residuos a utilizar para el estudio del proceso de DA se realizó en base a considerar las características esenciales que deben tener los residuos a tratar bajo DA como son, un alto contenido de materia orgánica degradable, un elevado porcentaje de agua (para evitar su incorporación y hacer más sustentable el proceso), disponibilidad simultánea en una determinada región geográfica, y que constituyan además un problema ambiental a resolver. En base a estas premisas generales y a partir del conocimiento de la realidad socio-económica de la ciudad de Olavarría, se identificaron como fuentes potenciales para este estudio los efluentes generados durante la cría intensiva de porcinos, el lacto suero generado en la producción de quesos (ricota) y los RSU, fundamentalmente la fracción orgánica. A continuación se describe con más detalle el contexto de los sectores identificados como fuente de residuos para el estudio del proceso de DA.

3.1. Sector residuos agropecuarios – Producción de carne porcina

El sector pecuario ha sufrido grandes transformaciones como consecuencia de los cambios económicos, máxime en países en desarrollo. La producción de ganado, sobre todo de cerdos y aves de corral, es cada vez más intensiva y más concentrada geográficamente (FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2009). La carne de cerdo constituye el 40 % de la oferta de carne mundial, en parte debido a la gran producción y al rápido crecimiento de la misma en China, que genera más de la mitad de la producción mundial (FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2009). La elevada concentración de animales por unidad de área es la responsable de la generación de una mayor cantidad de desechos, que de acuerdo a su origen presentan elevadas concentraciones de materia orgánica y nutrientes inorgánicos. La práctica común en establecimientos de pequeña escala ha comprendido la aplicación directa de los residuos producidos sobre la tierra, generando diversos tipos de problemas ambientales tales como generación de olor, atracción de roedores, insectos y otras plagas, la liberación de agentes patógenos, de gases tales como metano y amoníaco, así como la eliminación de nutrientes (nitrógeno, fósforo) sobre el suelo y aguas superficiales, saturando la capacidad de los sistemas para absorber dichos nutrientes (Chynoweth et al., 1999). Según este mismo autor, la tendencia en la gestión de residuos de origen porcino se encamina hacia la aplicación de tratamientos que minimicen impactos negativos tales como la separación de sólidos, lagunas para la estabilización de la materia orgánica y la digestión anaeróbica, aunque también se consideran algunos sistemas más avanzados como operaciones de tratamiento terciario, tales como lagunas de oxidación, plantas acuáticas, humedales y unidades de desnitrificación entre otras.

En Argentina, los sectores de cría intensiva de ganado bovino, porcino y avícola han experimentado una serie de cambios en los últimos años, evidenciados en una mayor concentración de establecimientos así como en el aumento de las capacidades de producción. En particular, el sector de producción porcina luego de haber sufrido diversos vaivenes, presenta actualmente una etapa de crecimiento, donde según

el Censo Nacional Agropecuario (CNA) del año 2002, las existencias porcinas eran 2.120.089 cabezas, alcanzando para el año 2012 un stock de casi 3,7 millones lo que representa un aumento de 75% en el stock nacional (Figura I.4)

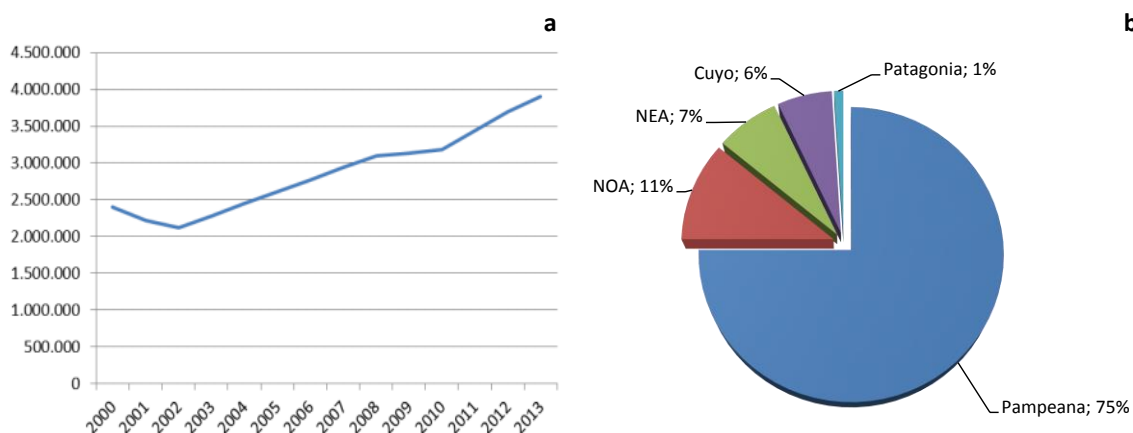


Figura I.4: a: Existencia anual de cabezas de porcinos. b: Contribución de cada región al stock nacional
Fuente: Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012. Volumen 3 – Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura

Según el Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012. Volumen 3 – Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura, el 75% del stock nacional de porcinos se ubica sobre la región pampeana, contribuyendo con el 65% de las madres y el 53% de los establecimientos. En un segundo lugar se ubica la región NOA, que participa con el 11% de las cabezas, el 16% de los establecimientos y el 16% de las madres. En orden decreciente de importancia se sitúa la región NEA (establecimientos 22%, madres 13%) y luego Cuyo (establecimientos 6%, madres 6%).

La ciudad de Olavarría, no ha sido ajena al crecimiento experimentado a nivel país, contando al año 2014 con un total de 67 establecimiento de cría de porcinos, distribuidos según se muestra en la Figura I.5. En color rojo se muestra el Establecimiento Catanzaro, quien suministró los efluentes para llevar a cabo las experiencias de la presente tesis. No se cuenta con información reciente sobre la cantidad de porcinos existentes en la ciudad de Olavarría, pero al año 2006 según el SIG Agropecuario, el stock ascendía a las 6.226 cabezas.

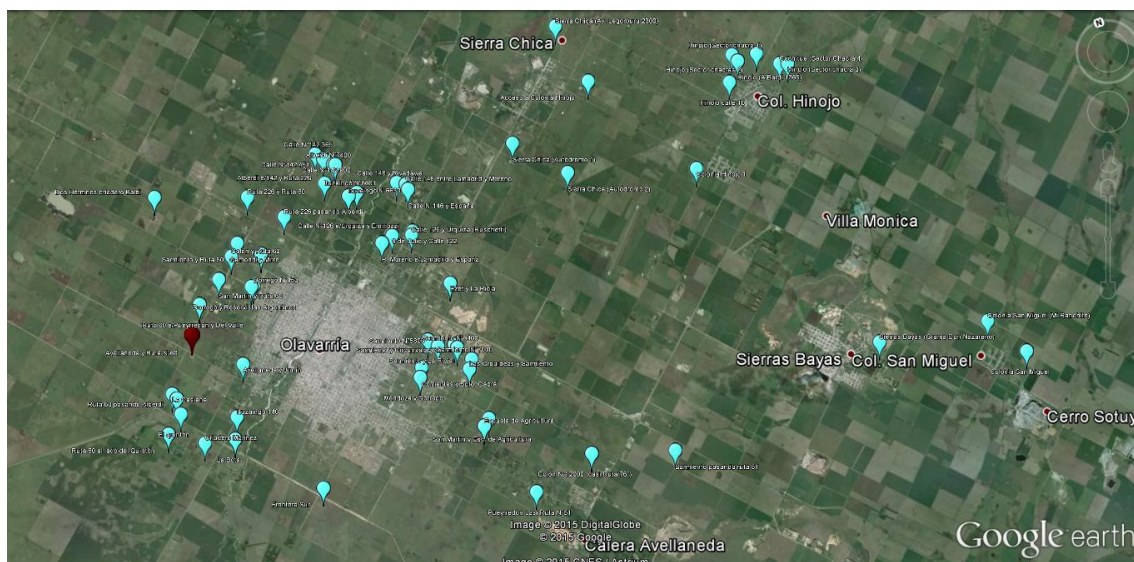


Figura I.5: Ubicación de los establecimientos de cría de cerdos

Fuente: Municipalidad de Olavarría, 2014

Según reporta Santalla et al., (2008), los efluentes de los criaderos eliminan diariamente heces, orina, alimento desperdiciado, agua de bebida y otro tipo de residuos. En promedio se generan 6,17 litros/día/animal, que más el agua de limpieza se obtiene un total de 8 a 18 litros/día/animal de efluente. Sobre esta base, una granja de 1,000 madres con 12,000 animales, sería capaz de generar entre 96 m³ a 216 m³/día de efluentes. Según el mismo trabajo, la práctica común de tratamiento de los efluentes generados en este tipo de establecimiento suele ser el vertido dentro o fuera del sistema con escaso o nulo procedimiento que asegure inocuidad de la descarga. En algunos casos se utilizan lagunas abiertas sin impermeabilización ni la adecuada capacidad para asegurar la remoción de la materia orgánica. Se destaca que en general esta práctica persiste y que la aplicación de cualquier tecnología de tratamiento de efluentes debe vencer barreras vinculadas a la falta de financiamiento, al riesgo de inversión y a la práctica común sustentada en la ausencia de controles sobre el cumplimiento de las normativas vigentes.

3. 1. 1. Emisiones de GEIs en el sector

En el sector ganadería, a nivel global las emisiones de metano por manejo del estiércol ascendieron a 230 millones tCO₂e, lo que representa el 4% de las emisiones antropogénicas de metano, donde el 80% de estas emisiones están relacionadas con el manejo del estiércol de cerdos y vacunos, según reporta USEPA, (2009).

En lo que respecta a las emisiones de GEIs en Argentina, según el Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012, el sector manejo de estiércol representó el 2% de las emisiones totales del sector Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura, tal como se puede observar de la Figura I.6. Mientras que el subsector de cría de porcinos, fue responsable de la emisión de 3,02 Gg CH₄/año, lo cual representa un 7,7% de las emisiones de metano de dicho sector.

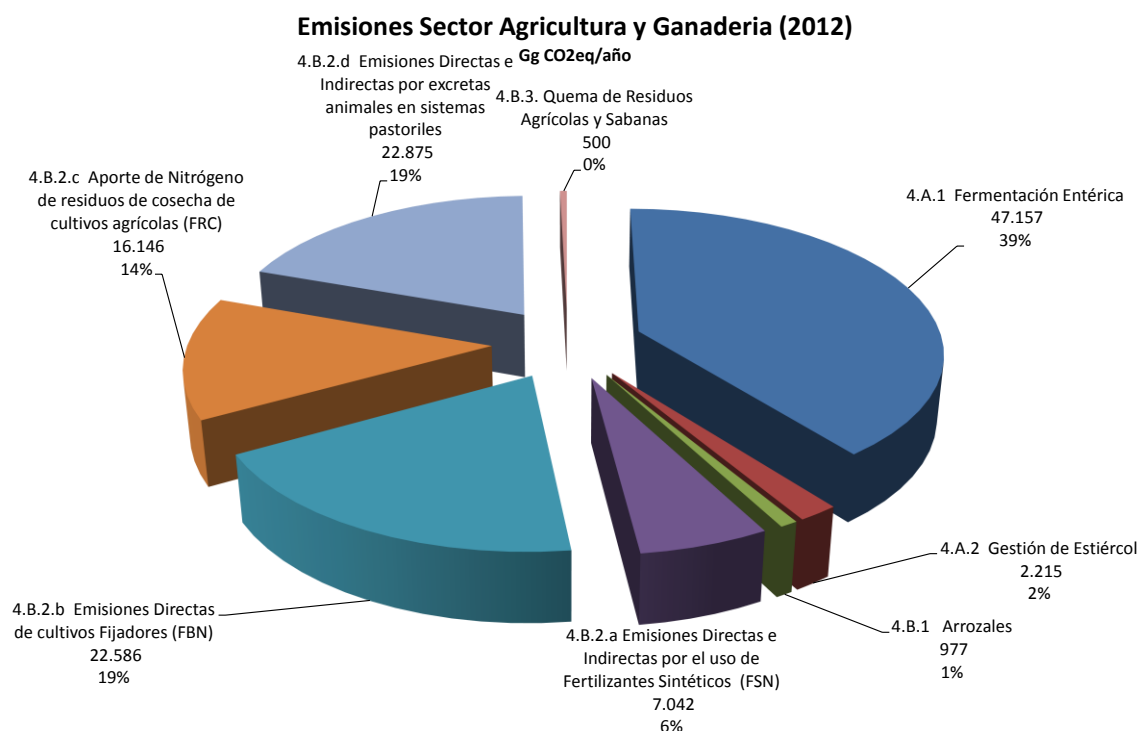


Figura I.6: Emisiones de GEI en el sector Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura
Fuente: Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 Volumen 3 – Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura

3.2. Sector Agroindustrial - Producción industrial de leche

Según se reporta en el documento Evaluación de Necesidades Tecnológicas ante el Cambio Climático desarrollado en 2012 para Argentina, los efluentes industriales corresponden a aquellos que son originados en diferentes procesos productivos como la producción de azúcar, la industria frigorífica, citrícola, láctea y la fabricación de bebidas, entre otros. El suero de leche en particular, subproducto del proceso de la elaboración de quesos, contiene la mayor parte de los componentes solubles y el agua presente en la leche, representando entre 85 y 95% del volumen de ésta. Además, retiene aproximadamente el 55% de los nutrientes de la leche, entre los que se puede mencionar proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales. Su composición es muy variable y depende de factores relacionados con el proceso de elaboración del queso, pudiendo obtenerse dos tipos de suero, suero ácido ($\text{pH} < 5$) y suero dulce ($6 < \text{pH} < 7$), de acuerdo al valor de pH del mismo. El suero producido a partir del queso coagulado con cuajo es bajo en acidez, mientras que el que es producido a partir de quesos ácidos frescos tales como la ricota es de acidez media o ácido. El suero además se caracteriza por una alta carga orgánica con valores de DBO en el orden de los 40.000-60.000 ppm y DQO entre 50.000 y 80.000 ppm, siendo la lactosa la responsable principal por la alta demanda de oxígeno (Chatzipaschali y Stamatis, 2012). El SL, es por lo tanto una sustancia de alto valor nutritivo, pero altamente contaminante, que al ser mal gestionado puede traer aparejado un alto impacto medioambiental.

La producción global de SL, tal como se muestra en la Figura I.7 ascendió a 186 millones de toneladas en el año 2008, lo que representó un aumento del orden del 2% entre 2002 y 2008. La Unión Europea (UE)

y los EE.UU son los responsables de la producción de alrededor del 70% del volumen mundial de este producto (Cruz Teran et al., 2008), y según indica Chatzipaschali y Stamatis, (2012) el 50% de esta producción es descargada en el medio ambiente, afectando las propiedades físicas y químicas del suelo si es descargado directamente sobre éste y/o alterando la vida marina reduciendo el oxígeno disuelto si es descargado en los cursos de agua.

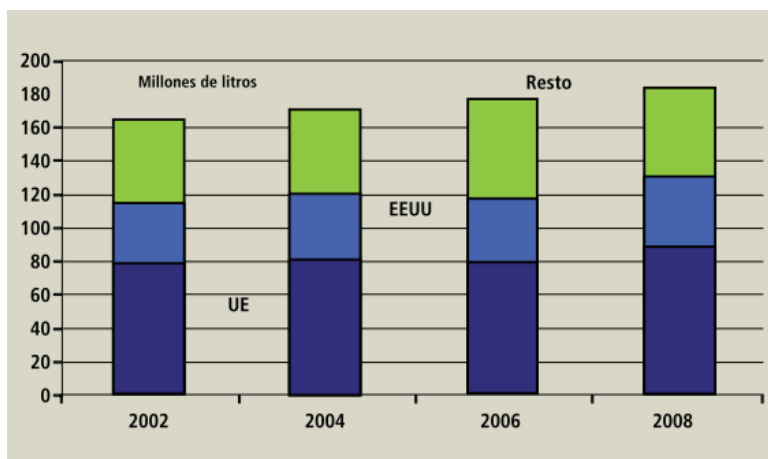


Figura I.7: Producción mundial de SL
Fuente: Cruz Teran et al., (2008)

Para analizar la producción de SL en Argentina en primer lugar se debe conocer cómo ha ido evolucionando la producción de leche, la cual ha aumentado progresivamente a partir del año 2008, alcanzando un volumen producido de más de 11.000 millones de litros al año 2013, tal como se indica en la Figura I.8. a. El 95% de la leche total es producida en la región pampeana y se distribuye según las distintas provincias como se muestra en la Figura I.8. b, donde la provincia de Buenos Aires contribuye con el 25% de la producción nacional.

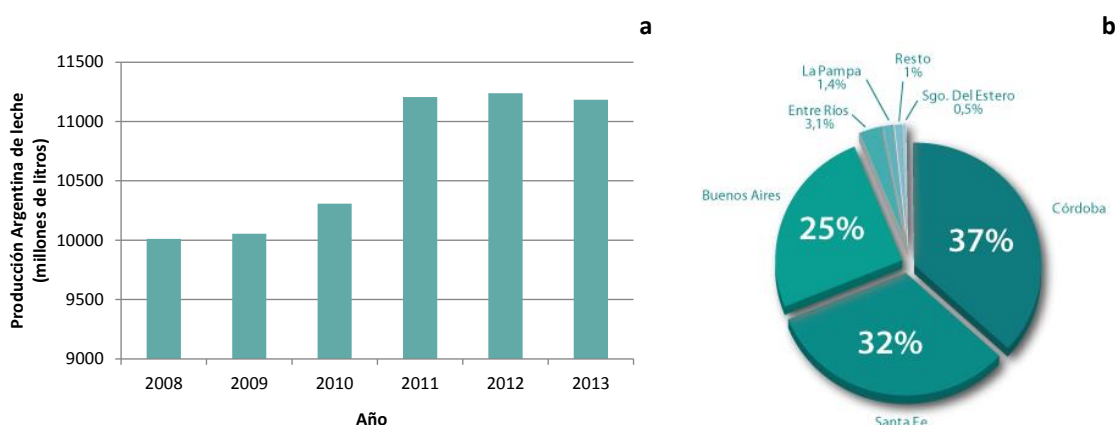


Figura I.8: a. Producción Argentina de leche entre los años 2008-2013. b. Distribución de la producción de leche por provincia.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos obtenidos de Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (www.minagri.gob.ar)

Según González (2013), en el año 2012 se destinó para la producción de queso un total de 4.610 millones de litros de leche, aproximadamente el 41% del total de leche producida. Considerando que el 85% de dicho volumen es transformado en SL, se tuvo una producción anual de 3.919 millones de litros de SL, del cual sólo el 45% fue industrializado, produciendo suero en polvo; el 55% restante fue destinado a alimentación animal o desechado en el medio ambiente. Según Cruz Teran et al., (2008) la conversión del SL en un producto de valor agregado presenta impactos positivos, tanto a nivel económico como sobre el medio ambiente, sin embargo, la gran mayoría de las PYMES que elaboran quesos aún no tiene resuelto el destino de SL, principalmente por una cuestión de costos.

Un análisis realizado por Capittini y Santalla, (2011) sobre la industria de la leche, propone la implementación del proceso de digestión anaeróbica en los efluentes de esta industria, pudiendo aplicar diferentes tipos de tecnologías, cada una con distinto grado de desarrollo desde lagunas cubiertas con sistemas de impermeabilización y descarga de lodos hasta reactores biológicos de flujo pistón o mezcla completa, donde el nivel de captura de metano será proporcionales a las cargas de materia orgánica de los efluentes. En este mismo estudio se indicó que el aprovechamiento energético del biogás permitiría abastecer hasta el 65% de la demanda de energía que requiere el proceso de productivo de queso, además de poder abastecer también, los requerimientos del consumo energético de la producción primaria de leche.

3. 2. 1. Emisiones de GEIs en el sector

Según el Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 Volumen 4 – Residuos, las emisiones provenientes de las aguas residuales industriales representan el 28% de las emisiones en el sector (Figura I.9). En dicho sector las emisiones de metano fueron generadas por diecinueve diferentes sectores industriales, ascendiendo dichas emisiones a 281.200 tCH₄ para el año 2012. El subsector responsable del mayor aporte corresponde al de pulpa y papel (63,8%), mientras que el sector lácteo fue responsable del 2,6% de las emisiones, esto es 7.190 tCH₄.

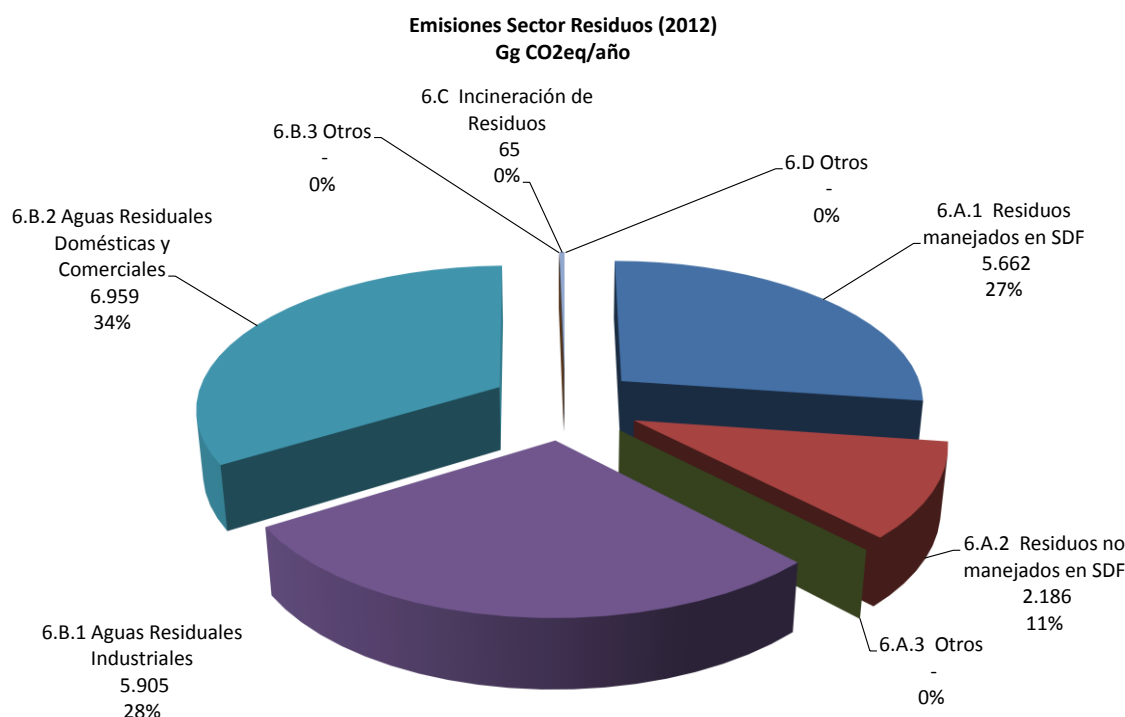


Figura I.9: Emisiones de GEI en el sector Residuos

Fuente: Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 Volumen 4 – Residuos

El estudio realizado por Capittini y Santalla, (2011) a nivel nacional mostró que las emisiones promedio de metano que se mitigarían por la aplicación de la tecnología anaeróbica al efluente de la producción de queso, ascenderían a 12.504 tCH₄ anuales obtenida como promedio del período 1989-2010, lo que representa un 16% del total de emisiones en el sector industrialización de leche. La evolución de las emisiones anuales para el efluente de la producción de queso se muestra en la Figura I.10, donde se puede observar un acentuado aumento entre los años 2004 y 2010, relacionado principalmente con el aumento en la producción de leche a nivel nacional. Este escenario muestra que este sector presenta un alto potencial de mitigación de GEIs y paralelamente una importante fuente de producción de bioenergía.

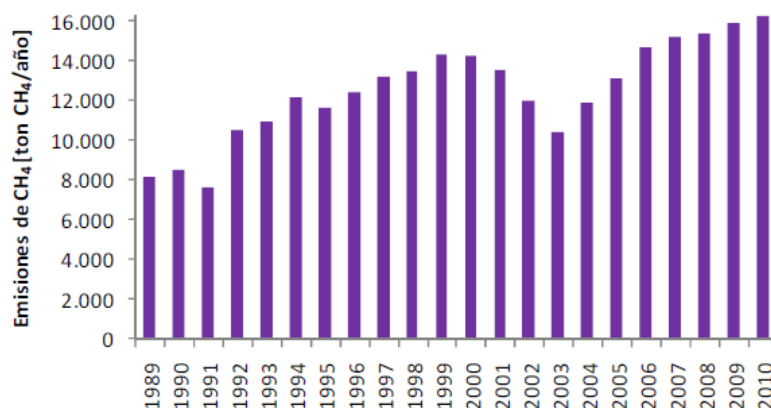


Figura I.10: Emisiones de metano a partir del efluente de la producción de queso

Fuente: Capittini y Santalla (2011)

3.3. Sector residuos urbanos – Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

A medida que el mundo se precipita hacia su futuro urbano, la cantidad de residuos sólidos urbanos (RSU), uno de los más importantes subproductos del estilo de vida urbano, está creciendo aún más rápido que la tasa de urbanización. Hacia el año 2002 había 2,9 billones de residentes urbanos a nivel global que generaron alrededor de 0,64 kg de RSU por persona por día, lo que representó una producción total de 0,68 billones de toneladas por año. Para el año 2012, estas cantidades han aumentado a cerca de 3 mil millones de habitantes que generan 1,2 kg/cápita/día, dando el valor de producción anual de 1,3 billones de toneladas, estimándose que para el año 2025, estos probablemente aumentarán a 4.3 billones de residentes urbanos generando unos 1,42 kg/cápita/día de RSU y por lo tanto 2,2 billones de toneladas anuales (Hoornweg y Bhada-Tata, 2012).

En Argentina según el Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 2014), para el año 2012 la generación de residuos ascendió a 15,4 millones de toneladas, lo que representa un aumento del 29,5% en la generación entre los años 2000 y 2012. La Figura I. 11. a, muestra la evolución de la producción de RSU en dicho período. La composición promedio de los RSU para el año 2012 (Figura I. 11. b) muestra que casi el 50% de los residuos está compuesto por restos de comida y frutas.

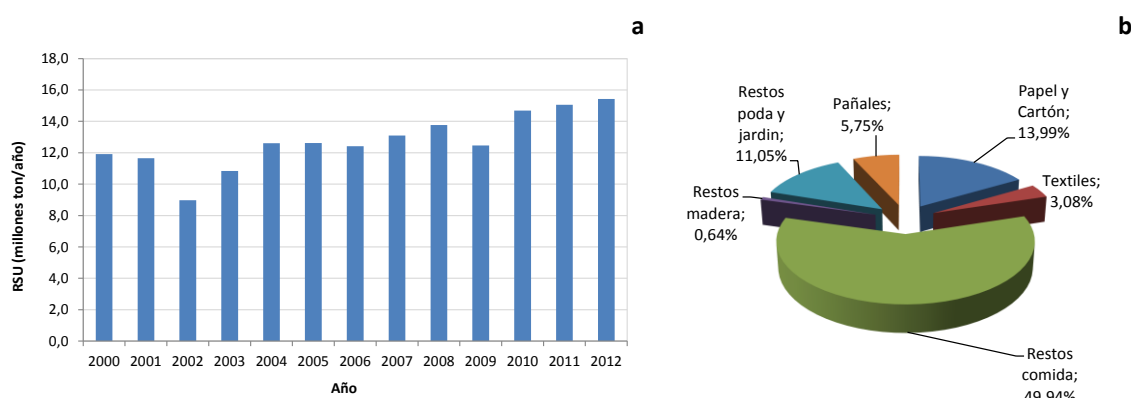


Figura I.11: a. Generación de RSU en Argentina para los años 2000-2012. b. Composición promedio de los RSU para el año 2012

Fuente: Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 Volumen 4 – Residuos

En lo que respecta a la disposición de los residuos, según lo que reporta el Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 Volumen 4 – Residuos, el 84% fue enviado a sitios de disposición final, el 16% restante, esto es 2,4 millones de toneladas no tienen un circuito formal de gestión de residuos. De los residuos gestionados, el 57,7% del total fue enviado a sitios con cierto grado de control, algunos de los cuales capturan el biogás producido, destruyendo el metano o utilizándolo para la generación de energía. Estos residuos corresponden en su mayoría a los generados en la ciudad de Buenos Aires y el Área Metropolitana y en algunas capitales como Córdoba, Santa Fe, Tucumán,

Mendoza y Salta. Los residuos restantes, esto es el 26,5% son enviados a sitios de disposición, que por lo general no cuenta con las medidas necesarias para ser considerado un relleno sanitario, esto es, no implementan procedimientos de compactación y cobertura de residuos, manejo de gases y de lixiviados, entre otras, además son pocos los que controlan potenciales impactos negativos sobre napas y suelo.

En Olavarría la generación de residuos sólidos urbanos ronda alrededor de 1,02 kg/persona/día, lo que representa una producción diaria de aproximadamente 120 toneladas. No se implementa la separación en origen y los residuos son recolectados y transportados a un relleno sanitario, donde actualmente de las tres celdas completas sólo una de ellas tiene sistema de captura y quema de biogás.

3. 3. 1. Emisiones de GEIs en el sector

Las emisiones de GEI de los RSU se han convertido en una preocupación importante, ya que se estima que representan casi el 5% (1.460 MtCO₂e) del total las emisiones globales de GEIs. Para el año 2010, el metano proveniente de los rellenos sanitarios representó el 12% de las emisiones de metano mundiales totales, aunque entre países las emisiones de metano debida a los rellenos sanitarios varía dependiendo de la composición de los residuos, las condiciones climáticas así como de las prácticas de disposición de los residuos (Hoornweg y Bhada-Tata, 2012).

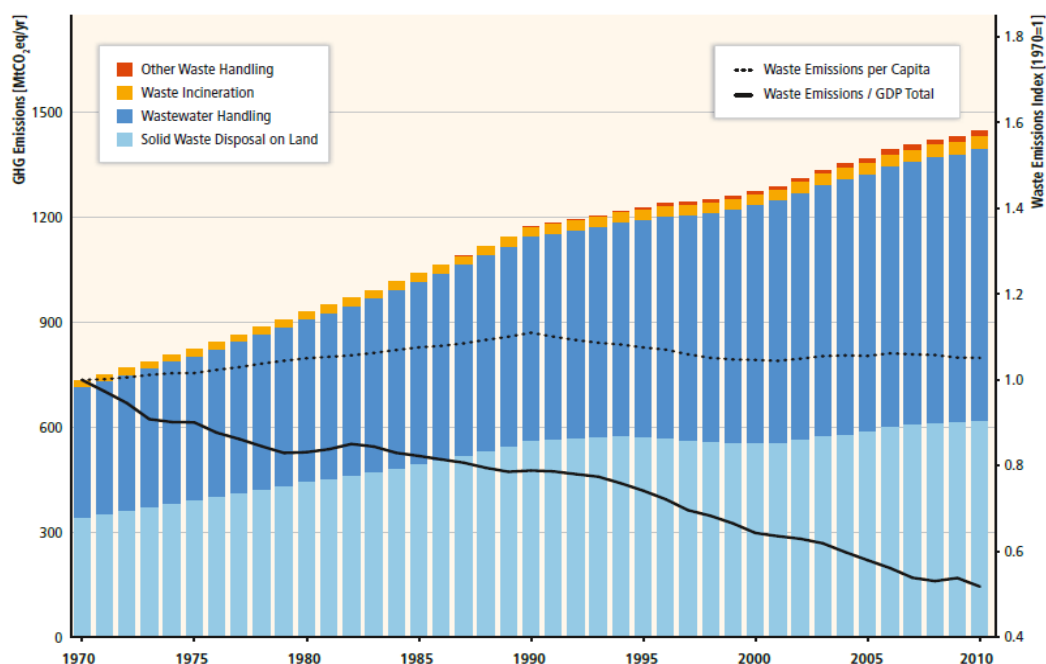


Figura I.12: Emisiones globales a partir de residuos MtCO₂e/ año, las emisiones globales por PBI y las emisiones per cápita están referidos a los valores del año 1970.

Fuente: Fishedick et al.,2014: Industria en: Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change

La Figura I.12, muestra la evolución de las emisiones globales generadas por residuos urbanos desde 1970 hasta 2010. Se observa que en dicho periodo las emisiones de metano provenientes de rellenos

sanitarios prácticamente se duplicaron. Las emisiones globales per cápita, presentaron un incremento neto del 5% para todo el período mientras que las emisiones de metano globales debido a los residuos por unidad de PIB se redujeron 48% para el período considerado. Algunas razones que explicaron estas tendencias están vinculadas a reglamentaciones de algunas regiones como la Unión Europea que impidieron disponer componentes biodegradables en rellenos sanitarios lo que arrojó una disminución de 19,4% en el período 2000-2009, a cambios en las conductas y actividades relacionadas a la gestión de residuos, tales como la producción de energía a partir de los residuos, la generación de biogás y su utilización, como ocurrió en Estados Unidos durante los últimos años (IPCC, 2014 V Report, Cap. 10 Industria).

A nivel nacional, el sector residuos fue responsable del 5% de las emisiones totales de GEIs según se reporta en el Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012. En este sector se incluye las emisiones debidas a los residuos sólidos urbanos, y a las aguas residuales domésticas e industriales. El manejo de los RSU representó el 38% de las emisiones en el sector (Figura I.9). Las emisiones debidas a los sitios de disposición final adecuadamente gestionados (27%), presentan casi el mismo nivel de emisiones que el manejo de las aguas residuales industriales (28%)

Las emisiones de metano al año 2012 para este sector resultaron 373,7 Gg CH₄ presentando un aumento del 210% respecto del año base 1990. En donde los rellenos sanitarios aportaron el 72,2% de dichas emisiones, mientras que los sitios de disposición final inadecuadamente manejados fueron responsables del 27,8% restante. Tal como fue mencionado anteriormente, algunos de los rellenos sanitarios cuentan con captura de metano; en el período 2004-2012, la captura y quema de metano ascendió a 36,5 Gg CH₄, lo que representa apenas el 10% de las emisiones totales de metano correspondientes al año 2012. La tendencia de las emisiones en el período 1978-2012 se observa en la Figura I.13 donde a partir del año 2004 se puede identificar un cambio en la curva debido a la incorporación de sistemas de captura de biogás en los grandes rellenos sanitarios. Sin embargo, el grado de implementación de esta tecnología aún no ha sido suficiente para revertir la tendencia de las emisiones. El aumento que se observa en las emisiones es el resultado de una mayor disposición de residuos en sitios de disposición final controlados. Por su parte las emisiones de los sitios de disposición final no manejados, responsables del 27,8% de las emisiones de metano para el año del inventario, se han mantenido con una tendencia de leve incremento explicado por el aumento poblacional y la tasa de consumo.

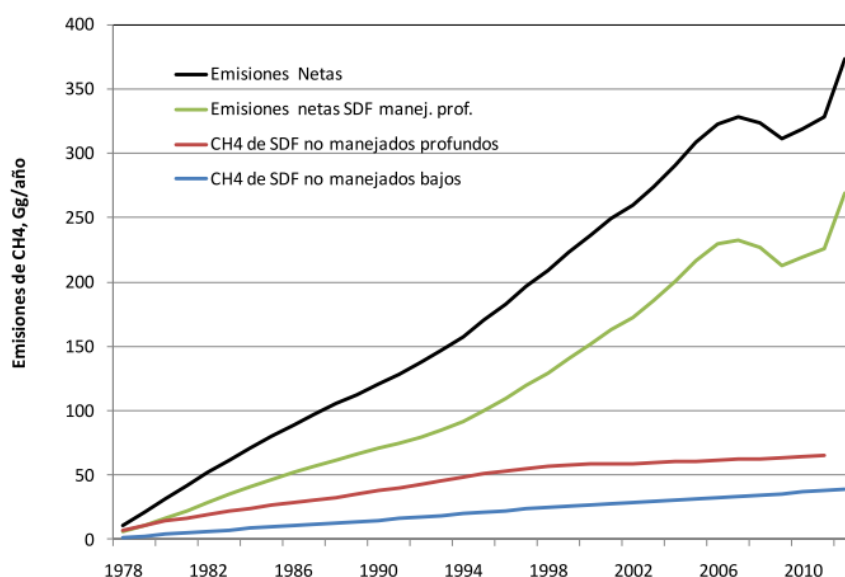


Figura I.13: Tendencia de las emisiones de CH₄ para el período 1978-2012

Fuente: Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 Volumen 4 – Residuos

Tanto los RSU como los efluentes industriales son los responsables de las emisiones de metano en el sector residuos, que en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno), la fracción de materia orgánica fácilmente degradable que los constituyen, genera metano. La ausencia de regulaciones que limiten la disposición final de las fracciones biodegradables en los rellenos sanitarios, tanto como la falta de sistemas de gestión integral de RSU que incluyan planes de separación en origen como así también la debilidad en el control de los límites de descarga de efluentes determinan un escenario de base donde las emisiones presentan una tendencia creciente.

4. La digestión anaeróbica como proceso biotecnológico

La biotecnología permite combinar el tratamiento de los residuos con la recuperación de bio-productos y biocombustibles renovables (Atandi y Rahman, 2012; Khanal, 2008; Triolo et al., 2013; Yilmaz, 2007; H. Zhou et al., 2011). En este sentido, la DA es reconocida como un proceso biotecnológico adecuado para el tratamiento de residuos complejos que al mismo tiempo permite regenerar compuestos químicos útiles y/o generar energía (Burke, 2001; Gerardi, 2003; Khanal, 2008; Yilmaz, 2007). En el digestor, la biomasa es biodegradada en presencia de un consorcio bacteriano, produciendo un gas denominado biogás rico en metano y un efluente líquido. El biogás puede ser utilizado como fuente de energía térmica para uso doméstico o para la generación de fuerza motriz o electricidad a través de turbinas de gas de baja presión, o mediante turbinas de vapor. El biogás también puede ser enriquecido energéticamente separando el dióxido de carbono y otros componentes minoritarios convirtiéndose en el denominado biometano que es un combustible con alta concentración de metano (85 al 90%) que puede sustituir al gas natural. El residuo líquido generado por el proceso anaeróbico, puede ser utilizado como una enmienda del suelo luego de ser sometido a un proceso de estabilización, (Chum et al., 2011).

La Figura I.14, ilustra el potencial de la tecnología anaeróbica en la recuperación de productos con valor añadido. Son muy variados los productos que pueden obtenerse a partir de este proceso, entre los que se pueden incluir biocombustibles (hidrógeno, butanol y metano), electricidad a partir de celdas de combustibles microbianas, fertilizantes (biosólidos) y químicos (sulfuros, ácidos orgánicos, etc). Además de lo mencionado, la realización de un post-tratamiento al efluente permitiría su reutilización en estanques de peces, en la producción de algas y para riego (Burke, 2001; Khanal, 2008).

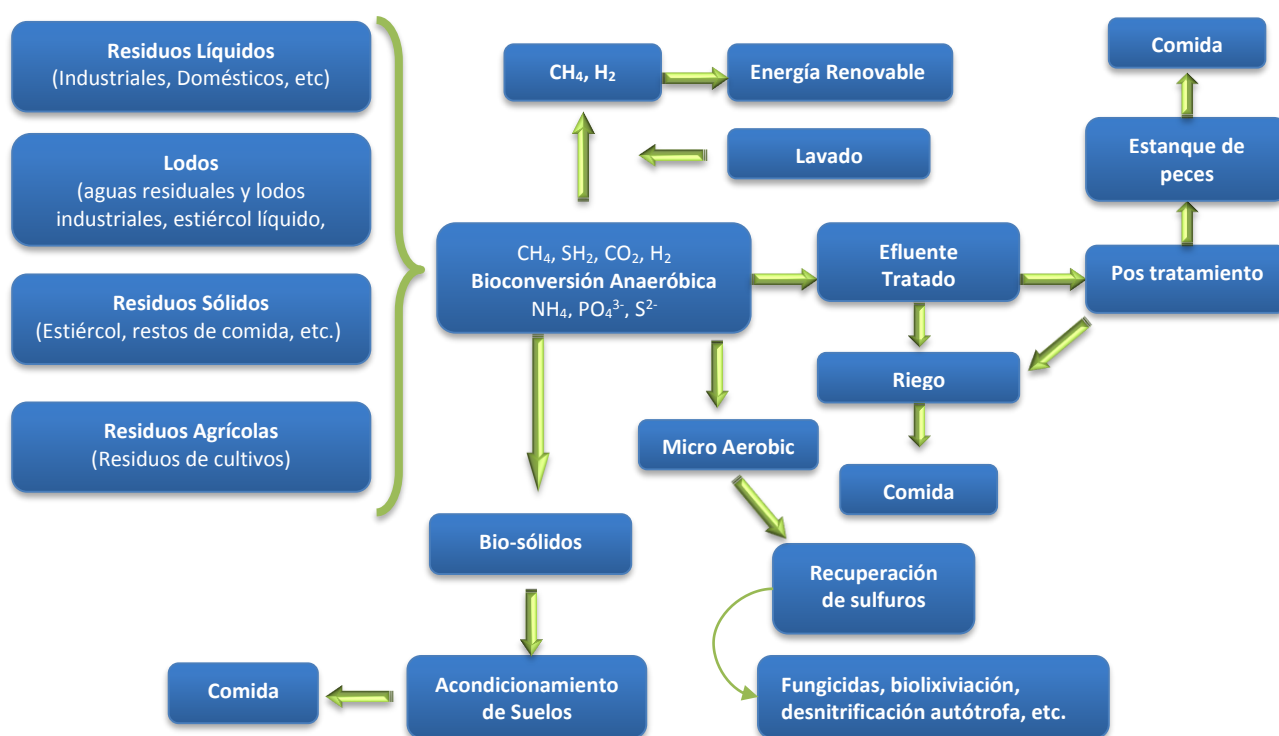


Figura I.14: Proceso integral de bio-conversión Anaeróbica
Fuente: Khanal, (2008)

4. 1. La digestión anaeróbica en el mundo

En muchos países en desarrollo, tales como India y China, se está utilizando la tecnología de DA principalmente en zonas rurales, con el objetivo de obtener energía a partir de residuos agrícolas como el estiércol. La mayoría de estas instalaciones pertenecen a granjas o aldeas, y el biogás producido se utiliza para calefacción, para cocción de alimentos o para iluminación. En América del Norte, el proceso de DA se suele utilizar tanto en las grandes fincas para el tratamiento del estiércol, como en las plantas de tratamiento de aguas residuales. En contraste, en los países europeos la aplicación de esta tecnología ha ido más lejos, y actualmente existen plantas comerciales para el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) (Arsova, 2010). Según reporta este mismo autor, recientemente se ha reconocido a la DA como una solución sostenible para el tratamiento de la FORSU, y por lo tanto el número de este tipo de plantas se ha incrementado durante la última década. Más aun, muchas empresas alemanas y suecas son líderes del mercado en grandes tecnologías de plantas de biogás. En

Suecia, se ha comenzado a utilizar la co-digestión, donde múltiples tipologías de residuos y estiércoles son tratados conjuntamente y a partir del biogás producido se obtiene bio-metano, que puede ser distribuido a través de tuberías de gas natural, pero que también puede ser usado directamente en vehículos (Chum et al., 2011).

Según Donoso-bravo et al., (2011) al año 2008 se habían implementado alrededor del mundo más de 2.200 reactores anaeróbicos. Solamente en Europa, entre 1995 y 2010, el número de plantas emplazadas aumentó de 15 a 200, lo que implicó un aumento de 200.000 a casi 6.000.000 de toneladas de residuos tratados en forma anual. Según reporta este autor, se espera que en los próximos años siga aumentando el número de reactores anaeróbicos instalados, lo que permitirá no solo proveer una fuente de energía renovable sino también reducir las emisiones de GEIs.

4.2. La situación Argentina

En Argentina la situación es sustancialmente diferente a la que se presenta en los países europeos. A fin de conocer el estado actual de situación en Argentina, se está llevando a cabo un relevamiento de biodigestores, que tiene como objetivo principal proporcionar una herramienta para planificar de manera estratégica el desarrollo de la biomasa en el territorio nacional. Esto significa conocer el estado del arte de la tecnología en Argentina. El proyecto para la promoción de la energía derivada de biomasa – PROBIOMASA, es una iniciativa de los Ministerios de Agricultura y de Planificación a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y la Secretaría de Energía con la asistencia técnica de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

Por su parte, el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), estima que en Argentina existen actualmente más de 60 plantas de biodigestión, aunque sólo se tiene registro de 40, de las cuales aproximadamente el 49% corresponde a grandes instalaciones, el 26% a instalaciones medias y el resto a pequeñas plantas. En la Figura I.15, se muestra la distribución de las plantas de digestión en las diferentes provincias, donde se observa que la mayor cantidad se encuentra emplazada en la provincia de Santa Fe.

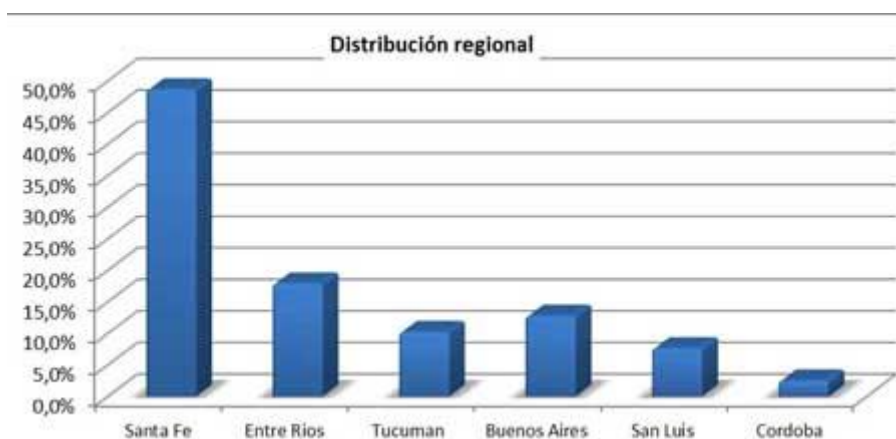


Figura I.15: Distribución inicial de las plantas

Fuente: <http://www.inti.gob.ar/e-renova/erBI/er52.php>

La tecnología de DA tiene un amplio campo de aplicación en el país, considerando las distintas fuentes de residuos y efluentes con alta carga de materia orgánica generados a lo largo y ancho del país. Según el informe Evaluación de Necesidades Tecnológicas para la Mitigación y Adaptación al Cambio Climático realizado en el año 2012, hasta la actualidad se han reportado 10 proyectos a nivel país en el marco del programa del Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL), entre los que se incluyen lagunas y reactores anaeróbicos con captura de biogás. El biogás generado por estos proyectos es principalmente utilizado como fuente de energía térmica para autoconsumo. Del total de proyectos, siete han implementado tecnología de origen extranjero. Una de las barreras que menciona este informe para el incremento de proyectos de este tipo es la falta de proveedores locales para la construcción, instalación y operación de digestores. Otra de las barreras que menciona es de tipo económica, en donde tanto la falta de acceso a los recursos financieros, como la ausencia de incentivos fiscales en un entorno macroeconómico incierto, hacen que estos proyectos sean de difícil realización.

También se hace mención a barreras de tipo técnicas, entre ellas, el desconocimiento sobre las diferentes tecnologías de aprovechamiento energético de efluentes, la ausencia de proyectos demostrativos, la falta de recursos humanos capacitados, la escasa o nula experiencia en las tecnologías de generación de energía (térmica o eléctrica) para autoconsumo, el amplio acceso a la red nacional de gas natural y electricidad, que sumado a la ausencia de mecanismos de control de la descarga de efluentes, la falta de promoción de prácticas de producción limpia, de eficiencia energética y del uso de tecnologías renovables para la producción de electricidad hacen que esta tecnología no pueda ser desarrollada ampliamente aún a pesar del potencial existente.

5. Marco legal para el desarrollo de la bioenergía

Uno de los aspectos fundamentales para el desarrollo de estos proyectos es la existencia de instrumentos legales que fomenten este tipo de actividades. A nivel nacional se han intentado promover el uso de diferentes tipos de energías renovables, a través de la promulgación de las siguientes leyes:

La Ley 26.093 promueve la producción y uso sustentable de biocombustibles, regula las actividades de producción, mezcla, distribución, comercialización, consumo, y autoconsumo de biocombustibles, entendiendo como tales al bioetanol, al biodiesel y al biogás.

Por otro la Ley 26.190 la cual tenía como objetivo ampliar la oferta de energía renovable dentro el sistema interconectado eléctrico argentino, reduciendo las importaciones de combustibles fósiles y la consecuente presión sobre el fisco para la obtención de divisas (Aguilar, 2014); la ley establecía que en un plazo de 10 años (a partir de 2006), el 8% del consumo eléctrico debíase abastecido por medio de energías renovables. En el marco de dicho programa se llevaron a cabo dos licitaciones, la primera denominada "GENREN I" donde de los 895MW totales licitados, 110MW (12,3%) correspondieron a 4 proyectos a partir de biocombustibles. En la segunda etapa "GENREN II" del total licitado (565MW),

aumento el número de proyectos que utilizaban diferentes fuentes de bioenergía, donde 100MW correspondían a energía térmica a partir de biodiesel, 20MW a partir de biogás, 120MW a partir de residuos orgánicos, y 100MW a partir de biomasa. Sin embargo, de estas obras, sólo el 10% del total adjudicado ha sido concretado hasta la fecha, mostrando el fracaso del programa, que según la Aguilar (2014) ha sido el resultado de la dificultad para acceder a financiamiento por parte de las empresas.

Durante el año 2015, se sancionó la ley 27.191 la cual modifica alguno de los artículos de la ley 26.093. Unos de los principales cambios tiene en cuenta la cantidad de energía renovable que se tiene que aportar, la cual indica que para el año 2017, el 8% de la matriz nacional de la energía eléctrica deberá ser aportada por fuentes renovables, aumentando a 20 % para el año 2025. Además, incorpora dentro de las fuentes de energías renovables al biodiesel y a los residuos sólidos urbanos, incluyendo además, ampliaciones de las políticas que favorecen la inversión en este sector, a través de la promoción de líneas de crédito y/o el otorgamiento de beneficios impositivos¹.

6. Objetivos

El contexto descripto demuestra que Argentina posee un gran potencial para la producción de bioenergía a partir de diferentes fuentes de biomasa no convencionales, como son las generadas por actividades productivas, ya sea ganadera, agro-industriales e incluso en las actividades diarias de las personas y que en la mayoría de los casos, no tienen un uso específico. Si bien en otros países, como por ejemplo los europeos, la tecnología de digestión anaeróbica se encuentra en un estado avanzado de conocimiento, a nivel nacional es necesario vencer algunas barreras, tanto técnicas, como financieras, para incrementar el número de plantas de DA y diseminar esta tecnología en las diferentes regiones productivas. Las pocas instalaciones existentes pertenecen en general a grandes empresas que han desarrollado proyectos de mitigación de GEIs en el marco del Mecanismo de Desarrollo Limpio (Protocolo de Kyoto) o por cuestiones corporativas que las obligan a cumplir determinados estándares de producción limpia, pero la tecnología tiene aún el desafío de vencer cuestiones de escala y lograr diseminarse en actividades productivas de pequeña y mediana escala con fines de autoconsumo o estableciendo formas asociativas para la utilización de la bioenergía y para el tratamiento de los residuos y efluentes.

El desarrollo de esta tecnología requiere de una base de conocimiento sobre la capacidad que presenta la DA para producir metano pero también sobre las problemáticas relacionadas con el proceso. Es necesario identificar las variables cuyo comportamiento puede afectar la estabilidad de la producción de metano, como así también profundizar en la caracterización físico-química de sustratos que permita a futuro avanzar hacia la elaboración de una base de datos de “biomasa propicia para la DA”. Resulta clave además, en el contexto de la producción de bioenergía, desarrollar información sobre el potencial

¹ Fuente: <http://www.telam.com.ar/notas/201509/121194-la-nueva-ley-de-energias-renovables-propicia-alcanzar-un-20-de-la-matriz-energetica-en-2025.html>

de producción de metano de sistemas diversos basados en el conocimiento de la interacción sustrato-inóculo que constituyan herramientas para el desarrollo de proyectos de pequeña y mediana escala.

El objetivo general de la presente tesis es estudiar el proceso de digestión anaeróbica de un sustrato específico, identificando las principales variables que deben ser objeto de control del proceso con la finalidad de optimizar la generación de metano y asegurar un régimen estable de producción. Se estudiará la acción del tipo y cantidad de inóculo y se identificarán las acciones sinérgicas y/o antagónicas que se producen cuando se incorpora más de un sustrato al proceso. El sustrato seleccionado para desarrollar el estudio del proceso fue purín de cerdo (PC), cuyas características intrínsecas (alto contenido de humedad y elevada capacidad tampón en términos de su capacidad para compensar cambios de pH) y su elevada disponibilidad lo convierten en una materia prima de alto valor potencial para la producción de bioenergía.

Los siguientes objetivos particulares pretenden dar respuesta el objetivo general planteado.

I. Estudiar la degradación anaeróbica del purín de cerdo utilizando diferentes tipos de inóculos.

La inoculación de un sustrato en condiciones de digestión anaeróbica contribuye a promover la producción de metano. La naturaleza del inóculo influye sobre el sistema sustrato-inóculo de diferentes maneras en función de las características de cada uno de ellos generando interacciones que dependen de las condiciones del proceso. Por este motivo, se estudiará el efecto que diferentes tipos de inóculos ejercen sobre el proceso anaeróbico del purín de cerdo para asegurar una producción máxima y estable de metano.

II. Estudiar la influencia de la concentración de inóculo sobre la DA de diferentes sustratos.

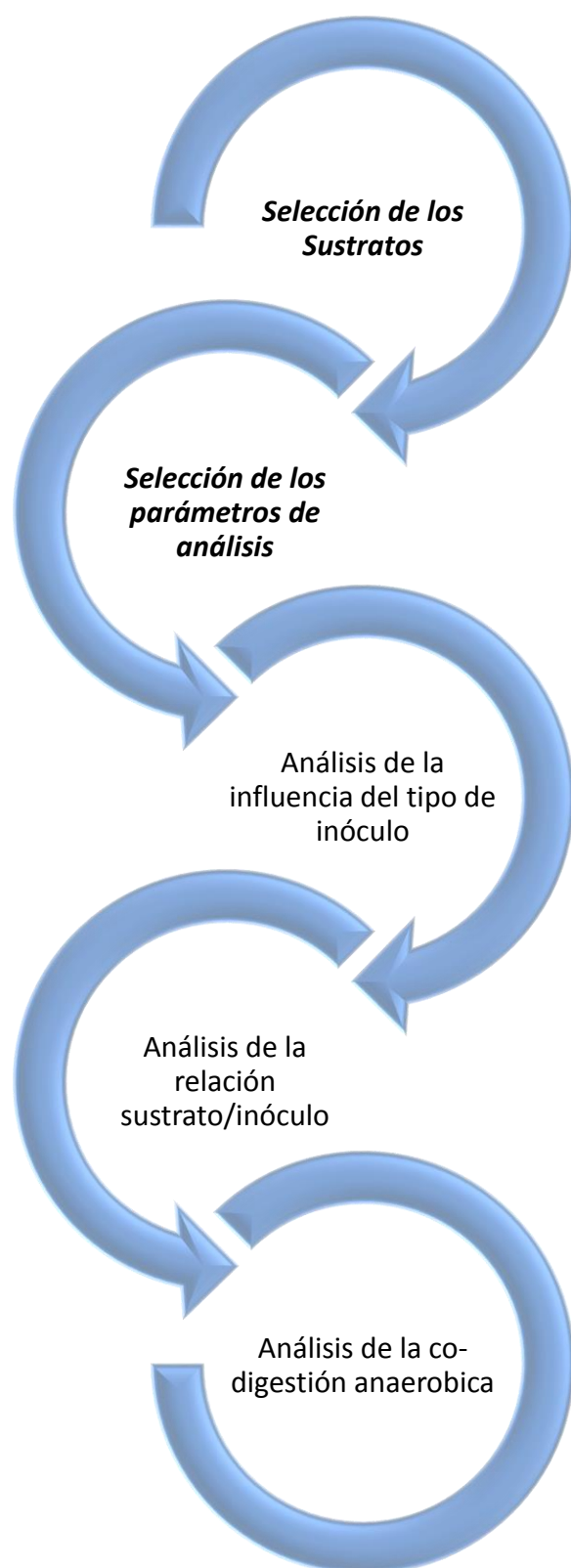
Considerando que la capacidad del sistema de digestión anaeróbica está dada por el volumen del digestor, es necesario encontrar la relación óptima entre la cantidad de sustrato a tratar y el volumen mínimo de inóculo que favorezca una degradación eficiente del sustrato y maximice la producción de metano. Para ello se evaluará el efecto que diferentes relaciones sustrato/inóculo ejercen sobre la producción de metano estudiando las interacciones entre ambos. En esta etapa se utilizarán como sustratos además del purín de cerdo, suero lácteo y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. Se estudiará el proceso desde el punto de vista de la cinética de producción de metano y se evaluarán modelos que permitan ajustar los datos experimentales.

III. Estudiar el proceso de co-digestión anaeróbica utilizando diferentes sustratos

Se estudiará la digestión simultánea de purín de cerdo, suero lácteo y la fracción orgánica de los residuos urbanos con la finalidad de identificar la influencia de la composición de cada sustrato sobre la producción de metano. A través de un análisis estadístico se evaluarán las interacciones entre sustratos

identificando efectos sinérgicos y/o antagónicos que puedan influir sobre la productividad de metano y la estabilidad del sistema.

7. Esquema de las etapas del trabajo



- Se realizó la selección de los sustratos teniendo en cuenta principalmente, el nivel de impacto sobre el ambiente, tales como una elevada acidez y/o una elevada concentración de nutrientes (amonio), además de características que los hacen favorables para el proceso anaeróbico, tales como un elevado contenido de agua y de materia orgánica de fácil degradabilidad. En base a eso se seleccionaron:

- Purín de Cerdo (PC), Suero de leche (SL) y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbano (FORSU).

- En función del análisis bibliográfico se analizarán los siguientes parámetros que pueden influyen sobre el proceso:

- Tipo inóculo,
- Concentración de inóculo
- Concentración de co-sustratos

- En una primera etapa se estudiará la influencia del tipo de inóculo sobre el proceso y sobre la producción de metano del PC.

- Se utilizarán como inóculos, rumen, PC digerido y lodos de depuradora.

- En la segunda etapa se analizará la influencia de la cantidad de inóculo sobre la DA de PC, FORSU y SL, para lo cual se evaluará la estabilidad del proceso a través de la producción de metano y de la concentración de los producto intermedio de reacción.

- Se estudiará el efecto de los co-sustratos (SL y FORSU) sobre la producción de metano de PC, mediante un análisis estadístico de diseño de mezclas y superficie de respuesta, lo que permitirá seleccionar la concentración de cada uno de los sustatos que optimice el proceso en términos de producción de metano.

La tesis se ha organizado en 7 capítulos, cuyos contenidos se indican a continuación

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS: En este capítulo se describe el contexto en el cual se enmarca la presente tesis, así como los objetivos generales y específicos.

CAPITULO II: EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAERÓBICA: Se realiza una revisión bibliográfica sobre los aspectos más importantes relacionados con el proceso de digestión anaeróbica.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS: se describe la metodología empleada en el desarrollo de la tesis, los materiales, equipos y técnicas utilizadas.

En los capítulos IV, V y VI, se analizan los resultados experimentales obtenidos en función de los objetivos propuestos.

CAPITULO IV: ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE INÓCULO SOBRE LA DA DEL PC: En este capítulo se analizan los resultados del diseño experimental aplicado para evaluar la influencia de tres inóculos (rumen, purines previamente digeridos, lodos de depuradora) sobre la DA de PC en régimen mesofílico.

CAPITULO V: ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO: Se analiza la influencia de la relación sustrato/inóculo sobre la cinética de producción de metano durante la DA en régimen mesofílico de PC, de suero de leche y de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

CAPITULO VI: ANÁLISIS DE LA CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA de PC, SL y FORSU: Se estudia el proceso de co-digestión anaeróbica de PC con diferentes proporciones de suero lácteo y FORSU utilizando herramientas estadísticas para identificar la concentración de sustratos que optimice la producción de metano y permita identificar potenciales interacciones sinérgicas y antagónicas sobre el proceso.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES

CAPITULO II

EL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAERÓBICA

1. El proceso de Digestión Anaeróbica

La digestión anaeróbica (DA) consiste en la descomposición de material biodegradable que ocurre en ausencia de oxígeno. La DA es llevada a cabo a través de un consorcio de microorganismos que degradan la materia orgánica en una serie de etapas en orden secuencial resultando en una acción sinérgica (Ahring et al., 1995; Hegde y Pullammanappallil, 2007; Ward et al., 2008). Es un proceso que ocurre en forma natural en ambientes anaeróbicos tales como sedimentos, suelos o en el tracto digestivo de los animales (Chynoweth et al., 1999). Los productos principales de la DA son un gas conocido como biogás, compuesto principalmente por metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2), además de otros gases en menores proporciones como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), hidrógeno (H_2) y monóxido de carbono (CO) (Gerardi, 2003; Marchaim, 1992), además de un barro estabilizado conocido como digestato que según algunos autores (Carrillo, 2003; Makádi et al., 2012; Weiland, 2010) puede ser utilizado como abono para mejorar la calidad de los suelos.

Varios tipos de materia orgánica pueden ser tratados por medio de este proceso con la finalidad de producir un gas con elevado poder calórico, además de degradar el sustrato utilizado; entre los que se han estudiado hasta la actualidad se pueden mencionar residuos o efluentes de las actividades agropecuarias tales como purines de cerdo (Collins et al., 2011; Costa et al., 2007; Hansen et al., 1999, 1998; Masse y Droste, 2000; Ruiz-Espinoza et al., 2012; Yilmazel y Demirer, 2011), estiércoles de vaca (Gilkinson y Frost, 2013; Massé et al., 2003) y estiércoles de gallina entre otros (Sakar et al., 2009; Yilmazel y Demirer, 2011; Yusof et al., 2014). Los residuos y efluentes con alta carga orgánica provenientes de la industria tales como efluentes del procesamiento de queso (Comino et al., 2012; Ergüder et al., 2001; Gelegenis et al., 2007; Kavacik y Topaloglu, 2010; Lebrator et al., 1990) o del procesamiento de papas (Durruty et al., 2012), o residuos sólidos tan variados como tortas de aceite de girasol (Raposo et al., 2009) o residuos de la industria de la gelatina (Raghunathan et al., 2008). Otra fuente importante de materia orgánica la constituyen los residuos provenientes de las actividades humanas, como son los barros de las plantas depuradoras de aguas (Bien et al., 2004; Kuglarz y Mrowiec, 2009; Lozano et al., 2009; Wakadikar et al., 2012), o la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), los que han sido estudiados con la finalidad de evaluar su potencial para la generación de metano (Adak et al., 2011; El-Fadel et al., 2013; Giovanni Esposito et al., 2012; Lopes et al., 2004; Lozano et al., 2009). Si bien la DA permite tratar una amplia variedad de materias orgánicas hay algunos residuos como los lignocelulósicos, que requieren de procesos previos o pre-tratamientos para mejorar su biodegradabilidad en condiciones de DA (Chynoweth et al., 1999; Sawatdeenarunat et al., 2015).

1.1. Productos del proceso de la digestión anaeróbica

La cantidad y calidad del biogás producido durante la DA depende principalmente de la alimentación al reactor, aunque también hay otros factores tales como pH, alcalinidad, velocidad de carga, presencia de

componentes tóxicos, contenido de sólidos volátiles y sólidos totales que influyen sobre la producción final. El metano es el que le confiere al biogás características de combustible, aunque su concentración depende principalmente del tipo de alimentación al reactor (Khanal, 2008). La Tabla II.1 resume la composición promedio del biogás según el tipo de sustrato utilizado como alimentación del reactor.

Tabla II.1: Composición del biogás de diferentes sustratos (Carrillo, 2003)

Gases	Desechos Agrícolas	Lodos Cloacales	Desechos Industriales	Rellenos Sanitarios
Metano (CH ₄)	50-80%	50-80%	50-70%	45-65%
Dióxido de Carbono (CO ₂)	30-50%	20-50%	30-50%	34-55%
Vapor de agua		Saturación		
Hidrógeno (H ₂)	0-2%	0-5%	0-2%	0-1%
Sulfuro de Hidrógeno (H ₂ S)	100-7000 ppm	0-1%	0-8%	0,5-100ppm
Amoníaco (NH ₃)		Trazas		
Monóxido de Carbono (CO)	0-1%	0-1%	0-1%	Trazas
Nitrógeno (N ₂)	0-1%	0-3%	0-1%	0-20%
Oxígeno (O ₂)	0-1%	0-1%	0-1%	0-5%
Orgánicos	Trazas	Trazas	Trazas	5ppm

Las características del digestato, también denominado bioabono dependen fuertemente del tipo de tecnología y del tipo de sustrato utilizado durante el proceso. El digestato es un producto que presenta un contenido en materia orgánica menor que los residuos originales, una gran variedad de macro y micro nutrientes, además de una elevada proporción de nitrógeno mineral principalmente en la forma de nitrógeno amoniacal, que constituye una fuente importante de nutrientes para las plantas (Carrillo, 2003; Makádi et al., 2012; USEPA, 2006; Varnero Moreno, 2011). Puede ser sólido o líquido dependiendo del tipo de tecnología aplicada durante el proceso. Si bien puede ser utilizado directamente como abono sobre el suelo o en la agricultura, su aplicación no siempre es tan directa, ya que puede generar problemas de olores, además de poder contener patógenos y/o parásitos, cuyo contenido dependen de la temperatura de la DA (Rubio-Loza y Noyola, 2010). Mientras que en los procesos termofílicos, se incrementa la eliminación de bacterias patogénicas, en los mesofílicos se requiere un tratamiento posterior de sanitización si se prevé su utilización como fertilizante (Makádi et al., 2012). Para resolver este problema, G. Esposito et al., (2012) sugiere aplicar compostaje previo a su utilización como fertilizante.

2. Etapas de la DA

La DA es un proceso muy complejo debido a que involucra un grupo de diversos de microorganismos y una serie de etapas metabólicas interdependientes. La bioquímica del proceso tiene en cuenta desde los cambios químicos realizados por las enzimas (actividad química de los microorganismos), pasando por los tipos de sustratos que los microorganismos pueden destruir o transformar a nuevos componentes, hasta el camino paso a paso de la degradación anaeróbica (Khanal, 2008).

Tres etapas principales son a menudo utilizadas para describir el proceso. La primera corresponde a la hidrólisis de la materia orgánica compleja, seguida por la etapa de formación de ácidos, la cual incluye la acidogénesis y acetogénesis y por último la etapa correspondiente a la producción de metano o metanogénesis (Cadavid-Rodriguez y Horan, 2012; Gerardi, 2003; Vavilin et al., 2008).

La eficiencia del proceso depende de las velocidades de las etapas particulares. Un proceso eficiente implica una buena coordinación entre todas las etapas. Cada etapa involucra un grupo de microorganismos que trabajan en secuencia, con los productos de un grupo sirviendo como sustrato para el otro grupo (Cadavid-Rodriguez y Horan, 2012; Gerardi, 2003; Khanal, 2008). En la Figura II.1 se muestra el esquema de las etapas del proceso de DA de los residuos complejos.

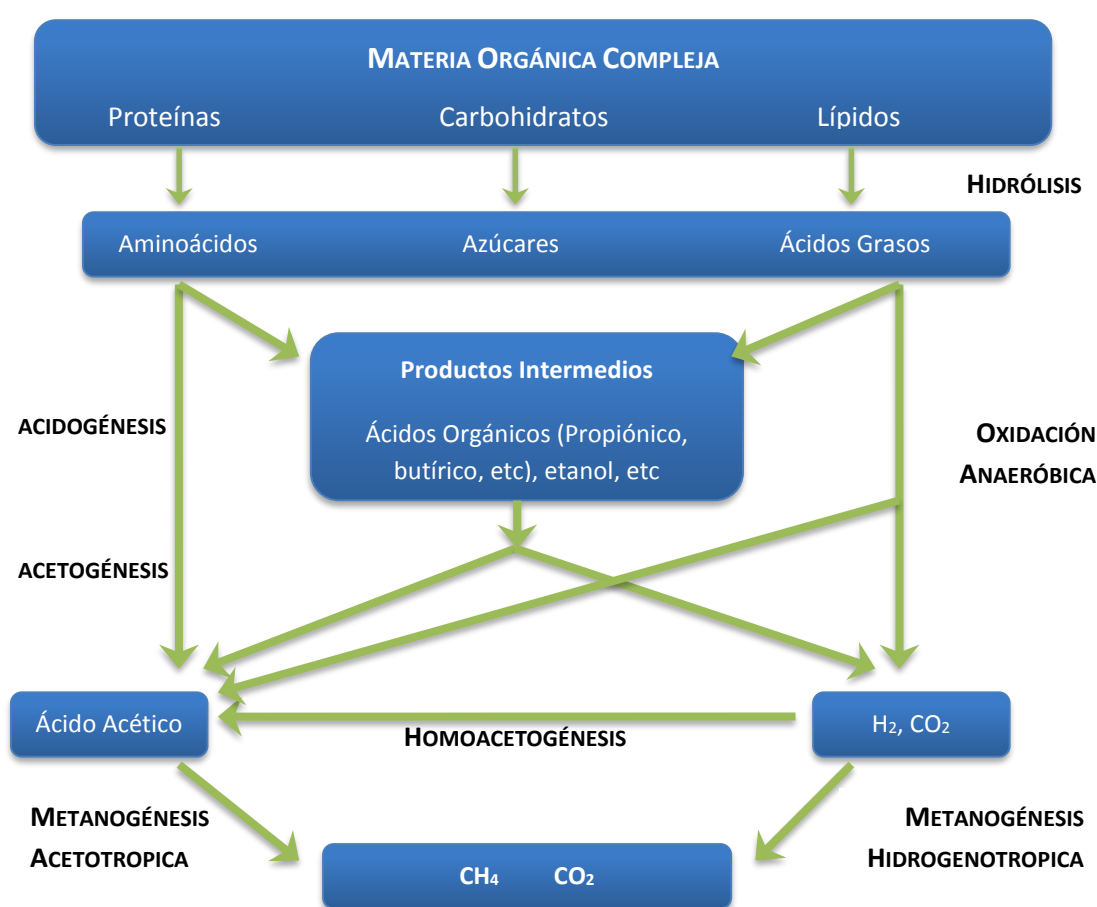


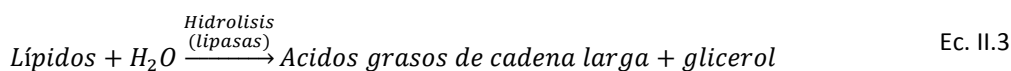
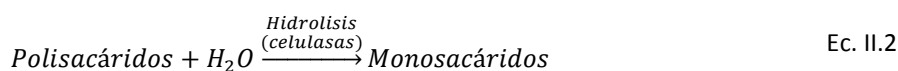
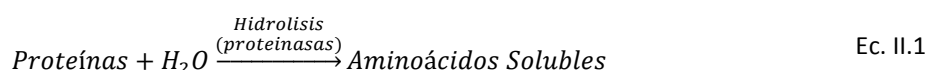
Figura II.1: Etapas en el proceso de digestión anaeróbica de materia orgánica compleja

Fuente: Cendales Ladino, 2011; Khanal, 2008

2.1. Hidrólisis

En los digestores anaeróbicos los compuestos orgánicos complejos son rápidamente degradados a sustancias solubles tales como carbohidratos, proteínas y lípidos (Batstone et al., 2002), que luego son hidrolizados a azúcares sencillos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga, respectivamente (Batstone et al., 2002; Gerardi, 2003; Hill, 1982; Khanal, 2008; Lidholm y Ossiansson, 2008; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991; Riquelme, 2009). La hidrólisis es, por tanto, el primer paso necesario para la

degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos (Gerardi, 2003). La hidrólisis de los polímeros orgánicos es llevada a cabo a través de enzimas extra celulares (hidrolasas) producidas por las bacterias fermentativas, en donde la materia orgánica insoluble es convertida en materiales solubles, que posteriormente serán transportadas a través de las membranas celulares para su aprovechamiento. Entre las enzimas hidrolíticas se incluyen a las enzimas celulasas, proteinasa y lipasas responsables de la hidrólisis de carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente, en donde las proteinasas convierten las proteínas en aminoácidos (Ec. II.1), las celulasas hidrolizan la celulosa (carbohidrato complejo) en azúcares (Ec. II.2), y finalmente las lipasas convierten los lípidos (grasas y aceites) en ácidos grasos de cadena larga y glicerol (Ec. II.3) (Boe, 2006; Kangle et al., 2012; Vavilin et al., 2008).



La velocidad global de esta etapa depende de la forma, tamaño y área superficial de la materia orgánica disponible en el reactor, de la concentración de la biomasa, de la producción de enzimas y su adsorción (Boe, 2006). Esta etapa suele ser considerada por varios autores (Khanal, 2008; O'Sullivan et al., 2006; Sutaryo, 2012) como la etapa limitante de la velocidad global del proceso en el tratamiento anaeróbico de residuos que contienen lípidos y/o significativa cantidad de material particulado, por ejemplo, restos de comida, estiércol de cerdo, etc. Para tales residuos, la producción neta de metano en un digestor es proporcional a la velocidad neta de solubilización (Khanal, 2008), más aún en el caso que el sustrato presente gran cantidad de material inerte como lignina. En este caso, la velocidad de la hidrólisis se ve disminuida como consecuencia de la competencia de la adsorción de las enzimas sobre la parte inerte de los sustratos (Boe, 2006). Estas limitaciones pueden superarse aplicando tratamientos de tipo físicos y químicos a los residuos, lo cual permite aumentar la velocidad de esta etapa. Dentro de estos tratamientos pueden mencionarse la trituración del sustrato, el ataque con ultrasonido, ataque químico con ácidos o bases o pretratamientos térmico o termoquímico (Cendales Ladino, 2011).

2.2. Acidogénesis

Corresponde a la etapa formadora de ácidos, en donde una diversidad de bacterias facultativas y anaeróbicas convierten parte del producto soluble de la primera etapa (azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga) en sustratos fácilmente asimilables para las bacterias metanogénicas, es decir, acetato (51%), hidrógeno y dióxido de carbono (19%), mientras que el resto, aproximadamente el 30% es convertida en ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos volátiles (AGV) tales como ácido propiónico, butírico y valérico, además de alcoholes que son convertidos posteriormente en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono por otro grupo de bacterias conocidas como bacterias

acetogénicas (Cendales Ladino, 2011; Gerardi, 2003; Kangle et al., 2012; Khanal, 2008; Riquelme, 2009). Durante esta etapa también son liberados productos de la fermentación de los aminoácidos, tales como amonio y sulfuro de hidrógeno, los cuales en elevadas concentraciones pueden actuar como inhibidores del proceso de DA (Boe, 2006; Hill, 1983; Kangle et al., 2012).

Los distintos tipos de sustratos y condiciones ambientales, tales como pH y concentración de hidrógeno disuelto, determinan el producto final del proceso fermentativo. Incluso un sustrato simple como la glucosa puede fermentar obteniendo diferentes productos dependiendo de las comunidades bacterianas presentes (Tabla II.2). Las bacterias fermentativas pueden funcionar a altas concentraciones de hidrógeno y ácido fórmico; sin embargo, bajo estas condiciones las bacterias utilizan el camino en el que son producidos los metabolitos más reducidos tales como AGV, ácido láctico y etanol. En condiciones de alta carga orgánica, es más significativa la producción de ácido láctico. Es importante destacar que mientras a pH entre 4 y 5 se incrementa la producción de etanol, a valores de pH elevados se ve favorecida la producción de AGV. A valores de pH ácidos inferiores a 4 todos los procesos fermentativos cesan (Boe, 2006; Khanal, 2008).

Tabla II.2: Productos de fermentación de la Glucosa (Boe, 2006)

Producto	Reacción	Ecuación
Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	Ec. II.4
Propionato y Acetato	$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2O$	Ec. II.5
Butirato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 4H_2$	Ec. II.6
Lactato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$	Ec. II.7
Etanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	Ec. II.8

2.3. Acetogénesis

Alguno de los productos de fermentación tales como los ácidos grasos de más de dos átomos de carbono, alcoholes de más de un átomo de carbono y ácidos grasos aromáticos no pueden ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas. Es durante el proceso acetogénico que estos productos son oxidados a acetato e hidrógeno mediante dos mecanismos de reacción, la acetogénesis acetoclástica promovida por las bacterias productoras de hidrógeno y la homoacetogénesis hidrogenotrófica a cargo de las bacterias consumidoras de hidrógeno. Mientras que por el primer mecanismo se produce principalmente acetato, hidrógeno y dióxido de carbono a partir de los AGV y alcohol, por el segundo mecanismo se produce acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono (Cendales Ladino, 2011; Kangle et al., 2012).

Para que la oxidación anaeróbica de los productos de fermentación por medio de las bacterias productoras de hidrógeno sea favorable termodinámicamente es necesario que la presión parcial de

hidrógeno en el medio sea mantenido en valores bajos. En un reactor anaeróbico existe una relación simbiótica entre las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno y las bacterias metanogénicas consumidoras de hidrógeno, en donde estas últimas consumen rápidamente el hidrógeno producido manteniendo una presión parcial de este gas extremadamente baja. Esto provee condiciones termodinámicamente favorables para las bacterias productoras de hidrógeno permitiéndoles transformar los componentes orgánicos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Este fenómeno se conoce comúnmente como transferencia de hidrógeno entre especies. La oxidación del ácido propiónico a acetato es termodinámicamente favorable solamente a presiones parciales de hidrógeno por debajo de 10^{-4} atm, mientras para el butirato y el etanol la presión debe encontrarse por debajo de 10^{-3} y 1 atm respectivamente (Boe, 2006; Khanal, 2008). Las reacciones de oxidación de los AGV que ocurren durante esta etapa se muestran en la Tabla II.3.

Tabla II.3: degradación de ácidos grasos (Boe, 2006)

Sustrato	Reacción	Ecuación
Propionato	$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$	Ec. II.9
i-butirato	$CH_3(CHCH_3)COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	Ec. II.10
Butirato	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	Ec. II.11
i-valerato	$CH_3(CHCH_3)CH_2COOH + 2H_2O + CO_2 \rightarrow 3CH_3COOH + 2H_2$	Ec. II.12

En la acetogénesis homoacetogénica las bacterias responsables de las transformaciones son tanto de tipo autótrofas como heterótrofas. El primer tipo de bacterias (homoacetogénicas autótrofas) utilizan como sustrato una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (fuente de carbono) (Ec. II.13), aunque algunas bacterias pueden utilizar monóxido como fuente de carbono (Ec. II.14.). Por otro lado, las bacterias homoacetogénicas heterótrofas, usan sustratos orgánicos tales como formiato (Ec. II.15) y metanol (Ec. II.16) como fuente de carbono para producir acetato como producto final.

Tabla II.4: Sustratos utilizados para la producción de acetato por las homoacetogénicas (Khanal, 2008)

Reacción	Ecuación
$CO_2 + H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	Ec. II.13
$4CO + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2$	Ec. II.14
$4HCOOH \rightarrow CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$	Ec. II.15
$4CH_3OH + 2CO_2 \rightarrow 3CH_3COOH + 2CO_2$	Ec. II.16

De todo el acetato formado durante el proceso anaeróbico, un 30% es aportado a partir de las bacterias acidogénicas. La conversión del propionato y butirato en acetato a través de las bacterias formadoras de hidrógeno contribuyen aproximadamente con el 60%, mientras que el 10% restante es formado a partir

de las bacterias homoacetogénicas, correspondiente a la conversión de hidrógeno y dióxido de carbono en acetato (Hill, 1982).

2.4. Metanogénesis

Las bacterias metanogénicas son clasificadas dentro del género archeobacterias, donde el término *archaea* significa ancianas, y son las únicas capaz de producir metano (Cendales Ladino, 2011; Gerardi, 2003). Estas bacterias son estrictamente anaeróbicas y según reporta Khanal, (2008) suelen ser consideradas como la especie limitante de la velocidad en el tratamiento de aguas residuales. Suelen encontrarse en ambientes naturales libres de oxígeno tales como lagunas, sedimentos marinos, estanques o en el rumen de los animales (Khanal, 2008). Son clasificadas de acuerdo a su estructura, al tipo de sustrato que utilizan, al tipo de enzimas producidas y al rango de temperatura de crecimiento. Cada tipo de bacteria metanogénica tiene un sustrato o grupo de sustratos que puede degradar, donde el hidrógeno sirve como sustrato universal, mientras que el dióxido de carbono en sus formas carbonato y bicarbonato funciona como una fuente de carbono inorgánico. Otros componentes que pueden ser utilizados como sustrato por las bacterias metanogénicas incluyen al dimetil-sulfuro, dimetilamina y trimetilamina, además de algunos alcoholes tales como el 2-propanol, 2-butanol así como propanol y butanol (Gerardi, 2003).

La metanogénesis es llevada a cabo a través de tres caminos metabólicos fundamentales que se distinguen de acuerdo al tipo de sustrato utilizado por las bacterias: metanogénesis acetotrófica, metanogénesis hidrogenotrófica, y metanogénesis metilotrófica. El primer grupo de metanógenos realiza la conversión directa de acetato a metano y dióxido de carbono, contribuyendo con un 70 a 72% de la producción total de metano (Ec. II.17); el segundo grupo lleva a cabo la reducción del dióxido de carbono con el hidrógeno contribuyendo con hasta el 28 a 30% restante del metano producido en el digestor (Ec. II.18)(Gerardi, 2003; Hill, 1982; Kangle et al., 2012; Khanal, 2008). Finalmente las bacterias metanogénicas metilotróficas son capaces de utilizar compuestos que contienen grupos metilos, tales como metanol (Ec. II.19), mono-di y tri-metilamina (Ec. II.20), y dimetil-sulfuro (Ec. II.21), en donde la característica principal es que el grupo metilo es transformado en metano, aunque la producción de metano por este mecanismo es menor comparado con los otros dos (Khanal, 2008). En función de esto, para que un proceso anaeróbico sea exitoso es necesario contar en el digestor con una gran variedad de bacterias formadoras de metano, ya que una sola especie no puede degradar todos los sustratos disponibles (Gerardi, 2003).

Tabla II.5: Conversión de diferentes tipos de sustratos en metano

Reacción	Ecuación
$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	Ec. II.17
$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	Ec. II.18
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	Ec. II.19
$4CH_3NH_2 + 2H_2O + 4H^+ \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + NH_4^+$	Ec. II.20
$(CH_3)_2S + H_2O \rightarrow 1.5CH_4 + 0.5CO_2 + H_2S$	Ec. II.21

Durante la metanogénesis se remueven del medio tanto hidrógeno como acetato, y esto influye fuertemente tanto en el proceso acetogénico como en el proceso fermentativo. La acetogénesis ocurre simultáneamente con la metanogénesis hidrogenotrófica (consumidores de hidrógeno), la cual es considerada como el regulador primario en el proceso, y su falla afecta tanto el funcionamiento de las bacterias acetogénicas como al proceso fermentativo como un todo. La acumulación de productos de fermentación en el digestor es debida principalmente a una inadecuada remoción de hidrógeno y acetato. Por ejemplo, una elevada carga orgánica en el reactor incrementa la producción de hidrógeno y AGV más allá de la capacidad de las metanogénicas para su consumo, resultando en la acumulación de AGV, disminuyendo el pH del medio e inhibiendo la actividad de las bacterias metanogénicas (Boe, 2006).

3. Parámetros que influyen sobre la DA

Durante el proceso de digestión anaeróbica se debe tener en cuenta que los microorganismos anaeróbicos, especialmente los metanogénicos, son altamente susceptibles a los cambios en las condiciones ambientales (Gerardi, 2003; Khanal, 2008). La alta vulnerabilidad de estos microorganismos, así como su extremadamente baja velocidad de crecimiento, que puede variar de acuerdo a la temperatura desde unos pocos días en régimen mesofílico hasta aproximadamente 50 días trabajando a 10°C (Gerardi, 2003), hace que las condiciones de operación deban monitorearse periódicamente y mantenerse en sus valores óptimos para asegurar las máximas velocidades de producción de metano. Algunas de estas condiciones son la temperatura del proceso, la concentración de nutrientes y minerales trazas, el valor de pH, la alcalinidad, el tipo y calidad del sustrato, además de algunos compuestos tóxicos, que pueden ingresar al reactor con la alimentación o bien pueden producirse dentro del reactor a través de la degradación del sustrato tales como los AGV o la concentración de amoníaco (Boe, 2006; Gerardi, 2003; Kangle et al., 2012; Khanal, 2008).

3.1. Temperatura

El proceso anaeróbico, más que cualquier otro proceso biológico es extremadamente dependiente de la temperatura, principalmente porque afecta la actividad biológica, en especial la actividad enzimática. Si bien las bacterias metanogénicas son especialmente susceptibles a los cambios en la temperatura, las bacterias formadoras de ácidos también pueden verse afectadas (Gerardi, 2003; Khanal, 2008; Shuler y Kargi, 1992).

En el sistema anaeróbico, existen tres rangos óptimos de temperatura para el crecimiento de las bacterias metanogénicas. De acuerdo a esto, las bacterias se clasifican en psicrófilas, mesófilas y termófilas, presentando un rango óptimo de crecimiento entre 5-15°C para las primeras, de 35-40°C para las mesófilas y de alrededor de 55°C para las termófilas, decreciendo la velocidades cuando se trabaja entre medio de estos rangos de temperaturas óptimos tal como se observa en la Figura II.2 (Donoso-Bravo et al., 2009; Kangle et al., 2012; Khanal, 2008; Sanchez et al., 2001). La temperatura de trabajo óptima puede variar, pero es especialmente importante mantener la misma en un valor constante a lo largo del proceso, a fin de maximizar la producción de biogás y evitar el desequilibrio del sistema, lo cual podría afectar toda la actividad biológica, inhibiendo por ejemplo la actividad de algunas bacterias anaeróbicas, especialmente las metanogénicas (Gerardi, 2003).

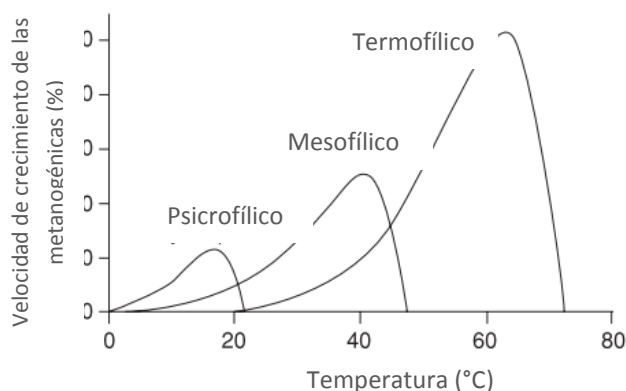


Figura II.2: Velocidad relativa de crecimiento de las bacterias metanogénicas psicofílicas, mesofílicas y termofílicas.

Fuente: Khanal, 2008

La temperatura del digestor influye directamente y en forma proporcional sobre la velocidad de degradación anaeróbica así como sobre la producción de metano (Donoso-Bravo et al., 2009; Gerardi, 2003). En función de esto en el rango termofílico la actividad resulta entre 25 a 50% mayor que en el rango mesofílico, por lo cual, el tiempo de retención será menor, lo que influye directamente sobre el tamaño del digestor. Otra de las ventajas que se obtienen al trabajar en este rango de temperatura es una mayor eficacia de destrucción de patógenos y virus que puedan estar presentes en los residuos. Sin embargo, adicionalmente a un mayor costo de operación, surgen problemas relacionados con cuestiones microbiológicas específicas, tales como el limitado número de bacterias termofílicas, un crecimiento lento y además experimentan una elevada velocidad de mortandad, lo que reduce la eficiencia neta en aproximadamente 50% con respecto al rango mesofílico, afectando tanto el arranque del proceso (start-up) como su estabilidad, haciendo al mismo más susceptible a las variaciones de carga, y a los cambios de sustrato y/o toxicidad (Campos Pozuelo, 2001; Carneiro, 2005; Khanal, 2008; Monnet, 2003).

3.2. Sólidos totales

Los sólidos totales (ST) corresponden a la fracción sólida de materia orgánica a degradar. Se pueden diferenciar tres rangos: digestión anaeróbica húmeda, corresponde a un rango de ST entre 4 y 10%, DA semihúmeda o semiseca con un contenido en ST entre 15 y 20% y DA seca con un contenido en ST que puede variar entre 22 y 40%. Esta variable permite definir el volumen del digestor, ya que está directamente relacionado con la cantidad de agua a agregar, por lo tanto a menores valores de ST mayor será el volumen de digestor a utilizar para tratar la misma cantidad de sustrato (Monnet, 2003; Riquelme, 2009).

3.3. Sólidos volátiles

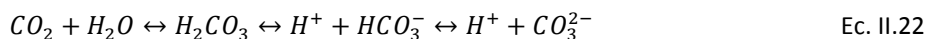
Los sólidos volátiles (SV) dan una indicación de la materia orgánica contenida en los residuos. Este parámetro es obtenido a través de la combustión de los residuos y es medida como la diferencia entre el

contenido en sólidos totales y el contenido en cenizas. Aquellos residuos que poseen un elevado contenido en SV y baja cantidad de materia no biodegradable son más adecuados para la DA (Kangle et al., 2012), ya que corresponden a los SV que teóricamente serán convertidos a metano (Varnero Moreno, 2011). De los ST, entre un 70 y un 90% corresponden a SV, aunque depende fuertemente del sustrato (Monnet, 2003; Riquelme, 2009).

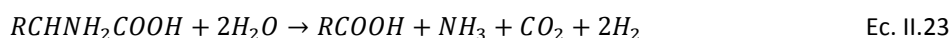
3.4. Alcalinidad y pH

Otro de los factores que afectan la performance del proceso son los cambios en los valores de pH, siendo los microorganismos metanogénicos los más sensibles. El pH al igual que la temperatura influye sobre la actividad enzimática del digestor y por lo tanto sobre la performance del mismo; a valores de $\text{pH} > 5,0$ se favorece la actividad enzimática de las bacterias formadoras de ácido mientras que a valores de $\text{pH} < 6,2$ esta acción se inhibe completamente por parte de las bacterias metanogénicas (Gerardi, 2003). Según Kangle et al., (2012) y Khanal, (2008), los microorganismos acidogénicos se ven favorecidos a valores de pH entre 5,5 – 6,5 y los metanogénicas en el rango de pH 7,8-8,2. A fin de que ambos tipos de bacterias coexistan sin problemas de inhibición, se estable un rango combinado de pH que debe mantenerse entre 6,8 y 7,2 para asegurar una adecuada performance del proceso (Ceron et al., 2005; Gerardi, 2003; Khanal, 2008; Monnet, 2003). Es primordial mantener el pH dentro del reactor cercano a la neutralidad a fin de evitar problemas de inhibición de la etapa metanogénica ya que estas bacterias son significativamente más sensibles a los cambios de pH que las bacterias acidogénicas (Khanal, 2008; Sakar et al., 2009).

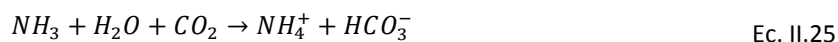
Cuando se hace referencia a la alcalinidad, se está indicando la capacidad o habilidad del sistema para resistir cambios bruscos en los valores de pH (Jantsch y Mattiasson, 2003; Sakar et al., 2009). La alcalinidad está presente en el sistema principalmente en la forma de bicarbonatos que están en equilibrio con el CO_2 a un pH dado. Cuando los compuestos orgánicos son degradados, el CO_2 es liberado produciendo ácido carbónico, alcalinidad bicarbonatada y alcalinidad carbonatada (Ec. II.22). (Gerardi, 2003; Riquelme, 2009).



Al mismo tiempo cuando los aminoácidos y proteínas son degradados se libera amoníaco (NH_3), además de dióxido de carbono (Ec. II.23). La liberación del amoníaco resulta en la producción de iones amonio los que se encuentran en equilibrio químico a un determinado valor de pH del medio, tal como se muestra en la Ec. II.24.



El amonio disuelto en agua reacciona con el dióxido de carbono presente en el medio para producir bicarbonato de amonio que contribuye a la alcalinidad (Ec. II.25).



Durante la digestión anaeróbica los factores que influyen sobre el pH son los ácidos carbónicos y los AGV. El pH en un digestor anaeróbico inicialmente disminuirá con la producción de ácidos volátiles; sin embargo, a medida que las bacterias formadoras de metano consumen dichos ácidos, la alcalinidad es producida, el pH del digestor aumenta y luego se estabiliza. Una medida de la estabilidad del digestor es la concentración de la alcalinidad; un decrecimiento por debajo de los valores óptimos es considerado una indicación de posible falla en el digestor. La disminución de la alcalinidad puede ser causada principalmente por acumulación de ácidos orgánicos, como resultado de que las bacterias metanogénicas no son capaces de convertir los ácidos en metano, como consecuencia de una baja concentración de estas o por algún compuesto presente en el digestor que inhiba su actividad. (Ceron et al., 2005; Gerardi, 2003; Lahav y Morgan, 2004).

3. 4. 1. Determinación de la alcalinidad en sistemas de DA

La determinación de la alcalinidad establecido por los métodos convencionales (APHA, 1999), corresponde a la titulación de la muestra con un ácido débil hasta pH 4,3. Sin embargo, de acuerdo a Jantsch y Mattiasson, (2003) la alcalinidad mediada por este método refleja tanto la alcalinidad debida a los bicarbonatos como la de los AGV, siendo este último no utilizable para compensar los cambios de pH. A fin de evitar la inclusión de los AGV en la determinación de la alcalinidad del sistema, Jenkins et al., (1983) proponen un nuevo método para determinar verdadera alcalinidad bicarbonatada en muestras de digestión anaeróbica, realizando la titulación de la muestra a pH 5,75 en lugar de a 4,3 como propone el método APHA. Más tarde Ripley et al., (1986) utiliza la información anterior y define tres parámetros que caracterizan a un sistema anaeróbico; estos son la alcalinidad parcial (AP) como la alcalinidad debida a los bicarbonatos, la alcalinidad intermedia (AI) como una alcalinidad debida a los AGV a y la alcalinidad total (AT) como suma de las anteriores. Para la determinación de estos valores de alcalinidad el método propuesto comprende una primera titulación de la muestra a pH 5,75 a fin de determinar la AP y una segunda titulación a pH 4,3 para determinar la AT, la alcalinidad intermedia puede ser determinada a partir de los valores anteriores como diferencia entre ellas. A partir de dichos valores se puede definir un nuevo parámetro conocido como relación de alcalinidad (RA= AI/AP) obtenido como una combinación de alcalinidades intermedia y parcial. La RA puede ser utilizado como indicador de la estabilidad del sistema, valores mayores de 0.3 han sido indicados por Ripley et al., (1986) como valor límite a partir del cual se puede producir inestabilidad al trabajar con estiércoles de gallina. Por otro lado, Molina et al., (2009) reporta una cierta flexibilidad en el valor de la RA cuando se trabaja a con alcalinidades totales mayores de 3000 mg CaCO₃/L.

La razón para realizar las titulaciones a estos dos punto de pH corresponde a que a pH 5.75 el 78% de los bicarbonatos se encuentran protonados, como consecuencia de su valor de $pK_a=6,3$ (25°C), mientras que a pH 4,3 el 99% se encuentra presente como dióxido de carbono (de acuerdo al equilibrio ácido base). Por su parte los AGV presentan valores de pK_a entre 4,7 y 4,9, por lo cual a pH 5,75 sólo el 10% de los AGV se encuentran en su forma protonada, mientras que este valor aumenta a 76% a valores de pH 4,3 (Björnsson et al., 2001; Jantsch y Mattiasson, 2003; Jenkins et al., 1983; Ripley et al., 1986; Voß et al., 2009). En función de esta información los cambios en la concentración de ácidos tendrá un fuerte efecto sobre el valor de la AT, pero influirá muy poco sobre la AP y por lo tanto este último es un parámetro más útil para monitorear el proceso de DA que la AT.

3.5. Nutrientes

Como en cualquier otro proceso biológico para la síntesis de la biomasa se requiere de la presencia tanto de macronutrientes (nitrógeno y fósforo), los cuales son requeridos por las bacterias en grandes cantidades, como micronutrientes (minerales trazas) (Chynoweth et al., 1999; Gerardi, 2003; Khanal, 2008). En comparación con el proceso aeróbico, la cantidad de nutrientes necesarios es mucho menor siendo la razón la menor producción de biomasa. El carbono constituye la fuente de energía, mientras que el nitrógeno y el fosforo son necesarios para mantener una adecuada actividad bacteriana (Gerardi, 2003).

La cantidad de macronutrientes que deben estar disponibles en el reactor puede ser determinado en función de la cantidad de sustrato o en función de la demanda química de oxígeno (DQO) alimentada al reactor. Los requerimientos de nutrientes varían en función de la velocidades de la carga al digestor: un valor mínimo de DQO/N/P de 350:7:1 para altas cargas orgánicas (0,8-1,2 kg DQO/ SVS día) y de 1000:7:1 para cargas orgánicas menores (<0,5 0,8-1,2 kg DQO/SVS² día) fueron sugeridos por diversos autores (Gerardi, 2003; Khanal, 2008). Estos valores aseguran una relación C/N de al menos 25:1, valor que se encuentra dentro del rango sugerido 30:1 - 20:1 para una buena performance del digestor y una óptima producción de biogás (Gerardi, 2003; Varnero Moreno, 2011). Cuando se trabaja con valores de C/N por encima del óptimo resultará en una baja producción de biogás por periodos más prolongados como resultado de una baja multiplicación y desarrollo de bacterias debido a la falta de nitrógeno, el cual es consumido rápidamente. Por el otro lado, si se trabaja con valores de C/N por debajo del óptimo el resultado será la acumulación de amoníaco y la elevación del pH a valores por encima de 8.5, lo cual resultará tóxico para las bacterias metanogénicas (Carneiro, 2005; Gerardi, 2003; Monnet, 2003).

Cuando se tienen residuos cuya relación C/N no es la óptima es necesario compensar esta falta de nutrientes. Uno de los métodos que se puede emplear es agregar distintos tipos de químicos, tales como cloruro de amonio o urea que permitirán compensar la falta de nitrógeno, o sales fosfatadas si lo que se requiere compensar es la falta de fosforo (Gerardi, 2003). Otra de las posibilidades para

² SVS: sólidos volátiles suspendidos

compensar la falta de nutrientes es mediante el proceso de co-digestión, en el cual se tratan en forma conjunta distintos tipos de residuos con diferentes relaciones C/N. Los residuos ganaderos suelen presentar bajas relaciones C/N, dependiendo del tipo de animal. En los purines de cerdo, por ejemplo, la relación C/N es de aproximadamente 5/1 según indica Schnürer y Jarvis, (2010), mientras que Wu et al., (2010) reporta un rango de entre 6 y 8 dependiendo de la edad del animal, por lo cual exhibe problemas por exceso de nitrógeno más que por defecto. En el caso de los residuos de comida cuya relación de C/N puede variar entre 15 y 32/1 (Schnürer y Jarvis, 2010), el problema suele ser la deficiencia de nitrógeno (Campos Pozuelo, 2001; Carneiro, 2005; Monnet, 2003).

3. 5. 1. Micronutrientes

De acuerdo con (Gerardi, 2003), las bacterias metanogénicas poseen varios sistemas enzimáticos únicos, que requieren micronutrientes específicos como cobalto, hierro, níquel y sulfuros para que puedan convertir el acetato en metano y asegurar de esta manera una eficiente operación del reactor. En función del valor de DQO de la alimentación, los requerimientos de nutrientes son de 0,01% DQO para el cobalto, 0,2% para el hierro, 0,001% para el níquel y 0,2% para los sulfuros según reporta Gerardi, (2003).

3. 6. Compuesto tóxicos e inhibidores de la metanogénesis

El proceso de DA suele presentar problemas de inhibición ante la presencia de sustancias tóxicas en el sistema. Estas sustancias pueden entrar al digestor junto con la materia prima, o pueden ser el subproducto de la actividad metabólica de los microorganismos anaeróbicos. El amoníaco, los metales pesados, los compuestos halogenados, el cianuro, y los fenoles forman parte del primer grupo, mientras que el sulfuro, el amoníaco y los ácidos de cadena larga son parte del segundo grupo mencionado. No obstante, la magnitud de la toxicidad de la sustancia puede verse reducida mediante la aclimatación de la población de los microorganismos al tóxico y en otros casos, a bajas concentraciones pueden ser estimuladoras del proceso (Khanal, 2008; Varnero Moreno, 2011).

3. 6. 1. Nitrógeno Amoniacal

El amoníaco puede estar presente en los sustratos con los que se alimenta el reactor o ser producido durante la degradación biológica de compuestos tales como proteínas o urea (Sutaryo, 2012). En un reactor anaeróbico las dos formas predominantes de nitrógeno inorgánico son el amonio (NH_4^+) y el amoníaco libre (NH_3) (Appels et al., 2008). Si bien el amoníaco es esencial para el crecimiento microbiano, en elevadas concentraciones puede ocasionar la inhibición del proceso anaeróbico (Kayhanian, 1994). De acuerdo con Yenigün y Demirel, (2013), la inhibición del proceso no es sólo el resultado de la concentración de amonio y amoníaco en el reactor, sino también de las características del sustrato a ser digerido, del pH, de la temperatura, del tipo de inóculo utilizado así como de la configuración del reactor.

Con el término nitrógeno total amoniacal (NTA Ec. II.27) se hace referencia a la suma del ion amonio (NH_4^+) y del amoníaco libre (NH_3). Estas dos especies se encuentran en equilibrio químico y la concentración relativa de cada una depende del valor del pH y de la temperatura (Ec. II.26) (Khanal, 2008; Sutaryo, 2012; Varnero Moreno, 2011).



$$NTA \text{ (Nitrogeno Total Amonical)} = NH_4^+ + NH_3 \quad \text{Ec. II.27}$$

De todas las formas en las que se puede encontrar el nitrógeno, el amoníaco libre es la forma más tóxica para las bacterias metanogénicas, debido al hecho de que puede penetrar las membranas celulares causando desequilibrio de protones, y/o deficiencia de potasio (Appels et al., 2008; Chen et al., 2008; Khanal, 2008; Sutaryo, 2012; Yenigün y Demirel, 2013). De todos los microorganismos anaerobios, los metanogénicos son los menos tolerantes y los más propensos a detener su crecimiento debido a la inhibición por amoníaco. Según reporta Chen et al., (2008) durante el tratamiento de lodos granulares en reactores anaeróbicos, cuando las concentraciones de amoníaco se incrementaron hasta valores de 4.051-5.734 mg NH_3 -N/L, la población de bacterias acidogénicas apenas fueron afectadas mientras que la actividad de las bacterias metanogénica disminuyó en un 56,5%.

La concentración de amoníaco libre depende principalmente de tres parámetros: de la concentración total de nitrógeno amoniacal (NTA) en el reactor, de la temperatura y del pH. Un incremento en la temperatura tiene un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento microbiano pero también resulta en mayores concentraciones de amoníaco. Los reactores termofílicos son más susceptibles a la inhibición por nitrógeno amoniacal que los mesofílicos. Además con el incremento del pH se produce un incremento en la concentración de NH_3 ; a valor de pH neutral sólo el 0,5% del NTA se encuentra en su forma libre (Appels et al., 2008; Gerardi, 2003; Khanal, 2008; Varnero Moreno, 2011; Yenigün y Demirel, 2013). En el proceso de inhibición por amoníaco, otro de los factores que influye es la aclimatación de los microorganismos. En reactores no aclimatados, de acuerdo con Gerardi, (2003) y Khanal, (2008) concentraciones de amoníaco libre de entre 50 y 150 mg/L inhibieron completamente el proceso, no obstante reactores adaptados a elevadas concentraciones de amonio incrementaron su tolerancia. En este sentido, la concentración a la cual el amoníaco libre es tóxico para un sistema es incierta y depende de la configuración del mismo; Hansen et al., (1998) reporta que concentraciones de 1.500-2.500 mg/L resultan inhibitorias del proceso, pero mediante la adaptación del sistema se han conseguido tolerancias de hasta de 4.000 mg-N/L. Por otro lado, para los estiércoles bovinos, Angelidaki y Ahring, (1993) encontraron que concentraciones de 4.000 mg/L o mayores fueron inhibitorias del proceso termofílico, pero mediante la adaptación del medio se logran tolerancias del sistema hasta valores de 6.000 mg/L. Lo mismo reporta Yenigün y Demirel, (2013) para reactores mesofílicos, en los cuales concentraciones de NTA de 1.700-1.800mg/L fueron completamente inhibidores del proceso cuando se utilizaron inóculos no adaptados, aunque con aclimatación las concentraciones inhibitorias se incrementaron hasta valores

de 5.000 mg/L. Yenigün y Demirel, (2013) también reportan que el tratamiento de los residuos de porcinos presentan inhibición a partir de concentraciones de NTA de 3.075mg/L, mientras que para los lodos de depuradora dicho valor se incrementó a valores cercanos a 5.000 mg/L.

Si bien el sistema puede fallar debido a las elevadas concentraciones de amoníaco libre que podrían inhibir a las bacterias metanogénicas, Gerardi, (2003) indica que esta inhibición puede ser autocorregida dentro del mismo reactor. Esto es, si la formación de metano es inhibida, la concentración de AGV se incrementará, el pH del digestor bajará y el amoníaco libre se transformará en iones amonio, menos inhibidores, permitiendo al proceso recobrar su funcionamiento normal.

3. 6. 2. Sulfuros y sulfatos

Las bacterias necesitan sulfuros solubles, principalmente en la forma HS^- , como nutrientes para su crecimiento, aunque concentraciones elevadas tanto del ion HS^- como del sulfuro de hidrógeno disuelto pueden causar toxicidad en el proceso (Gerardi, 2003), principalmente en las bacterias metanogénicas. La inhibición por sulfuros ocurre en dos niveles, una inhibición primaria en donde en presencia de sulfatos, las bacterias metanogénicas compiten con las bacterias sulfato-reductoras por los mismos sustratos (acetato e hidrógeno, aunque estas últimas presentan ventajas tanto termodinámicas como cinéticas, y el resultado de esta competencia determina la proporción relativa de sulfuro de hidrógeno y metano en el biogás (Appels et al., 2008; Varnero Moreno, 2011). El segundo mecanismo de inhibición es debido a la toxicidad del sulfuro para los grupos bacterianos; en general las bacterias metanogénicas son más susceptibles que las acidogénicas y las acetogénicas. La forma más tóxica es la forma no ionizada (H_2S) que se ve favorecida a valores bajos de pH y de temperatura (Appels et al., 2008; Gerardi, 2003; Varnero Moreno, 2011). La toxicidad se debe a procesos de difusión libre a través de la membrana celular causando desnaturalización de las proteínas (Appels et al., 2008). Según Gerardi, (2003) concentraciones de 50 mg/L de sulfuros pueden resultar tóxicas para las bacterias metanogénicas si los microorganismos no están aclimatados, aunque Appels et al., (2008) reporta que puede producirse un proceso metanogénico estable con valores de hasta 150 mg/L de sulfuros.

3. 6. 3. Metales Pesados

Los cationes de los metales pesados tienen un efecto positivo sobre la actividad de enzimas y co-enzimas siempre que se encuentren en concentraciones bajas ya que de lo contrario pueden causar un efecto tóxico sobre los microorganismos.

Numerosos metales pesados pueden encontrarse en las aguas residuales y en los barros de depuradora, aunque la principal fuente de metales pesados en las aguas residuales urbanas son las industrias, las que son capaces de aportar hasta el 50% del contenido total de metal en los lodos de depuradora cuando estos efluentes son tratados en conjunto con los domiciliarios. Entre los contaminantes industriales que pueden encontrarse se incluyen zinc, cobre, cromo, níquel, cadmio y plomo. Mientras que entre las

fuentes domésticas que aportan metales pesados se encuentran principalmente la lixiviación de materiales de plomería (Cu y Pb), canaletas y tejados (Cu y Zn) y materiales galvanizados, el uso de detergentes que contienen Cd, Cu y Zn, y el uso de productos para el cuidado del cuerpo que contienen Zn (Appels et al., 2008).

Una característica distintiva de los metales pesados es que, a diferencia de muchas otras sustancias tóxicas, no son biodegradables y puede acumularse en el reactor hasta concentraciones potencialmente tóxicas (Chen et al., 2008). La toxicidad de los cationes aumenta con el peso molecular, por lo cual los metales pesados son los que provocan mayor toxicidad a menor concentración. El orden de toxicidad de los metales pesados es $\text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cr (IV)} \sim \text{Cr (III)} > \text{Pb} > \text{Zn}$. Sin embargo, si la introducción del metal en el reactor se produce de forma gradual, los microorganismos podrán aclimatarse y el efecto tóxico disminuirá. Las formas solubles de los metales presentan mayores problemas para el proceso que las formas insolubles. Cuando en el sistema coexisten tanto los metales como los sulfuros, la toxicidad de los metales disminuye mediante la formación de sulfuros de metal insolubles (con excepción de cromo), los cuales precipitan, pudiendo llegar a tolerarse elevadas concentraciones (Khanal, 2008; Varnero Moreno, 2011).

3. 6. 4. Ácidos grasos de cadena corta

Durante la degradación anaeróbica, la materia orgánica compleja es hidrolizada y fermentada en compuestos de bajo peso molecular, incluyendo ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) también denominados ácidos grasos volátiles (AGV). Entre los AGV se incluyen principalmente al ácido acético, propiónico y butírico y en menores cantidades ácidos isobutírico, valérico, isovalérico y caproico. Al igual que el sulfuro y el amoníaco, las formas no disociadas de la AGV son las responsables de la inhibición del proceso, debido a que pueden fluir libremente a través de la membrana celular donde se disocian, provocando la reducción del valor de pH y una interrupción de la homeostasis (Khanal, 2008). La concentración de estos ácidos o productos intermedios de la DA es uno de los parámetros que más eficazmente pueden dar una indicación de la evolución y salud del proceso; de hecho, es uno de los parámetros más utilizados en el control debido a su rápida respuesta ante variaciones del sistema (Khanal, 2008; Varnero Moreno, 2011).

En un sistema anaeróbico sano, la concentración de los AGV en el efluente es relativamente baja, normalmente se encuentra en el rango de 50-250 mg HAC/L. Las elevadas concentraciones de AGV son el resultado de la acumulación debido a desequilibrios en el proceso que pueden ser causados por variación en la temperatura, sobrecarga orgánica, presencia de compuestos tóxicos, entre otros. Elevadas concentraciones de AGV son capaces de inhibir la etapa metanogénica, dando como resultado, la acumulación de los ácidos y la caída en el valor de pH hasta valores tan bajos que podrían inhibir tanto la hidrólisis como la acetogénesis (Khanal, 2008; Siegert y Banks, 2005). Según reporta Siegert y Banks, (2005); incluso cuando el valor de pH del proceso es el óptimo, la acumulación de los AGV a

valores mayores a 10.000 mg/L puede contribuir a reducir la velocidad de la hidrólisis de los sustratos o incluso inhibirla completamente.

3. 6. 5. Ácidos grasos de cadena larga

Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) son formados durante la degradación de grasas y lípidos y son posteriormente reducidos a acetato e hidrógeno (Appels et al., 2008). Los AGCL corresponden a los ácidos que contienen cadenas de carbono de entre 8 y 18 unidades; se incluyen dentro de este grupo al ácido cáprico, caprílico, láurico, mirístico y ácido oleico. De todos, el ácido láurico es el más tóxico, y la combinación de estos ácidos produce un efecto sinérgico, pudiendo causar toxicidad en digestores anaeróbicos a concentraciones mayores a 500 g/L de AGCL (Gerardi, 2003).

La inhibición es causada por la adsorción de los AGCL en la pared celular de las bacterias, interfiriendo con el transporte de nutrientes y con las funciones de protección de las células. El efecto tóxico de los AGCL es del tipo permanente, es decir, el crecimiento de los microorganismos no se recupera cuando las concentraciones son reducidas por dilución a valores no tóxicos (Appels et al., 2008; Boe, 2006).

Las bacterias metanogénicas acetoclásticas son afectados en mayor grado por la AGCL que las metanogénicas hidrogenotróficas, mientras que las bacterias termófilas parecen ser más sensibles a la toxicidad en comparación con las mesófilas. Según Appels et al., (2008) y Chen et al., (2008) la razón para esta diferencia podría estar relacionado con la composición de la membrana celular, que es diferente para las dos especies.

3. 7. Materia prima

La eficiencia de producción de biogás está directamente relacionada con el tipo de sustrato y su composición (Boe, 2006). Las diversas materias primas que pueden ser tratadas mediante el proceso de DA corresponde a residuos orgánicos de origen vegetal, animal, agroindustrial, forestal y doméstico entre otros, los cuales contienen en mayor o menor grado materia orgánica biodegradable. En la Tabla II. 6, se listan algunos residuos de acuerdo al origen de los mismos.

Tabla II.6: Residuos orgánicos de diversos orígenes. (Varnero Moreno, 2011)

Origen	Tipos
Residuos de origen Animal	Estiércol, orina, guano, camas, residuos de mataderos (sangre y otros), residuos de pescados.
Residuos de origen vegetal	Malezas, rastrojos de cosechas, pajas, forraje en mal estado.
Residuos de origen humano	Residuos domesticos, aguas cloacales
Residuos agroindustriales	Salvado de arroz, orujos, melazas, residuos de semillas, suero de leche
Residuos forestales	Hojas, vástagos, ramas y cortezas.
Residuos de cultivos acuáticos algas	Algas marinas, jacintos y malezas acuáticas

Normalmente las sustancias orgánicas como los estiércoles y lodos cloacales presentan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El estiércol en general, contiene además, una elevada cantidad de agua en su composición así como una elevada fracción de compuestos recalcitrantes tales como lignina no degradable anaeróbicamente y carbohidratos de lenta degradación, por lo tanto la producción de metano por unidad de SV es menor que en sustratos de más fácil degradación tales como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbano. La producción de metano a partir de estiércoles frescos según informa Moller et al., (2004) se encuentra en el rango 100-400 L CH₄/kg SV, presentando los estiércoles de cerdo un mayor rendimiento de producción de metano que los estiércoles de vaca, principalmente debido a un mayor contenido en proteínas y lípidos y menos lignina y carbohidratos de baja degradabilidad, tal como se observa en la Figura II.3 (Boe, 2006; Moller et al., 2004). Por lo cual, el rendimiento teórico del proceso de DA variará en función del contenido de carbohidratos, proteínas, y lípidos de los sustratos (G. Esposito et al., 2012; Vavilin et al., 2008; Zhou et al., 2012).

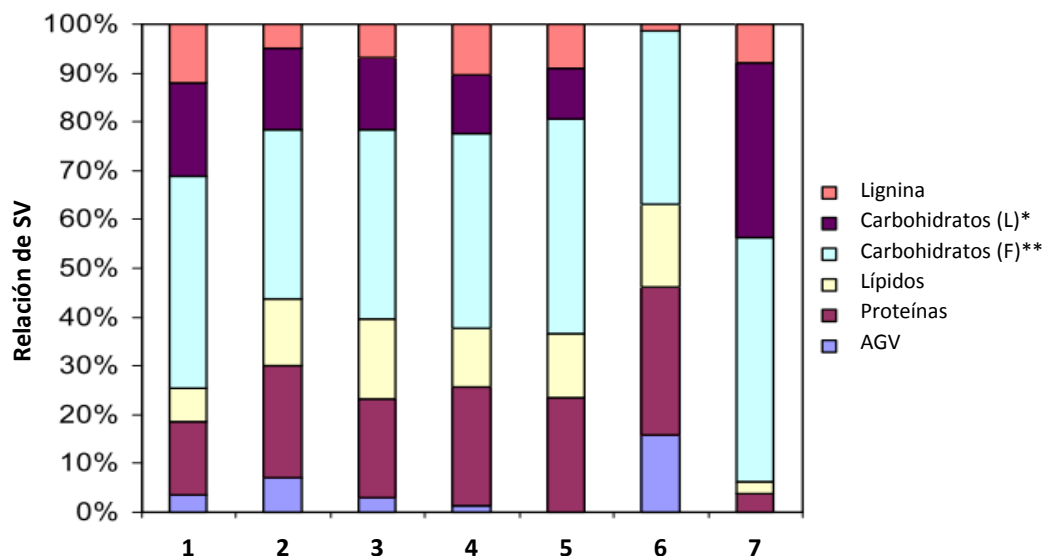


Figura II.3: Composición promedio en SV de 1) estiércol de ganado fresco, 2) estiércol de cerdos de engorde, 3) estiércoles de cerdas, 4) fracción sólida de los estiércoles de cerdo centrifugados, 5) la fracción sólida obtenida de la precipitación química de los estiércoles, 6) fracción líquida tratada previamente con una centrifuga de decantación y 7) el trigo de la paja.

*Lentamente degradables

**Fácilmente degradables

Fuente: Moller et al., (2004)

3. 7. 1. Lípidos o grasas

Los lípidos o grasas, en su forma líquida (aceites) o sólida (grasas), proporcionan un elevado rendimiento de producción de biogás, pero requieren un tiempo de retención elevado debido a su baja biodegradabilidad. Están presentes comúnmente en los desechos de alimentos y en algunas aguas residuales industriales, tales como las producidas por los mataderos, lecherías, aceiteras o refinerías de grasa (G. Esposito et al., 2012; Neves et al., 2009; Ruiz-Espinoza et al., 2012). Sin embargo, Neves et al., (2009) reportaron problemas de inhibición de las bacterias metanogénicas debido a elevadas concentraciones de AGCL, tanto en reactores batch como continuos al tratar este tipo de sustratos.

3. 7. 2. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son los principales componentes de los residuos orgánicos, los cuales son fácil y rápidamente convertidos durante la etapa hidrolítica a azúcares simples y luego a AGV (Miron et al., 2000). Dentro de esta categoría se incluye a los desechos de las fábricas relacionadas con la agricultura, residuos de alimentos y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) proveniente de hogares y mercados (Zhou et al., 2012). La degradación anaeróbica de estos residuos depende fuertemente de las etapas acidogénica y metanogénica. En particular, si el proceso de formación de ácidos es más rápido que su consumo por parte de las bacterias metanogénica, los AGV se acumularan en el reactor causando una caída progresiva del pH, generando estrés en el proceso y la posterior inhibición de la actividad metanogénica (G. Esposito et al., 2012; Siegert y Banks, 2005).

3. 7. 3. Proteínas

Los residuos ricos en proteínas y en consecuencia con un alto contenido de nitrógeno son producidos principalmente por las fábricas de procesamiento de carne, mataderos y granjas (purines de animales y estiércol), presentando un elevado contenido en materia orgánica, alta demanda biológica de oxígeno (DBO), pero baja relación C/N. Por lo cual son propensos a presentar problemas de inhibición por amoníaco (G. Esposito et al., 2012).

3. 7. 4. Lignina

Las sustancias con alto contenido de lignina no son directamente aprovechables en la DA. La baja susceptibilidad de los materiales lignocelulósicos a la conversión en biogás es el resultado de su composición y estructura. La estructura lignocelulósica es la matriz compleja y rígida de las células vegetales, resistente al ataque enzimático, debido a la estrecha asociación entre la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Estas dos últimas a diferencia de la lignina son hidratos de carbono compuestos principalmente de hexosas y pentosas que pueden ser degradados en la DA (Bruni et al., 2010). Con el fin de facilitar el acceso de las bacterias metanogénicas a la celulosa y hemicelulosa es necesario aplicar tratamientos de tipo físicos, químicos y/o biológicos (Boe, 2006; Bruni et al., 2010; Moller et al., 2004). Un estudio sobre el potencial de producción de metano en condiciones de DA del residuo de la producción del hongo *Gymnopilus Pampeanus*, que se consume en la Argentina y Uruguay demostró que el proceso fúngico facilitó la degradación de los compuestos lignocelulósicos del sustrato utilizado (aserrín de álamo), promoviendo la producción de metano (Córdoba et al., 2015, en revisión).

3. 7. 5. Composición promedio de los sustratos

La Figura II.4: muestra la composición química promedio de los tres sustratos (PC, SL y FORSU) reportada por diferentes bibliografías.

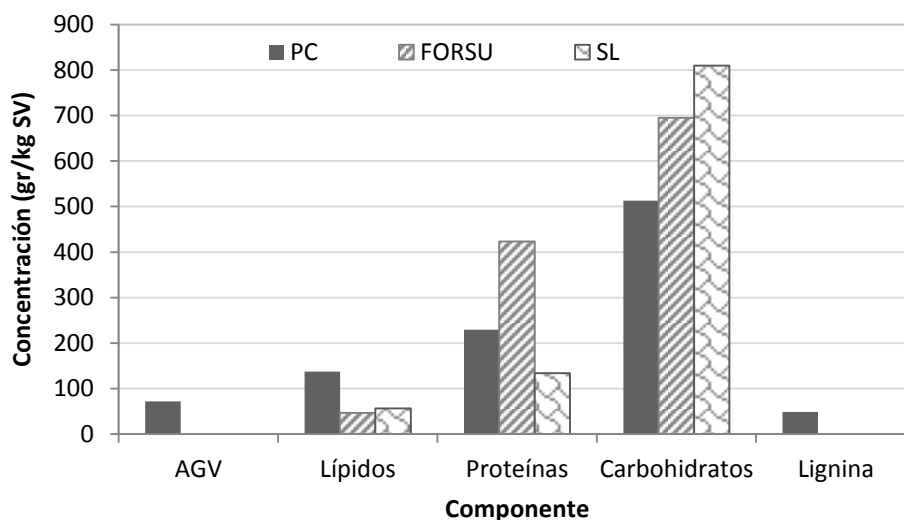


Figura II.4: Composición promedio de PC (Moller et al., 2004), FORSU (Nielfa et al., 2015) y SL (Labatut et al., 2011).

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con Nielfa et al., (2015), los FORSU presentan un elevado contenido de fibra (3513 gr fibra por kg SV) además de 47 gr lípidos, 695 gr de carbohidratos, 423 gr proteínas, según este autor, este elevado contenido en fibras hace que el proceso anaeróbico presente una etapa inicial lenta. Por su parte, la composición del SL es reportada por Labatut et al., (2011), los cuales indican que está conformado por 134 gr proteínas, 57 gr de lípidos y 809 gr de azúcares, almidón y pectina expresados por kg SV, es decir se encuentra compuesto principalmente por azúcares de fácil degradación. El PC, a diferencia de los demás sustratos presenta en su composición tanto AGV como lignina, los primeros son el resultado de la degradación de la alimentación dentro del tracto animal.

3.8. Inóculo

Durante el inicio de un proceso de DA en un reactor tipo batch es necesario añadir junto con la alimentación, en el caso de que la misma no los contenga, un componente que aporte suficiente cantidad de microorganismos como para iniciar la reacción de descomposición de la materia orgánica. Estas sustancias, denominadas inóculos, deben ser capaces tanto de promover la hidrólisis y degradación de la materia orgánica así como de promover la metanogénesis. En este contexto, el tipo de inóculo a utilizar es un factor decisivo en la eficiencia del proceso (Feng et al., 2013; Forster-Carneiro et al., 2007; Gerardi, 2003; Mateescu y Constantinescu, 2011).

Se debe analizar la utilización de uno u otro tipo de inóculo según la naturaleza del sustrato ya que diferentes tipos de inóculos actúan en mayor o en menor medida mejorando la descomposición de la biomasa en función de su contenido microbiano. Dado que no todas las bacterias pueden utilizar los mismos sustratos, es necesario contar no solo con la presencia de una gran cantidad de bacterias sino además con una gran diversidad de ellas. A fin de que el proceso anaeróbico sea exitoso, el tipo, calidad

y cantidad de inóculo debe ser analizado previo a su utilización en un digestor. El inóculo influye principalmente sobre la cinética de producción de biogás y sobre la cantidad de metano a producir (Mateescu y Constantinescu, 2011).

Entre los inóculos más utilizados para el proceso anaeróbico se puede mencionar a los barros de plantas depuradoras, efluentes de digestores anaeróbicos en funcionamiento, o materiales de origen animal, como por ejemplo rumen o estiércoles, que contienen una gran carga bacteriana principalmente bacterias metanogénicas. En este sentido varios autores han analizado la influencia de diferentes tipos de inóculos sobre diferentes sustratos de interés. Wakadikar et al., (2012) analizaron la influencia de los barros de plantas depuradoras y de lixiviados de rellenos sanitarios sobre la DA de diferentes tipos de residuos orgánicos (parte orgánica de los residuos sólidos municipales, residuos de comida, residuos vegetales y residuos celulósicos) encontrando que la mejor performance del proceso fue alcanzada cuando se utilizó como inóculo a los lixiviados para todos los sustratos analizados. Por su parte, Forster-Carneiro et al., (2007) estudiaron la DA termofílica de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos utilizando diferentes tipos de inóculos entre los que se encontraron silaje de maíz, mezcla digerida de residuos de restaurante, excremento de bovinos, excremento de cerdo, barro de depuradora y una mezcla de estos últimos al 50%. El resultado fue que los lodos de depuradora resultaron el mejor inóculo en términos de producción de metano, alcanzando una producción de 0,53 L/g SV, aunque los estiércoles de cerdo y la mezcla de ambos (estiércol de cerdo y lodos) también mostraron buenos resultados (0,44 y 0,42 L/g SV respectivamente). Pandey et al., (2011) investigaron el efecto que tres tipos de inóculos (lodos granulares provenientes de un reactor anaeróbico tratando almidón de papas, barros no granulares de un digestor anaeróbico de una planta de tratamiento de aguas domésticas y el sobrenadante de una laguna anaeróbica de un tambo) tienen sobre el inicio del proceso anaeróbico de las aguas residuales de tambos, encontrando que los lodos granulares mostraron la mejor performance. Por su parte, Hu y Yu, (2006) analizaron la influencia del rumen sobre la DA de las totoras, encontrando que este es un inóculo resulta adecuado para degradar sustratos de tipo lignocelulósicos obteniendo una adecuada producción de AGV y buena producción de metano. En función de estos resultados, se puede observar que no es posible generalizar sobre un inóculo particular, sino más bien, resulta necesario encontrar aquel inóculo que interaccione adecuadamente con un sustrato en particular. Un análisis más detallado de la influencia del origen del inóculo sobre la degradación de PC será realizada en el Capítulo IV.

Además del tipo de inóculo, la cantidad del mismo es otro factor que influye fuertemente sobre la performance del proceso. En este sentido, varios han sido los estudios que han analizado el efecto de distintas proporciones de inóculo en la alimentación. Lopes et al., (2004) reporta la influencia de la aplicación de diferentes concentraciones de rumen bovino utilizado como inóculo en la digestión de RSU indicando una reducción del tiempo de digestión de 49 %, y un incremento notable de la producción de CH₄ (0,23 L CH₄/g SVT) cuando se utiliza 15% de inóculo en comparación con la producción de metano en el caso de no utilizar inóculo (0.01 L CH₄/g SVT). Otro estudio realizado por Forster-Carneiro et al.,

(2008) muestra que la utilización de barros provenientes de los digestores mesofílicos de las plantas depuradoras ayuda a optimizar la etapa inicial de crecimiento microbiano, la cual corresponde a una etapa crítica en el proceso; el análisis de la cantidad de inóculo indicó que la mejor performance se alcanza cuando se utiliza 30% de inóculo en lugar de 20%, alcanzando una producción de metano de 0,49 L CH₄/gr SV. En el Capítulo V, será realizado un análisis comparativo de la influencia de la cantidad del inóculo sobre el PC, SL y FORSU.

4. Co-digestión

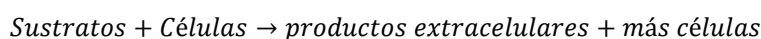
La coexistencia de diversos tipos de residuos en una misma área geográfica posibilita una gestión integrada de los mismos, obteniendo beneficios ambientales tales como el ahorro de energía, el reciclado de nutrientes dentro de la agricultura y la reducción de las emisiones de GEIs (Pagés-Díaz et al., 2014). Además este tipo de gestión permitirá mejorar el tratamiento y disminuir costos de transporte, aunque puede resultar más complicado al intervenir diversos generadores de residuos, que incluso procedan de sectores productivos diferentes (Campos Pozuelo, 2001; Venkateswara Rao y Baral, 2011).

La co-digestión se define como el tratamiento anaeróbico de una mezcla de dos o más tipos de residuos diferentes con el objetivo de optimizar la eficiencia del proceso de DA y compensar la carencia de nutrientes así como los requerimientos de humedad de la alimentación. Por lo cual resulta fundamental establecer la concentración adecuada de cada co-sustrato con el objetivo de maximizar la producción de metano y evitar efectos inhibitorios (Hublin y Zelic, 2013; Mata-Alvarez et al., 2000; Pagés-Díaz et al., 2014).

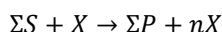
Aquellos sustratos capaces de generar más biogás por unidad de masa suelen ser co-digeridos con un sustrato base o sustrato principal a fin de maximizar la producción de biogás por unidad de reactor (Atandi y Rahman, 2012). A pesar de que cualquier tipo de materia orgánica biodegradable suele ser utilizada como alimentación para el proceso de digestión anaeróbica, el proceso tiende a fallar sin la adición de nutrientes externos y el agregado de agentes buffer. La co-digestión de estiércoles de animales o barros de depuradora como base suele ser una manera efectiva de mejorar la capacidad buffer del sistema y alcanzar un proceso estable (Atandi y Rahman, 2012; Li et al., 2009). Sin embargo, hay un límite en la cantidad y calidad de los sustratos a co-digerir debido principalmente a que puede generar problemas de flotación, inhibición del proceso e inestabilidad de la operación. Con la finalidad de evitar estos problemas, la cantidad de cada co-sustrato debe ser optimizada teniendo en cuenta la producción final de metano (Atandi y Rahman, 2012). El proceso de co-digestión será analizado en mayor detalle en el Capítulo VI.

5. Cinética de la producción de metano

Para los microorganismos, el crecimiento es su respuesta esencial a las condiciones ambientales en la que se encuentran. El crecimiento es tanto el resultado de la multiplicación como del cambio en el tamaño celular. En un medio adecuado, los microorganismos utilizan los nutrientes y los convierten en componentes biológicos; parte son utilizados para la producción de energía, y parte para la biosíntesis y formación de productos. Como resultado, la masa microbiana se incrementa con el tiempo tal como describe la (Ec. II.28) (Shuler y Kargi, 1992).



Ec. II.28



El crecimiento microbiano es un tipo de reacción autocatalítica, donde su velocidad de crecimiento (μ) está directamente relacionada con la concentración celular y la reproducción celular es el resultado de la reacción (Shuler y Kargi, 1992).

El proceso de DA es esencialmente una fermentación bacteriana (Tosun et al., 2004), donde cada especie involucrada puede tener diferentes velocidades de crecimiento específica (μ) y por consiguiente la proporción relativa de cada una puede variar con el tiempo. Por lo tanto, el análisis de la cinética refleja el crecimiento de las diferentes especies bacterianas involucradas (Llabrés-Luengo y Mata-Alvarez, 1987). A fin de poder entender con mayor profundidad el proceso es necesario conocer cuáles son las diferentes etapas involucradas en el crecimiento microbiano.

5.1. Fases de crecimiento microbiano en reactores tipo batch

Cuando un medio de cultivo rico en nutrientes es inoculado, los organismos en forma selectiva toman estos nutrientes con la finalidad de convertirlos en biomasa. El crecimiento de la biomasa sigue una curva de típica en siete fases bien diferenciadas: (1) fase de latencia o fase de retardo, (2) fase de aceleración, (3) fase de crecimiento exponencial o logarítmica, (4) fase de desaceleración, (4) fase estacionaria, (5) fase de transición y (5) la fase de muerte, tal como se observa en la Figura II.5 (Rodríguez, 2010; Shuler y Kargi, 1992).

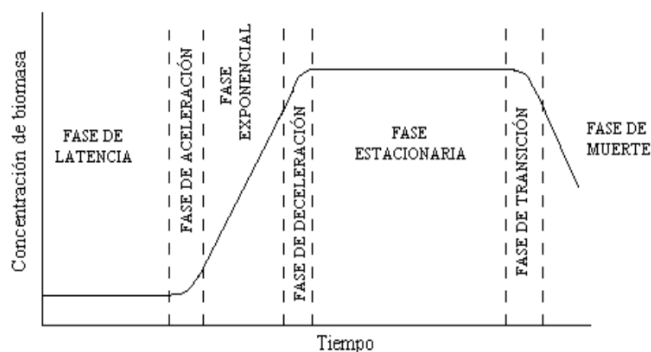


Figura II.5: Fases de crecimiento microbiano

Fuente: Rodríguez, (2010)

1. Fase de retardo o fase de latencia

Esta fase tiene lugar inmediatamente después de la inoculación y corresponde a un periodo de adaptación de las células al nuevo ambiente, en donde los microorganismos reorganizan su estructura molecular a fin de poder tomar ventaja del nuevo ambiente y comenzar con la fase exponencial de crecimiento. Durante esta fase, las bacterias no se replican, sino que se adaptan; de acuerdo a esto la velocidad específica de crecimiento es cero ($\mu=0$) (Buchanan et al., 1997; Shuler y Kargi, 1992; Swinnen et al., 2004; Yates y Smotzer, 2007).

Una fase de latencia larga puede presentarse en los casos de baja concentración de nutrientes. Otro de los factores que afectan la extensión de este periodo es la edad del inóculo, en referencia al tiempo en que ha sido mantenido en condiciones batch previo a su utilización. A fin de minimizar la duración de la fase de retardo, es recomendable que las células del inóculo sean jóvenes y activas y que hayan sido adaptadas al medio de crecimiento y acondicionadas antes de la inoculación. Otro de los factores que influye es la cantidad de inóculo a utilizar (Shuler y Kargi, 1992). Por otro lado, según reporta Swinnen et al., (2004) cambios ambientales repentinos durante la fase de crecimiento pueden resultar también en un retraso en la etapa de crecimiento o en una fase de retardo intermedia. El mecanismo por el cual ocurren ambas fases de retardo (inicial e intermedia) es esencialmente el mismo, en ambos casos las células experimentan una transición de un ambiente a otro.

2. Fase de aceleración

Corresponde a un periodo de transición que se presenta entre las fases de latencia y la fase exponencial, en la que la concentración microbiana aumenta ampliamente en un periodo de tiempo extremadamente corto (Rodríguez, 2010).

3. Fase de crecimiento exponencial

Esta etapa se denomina fase de crecimiento exponencial o fase de crecimiento logarítmico. Durante esta fase, las células ya adaptadas al nuevo ambiente, pueden multiplicarse rápidamente,

incrementando la masa celular y la densidad del número de células exponencialmente con el tiempo. Corresponde a un periodo de crecimiento balanceado en el cual todos los componentes de las células crecen a la misma velocidad, es decir, la composición promedio de las células se mantiene aproximadamente constante, mientras que la velocidad de crecimiento específica μ es constante e independiente de la concentración de nutrientes (Buchanan et al., 1997; Shuler y Kargi, 1992). Es en esta etapa donde las fuentes de carbono son utilizadas y los productos son formados (Najafpour, 2007).

4. Fase de desaceleración

La fase de desaceleración posee una existencia formal como periodo de transición entre la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. Durante esta fase el crecimiento microbiano disminuye debido al agotamiento de algún recurso del medio tal como la fuente de carbono o algún nutriente esencial, o debido a la acumulación de componentes tóxicos generados como sub-producto del crecimiento de los microorganismos. Estos cambios ocurren en un periodo muy corto de tiempo, resultando en un crecimiento desbalanceado en donde cambia el tamaño y la composición de las células. Durante el periodo de crecimiento exponencial el sistema de control metabólico celular es fijado para alcanzar las máximas velocidades de reproducción, mientras que durante la fase de desaceleración el estrés inducido causa una reestructuración de las células con el objetivo final de incrementare las perspectivas de supervivencia celular a un ambiente hostil. El crecimiento neto celular va en disminución hasta alcanzar valores nulos o casi nulos (Rodríguez, 2010; Shuler y Kargi, 1992).

5. Fase Estacionaria

La fase estacionaria comienza al final de la fase de desaceleración, y corresponde a una fase en donde la densidad celular permanece constante, es decir la velocidad de crecimiento iguala a la velocidad de mortandad celular. Durante este período las células son todavía metabólicamente activas y producen metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son productos que están relacionados al crecimiento celular, mientras que los secundarios no lo están. Una vez alcanzada la fase estacionaria, no hay crecimiento neto en la población y la velocidad específica retorna a cero ($\mu=0$) (Buchanan et al., 1997; Rodríguez, 2010; Shuler y Kargi, 1992).

6. Fase de transición

Al igual que las demás fases de transición posee una existencia formal, aunque esta zona no siempre se encuentra claramente delimitada (Rodríguez, 2010; Shuler y Kargi, 1992).

7. Fase de muerte

Corresponde a la fase en donde las células comienzan a morir. Tras el agotamiento de los recursos, los microorganismos vivos utilizan los nutrientes liberados al medio por la lisis celular a fin de asegurar

su subsistencia. La población microbiana se va reduciendo en forma gradual debido a que este mecanismo celular es deficiente energéticamente (Rodríguez, 2010; Shuler y Kargi, 1992).

5.2. Modelado de las curvas de crecimiento bacteriano

El modelado matemático de cualquier proceso contribuye a mejorar el conocimiento básico de los fenómenos que suceden en un determinado proceso gracias a que es capaz de proporcionar información adicional que permita describir el comportamiento de un sistema ante modificaciones en las condiciones del proceso. En el caso de la DA, el modelado de la cinética del proceso puede contribuir a identificar el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones físico-químicas, tales como pH, temperatura, sólidos totales, etc. La información proporcionada por estos modelos podrá ayudar a prevenir problemas de inestabilidad, además de proveer una guía para el diseño y control del proceso. (Angelidaki et al., 1993; Gontupil, 2013; Mu et al., 2006; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991).

El proceso de modelado, el que incluye la selección del modelo, la identificación de los parámetros y planificación de la experiencia, debe ser coherente con los objetivos propuestos. Los objetivos del modelado pueden ser tanto interpretar el comportamiento del sistema y la interacción de sus componentes o bien verificar una hipótesis y/o predecir el comportamiento del sistema en un futuro o bajo circunstancias similares o diferentes (Donoso-bravo et al., 2011). El grado de realismo y complejidad de un modelo depende de lo que se quiera describir, y siempre se debe elegir aquel que sea lo suficientemente simple pero que pueda describir adecuadamente el sistema deseado (Shuler y Kargi, 1992).

El entendimiento de la naturaleza de los datos experimentales es crucial para hacer un buen uso del procedimiento de modelado. El reactor de tipo batch puede ser definido como un proceso biológico en el cual no hay interacción de masa con el ambiente, es decir, no hay corrientes de entrada ni de salida, con excepción de la corriente de gas producido. Todos los sustratos, nutrientes e inóculo son añadidos al comienzo del ciclo. Varias ventajas se han especificado relacionadas al uso de este tipo de reactores en función de la determinación de los parámetros cinéticos, tales como la posibilidad de controlar la variación en el tiempo de diferentes parámetros, el relativamente corto tiempo de duración comparado con un reactor continuo, además de ser un método ampliamente aceptado. Sin embargo, la principal desventaja proviene de la imposibilidad de realizar excitaciones de entrada que permitan analizar la sensibilidad de los parámetros, aunque esto ha sido parcialmente aliviado utilizando un conjunto de reactores con diferentes condiciones iniciales tales como distintas relaciones sustrato-inóculo (Donoso-bravo et al., 2011).

En un reactor dado, el crecimiento microbiano debe ser medido para posteriormente poder modelarlo (Zwietering et al., 1990). Los métodos de determinación de concentración de masa celular incluyen los métodos directos tales como lo de determinación de peso seco, el de determinación del volumen de

células compactado o el método de densidad óptica, aunque estos sólo pueden ser utilizados cuando el medio se encuentra libre de material sólido, de otra manera se deberá aplicar un método de determinación indirecto, basado en la medición del consumo de sustrato o de la formación de productos (Shuler y Kargi, 1992).

El proceso de DA suele ser analizado no por el crecimiento microbiano sino por el consumo de sustrato o la producción de biogás y metano a lo largo del tiempo. En reactores de tipo batch, la producción acumulada de metano suele seguir una curva de tipo sigmoideal, caracterizada por tres fases bien diferenciadas: una primera fase conocida como fase de retardo o de latencia, seguida por una fase de crecimiento exponencial y finalmente una fase asintótica (Beuvink y Kogutt, 1993; Donoso-bravo et al., 2011). A fin de analizar tal cinética de producción de biogás o metano, es esencial encontrar un modelo que describa la producción del gas a lo largo del tiempo (Beuvink y Kogutt, 1993). Muchos autores han incorporado el uso de estos modelos para describir el proceso de DA en diferentes tipos de sustratos.

Entre los modelos utilizados en la bibliografía para analizar la performance de un reactor anaeróbico se seleccionaron dos que suelen ser los más utilizados; el primero corresponde a una cinética de primer orden que no considera la fase de latencia y un segundo modelo describe una curva de producción de metano sigmoideal conocido como la ecuación modificada de Gompertz

5. 2. 1. Modelo de primer orden

Si se asume una cinética de primer orden para la hidrólisis de la materia orgánica particulada, la producción de metano acumulado puede ser descrita por medio de la siguiente ecuación (Kafle y Kim, 2013; Tosun et al., 2004):

$$B(t) = B_0 * (1 - e^{(-kt)}) \quad \text{Ec. II.29}$$

donde $B(t)$ representa la producción acumulada de metano al día t de digestión (mL/g SV), B_0 es la producción potencial de metano del sustrato (mL/g SV), K representa la velocidad de producción de metano (constante de desintegración de primer orden) ($1/\text{día}$) y t es el tiempo (días) (Kafle y Kim, 2013; Kwak et al., 2013).

Este modelo considera la disponibilidad de sustrato como el factor limitante, y se supone que la hidrólisis gobierna el proceso global. Por lo tanto, se describe el proceso una vez que se ha alcanzado la máxima producción de metano sin considerar una fase de latencia. En aquellos casos en donde el proceso muestre un retardo en su producción de metano, esta ecuación podría no representar adecuadamente el proceso (Gontupil, 2013; Li, 2012).

5. 2. 2. Ecuación de Gompertz

La ecuación de Gompertz ha sido considerada como uno de los mejores modelos para describir el crecimiento de las bacterias en un reactor batch (Zwietering et al., 1990). Este modelo describe una curva de crecimiento sigmoideal (Figura II.6) con una fase de retardo, una fase de crecimiento exponencial y luego una fase estacionaria, y no considera la cuarta fase correspondiente a la fase de muerte de las bacterias (Buchanan et al., 1997).

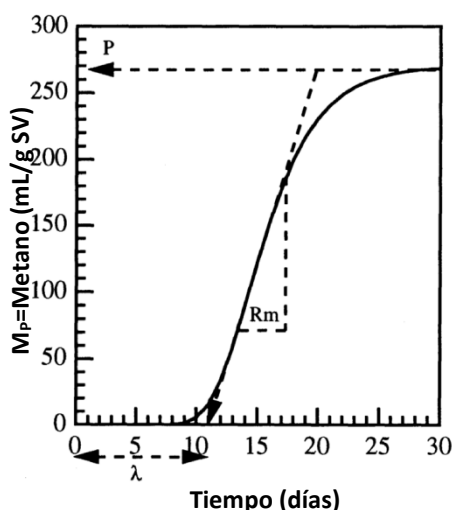


Figura II.6: Curva de producción de metano esquemática para la descripción de los parámetros de la Ec. de Gompertz

Fuente: Lay et al., (1996)

La ecuación de Gompertz fue utilizada por Zwietering et al., (1990) para describir una curva de crecimiento bacterial en un reactor batch (Ec. II.30), la cual describe el tamaño de una población (y) en función del máximo valor alcanzado por la población (A), la velocidad de crecimiento máxima (μ_m) y la fase de retardo (λ).

$$y = A * \exp \left[-e^{\left\{ \frac{\mu_m}{A} (\lambda - t) * e^1 + 1 \right\}} \right] \quad \text{Ec. II.30}$$

Lay et al., (1996), llevo a cabo una modificación de la ecuación de Gompertz a fin de poder modelar la producción de metano y obtener parámetros que la caractericen, tales como la fase de retardo, velocidad y producción potencial de metano (Ec. II.31).

$$M_P = P * \exp \left[-e^{\left\{ \frac{R_m}{P} (\lambda - t) * e^1 + 1 \right\}} \right] \quad \text{Ec. II.31}$$

donde M_P representa la producción acumulada de metano (mL/g SV), P es la producción final de metano (mL/ g SV), R_m representa la velocidad de producción de metano durante la fase exponencial (mL/g SV día), λ representa la fase de retardo (días) y t representa al tiempo.

Esta ecuación ha sido utilizada como una herramienta por diferentes autores para analizar cómo se ven modificados sus parámetros en función de las diferentes condiciones de proceso. Lay et al., (1996) la utilizaron para analizar el efecto del contenido de humedad y de la naturaleza química de los residuos sólidos en la producción de metano en rellenos sanitarios; Lay et al., (1997) por otro lado, investigaron la influencia de la naturaleza química, pH, contenido de humedad y amoníaco en la DA de residuos de alto contenido en sólidos (torta de lodos, carne, repollo, zanahoria arroz, patata). También fue utilizada para analizar el proceso de co-digestión en diferentes tipos de sustratos (estiércol de cerdo y residuos de comida) (Shin et al., 2008); mientras que Cheng y Zhong, (2014) la utilizaron para modelar la producción de biogás en los tallos de algodón y analizar el efecto de distintas relaciones sustrato/inóculo, diferentes proporciones de co-sustrato y la influencia de la realización de un pretratamiento ácido y uno básico. Además de utilizarla para el análisis de la producción de metano, también se ha utilizado para analizar la producción de bio-hidrógeno en condiciones de oscuridad (Gadhamshetty et al., 2010), para describir el crecimiento de los microorganismos productores de hidrógeno a partir de la sucrosa en condiciones anaeróbicas (Mu et al., 2007), para describir la formación de hidrógeno, de butirato y acetato a partir de sucrosa en reactores tipo batch (Mu et al., 2006), además para analizar el consumo de sustrato y formación de hidrógeno en la fermentación anaeróbica de totora utilizando como inóculo los microorganismos del rumen (Hu y Yu, 2006).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Equipos Experimentales

El estudio de la digestión anaeróbica se llevó a cabo en biorreactores de tipo batch a escala laboratorio, los que fueron diseñados tomando en consideración las guías propuestas por Hansen et al., (2004) y Angelidaki et al., (2009). Tanto el diseño de los bioreactores como el sistema de medición de gases se describen a continuación.

1.1. Bioreactores batch

El equipo experimental consiste en kitasatos de 1 L de capacidad utilizados como digestores de tipo batch, sellados mediante tapones de gomas para mantener su hermeticidad, conectados a un sistema de medición de gases y mantenidos a temperatura constante mediante baños termostáticos dispuestos como se muestra en la Figura III.1 y que permiten un control de temperatura en $\pm 1^\circ\text{C}$. Cada bioreactor cuenta con un puerto para la medición del volumen de biogás producido y para la extracción de muestras de digestato para el posterior análisis químico. La agitación de cada uno de los biorreactores se realizó manualmente en forma diaria.



Figura III.1: Reactores anaeróbicos de tipo batch y baño termostático

1.2. Sistema de medición de gases

La medición del biogás producido se realiza a través de un sistema por desplazamiento de agua utilizando dos recipientes en serie de 500 mL de capacidad, uno de ellos hermética cerrado y lleno con agua acidificada a pH 2 para evitar la disolución del CO_2 producido (Marín et al., 2007) y el segundo utilizado para coleccionar el agua desplazada con el fin de medir el volumen de gas producido. El primer recipiente cuenta con tres puertos que permiten la conexión al biodigestor y la entrada del biogás al sistema de medición, el desplazamiento de agua y la medición de la composición del biogás. Esta composición se mide a través de un equipo portátil (GA2000 marca LandGEM) que se muestra en la Figura III.2. El mismo cuenta con celdas infrarrojas para medir metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) con un error máximo de $\pm 0,5\%$, y una celda electroquímica que mide el nivel de oxígeno (error máximo $\pm 1,0\%$). Además se mide la concentración de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en un rango de 0-200ppm, con

un error de $\pm 10,0\%$ mediante una celda externa. El equipo se calibra previo a cada ensayo con una mezcla de gases patrón de concentración conocida (certificación AGA, Número de Certificado 165342) y establecida para el rango de trabajo en 60% - 40% (CH_4 - CO_2).



Figura III.2: Sistema de medición de gases y equipo LandGEM GA2000

2. Técnicas Analíticas

A continuación se presentan las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de los parámetros físico-químicos de los sustratos, inóculos y mezclas.

2.1. Análisis de Sólidos Totales y Sólidos Volátiles

Los **Sólidos Totales (ST)** representa el material que queda en un recipiente después de someter la muestra a un proceso de evaporación, se determinan según la metodología descrita en el método 2540-B (APHA, 1999), la cual consiste en evaporar una muestra de volumen y peso conocido en estufa termoregurable (Científica Central modelo 30 40) a 105°C hasta peso constante, medido en balanza analítica (Mettler AE240). Para el cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$ST(\% \text{ en peso}) = \frac{(\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Peso}_{\text{Capsula}})}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} * 100 \quad \text{Ec. III.1}$$

Los **Sólidos Volátiles (SV)** corresponden a la porción de ST que se libera de una muestra al calcar el residuo seco en mufla (Estigia CDM-4007R). Se determinan a través del método 2540-E (APHA, 1999), mediante la calcinación a 550 °C durante 6 horas. El contenido en SV puede determinarse en base seca (Ec. III.2) o en base húmeda (Ec. III.3).

$$SV(\%)_{\text{Base Seca}} = \frac{(\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Peso}_{550^{\circ}\text{C}})}{\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}}} * 100 \quad \text{Ec. III.2}$$

$$SV(\%)_{\text{Base Húmeda}} = \frac{(\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Peso}_{550^{\circ}\text{C}})}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} * 100 \quad \text{Ec. III.3}$$

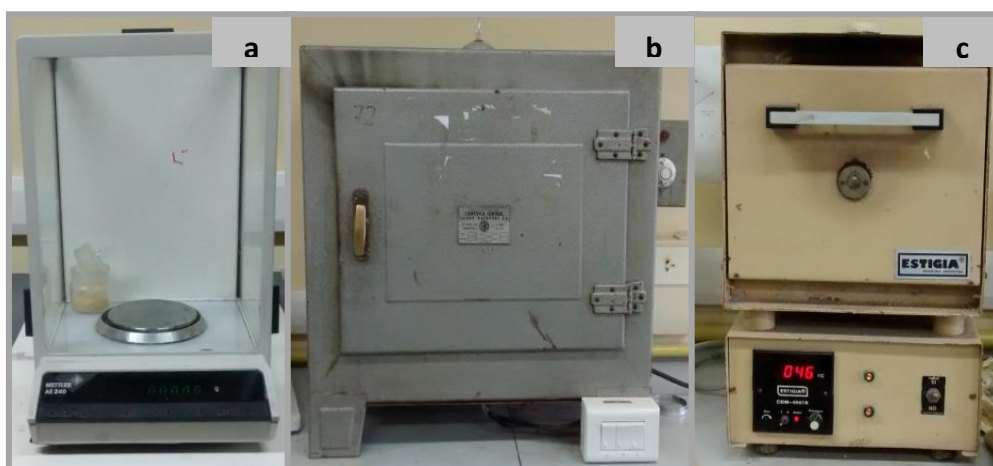


Figura III.3: a. Balanza analítica. b. Estufa. c. Mufla.

La diferencia entre el residuo seco y los SV determinan el contenido en cenizas (Ec. III.4) de una muestra.

$$\text{Cenizas} (\%) = ST(\%) - SV(\%)_{\text{Base Húmeda}} \quad \text{Ec. III.4}$$

2.2. Determinación del pH

La determinación del pH se realiza por inmersión directa del electrodo de pH sobre la muestra. El equipo utilizado corresponde a un electrodo de vidrio marca Hanna HI1131B y una sonda de compensación de temperatura, conectados a un equipo de titulación automático (Hanna modelo HI902, Figura III.4 a). La resolución de la lectura es de 0,01 unidades de pH con una precisión de $\pm 0,01$. Previo a cada medición se realiza la calibración del equipo con soluciones tampón estándar de pH $4,00 \pm 0,1$; $7,0 \pm 0,1$ y $10,00 \pm 0,1$ a 20°C.

La medición de pH en materiales/compuestos con alto contenido de agua como PC, suero lácteo o lodos de depuradora, se realiza directamente sobre la muestra. Para el caso de materiales con alto contenido en sólidos totales como los FORSU, se utiliza el método sugerido por la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU USEPA (2004), el cual consiste en aplicar diluciones en agua en proporciones 1/1 (1 mL de agua por cada gramo de material), agitar la mezcla durante 5 minutos, dejar reposar la dilución por un periodo de una hora y finalmente centrifugar o filtrar la muestra. La medición del pH se realiza posteriormente sobre el sobrenadante obtenido (método 9045D del compilado SW-846: *Métodos de ensayo para la evaluación de Residuos Sólidos, métodos físicos /químicos*).

2.3. Determinación de la Alcalinidad Total, Parcial e Intermedia

Para la determinación de la alcalinidad de un sistema anaeróbico se emplea el método sugerido por Jenkins et al., (1983) y Ripley et al., (1986), el cual consiste en centrifugar una muestra por un periodo de 20 min a 3500 rpm (centrifuga Rolco CM 36 R) y titular el sobrenadante a dos valores de pH (5,75 y 4,3) utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) de normalidad conocida. A partir de estas titulaciones se definen tres parámetros: alcalinidad total (AT) medida a pH 4,3; Alcalinidad parcial (AP) medida a pH 5,75, asociada a la alcalinidad a los bicarbonatos y a la capacidad buffer del sistema, y alcalinidad intermedia (AI) estimada como diferencia entre los anteriores y asociada a la concentración de los AGV en el sistema. A partir de estos valores se define la relación de alcalinidad (RA definida como la relación entre AI y AP (Björnsson et al., 2001; Jenkins et al., 1991; Ripley et al., 1986) parámetro que representa una medida de la estabilidad del digestor.

Para la determinación de estos parámetros se utiliza el titulador automático marca Hanna HI902 (Figura III.4 a), el cual permite el agregado de ácido sulfúrico de normalidad conocida (aproximadamente 0,02N) y la medición del pH en forma continua, hasta alcanzar los dos valores citados previamente. La Figura III.4b muestra la curva de titulación obtenida la cual permite identificar los puntos de pH mencionados.

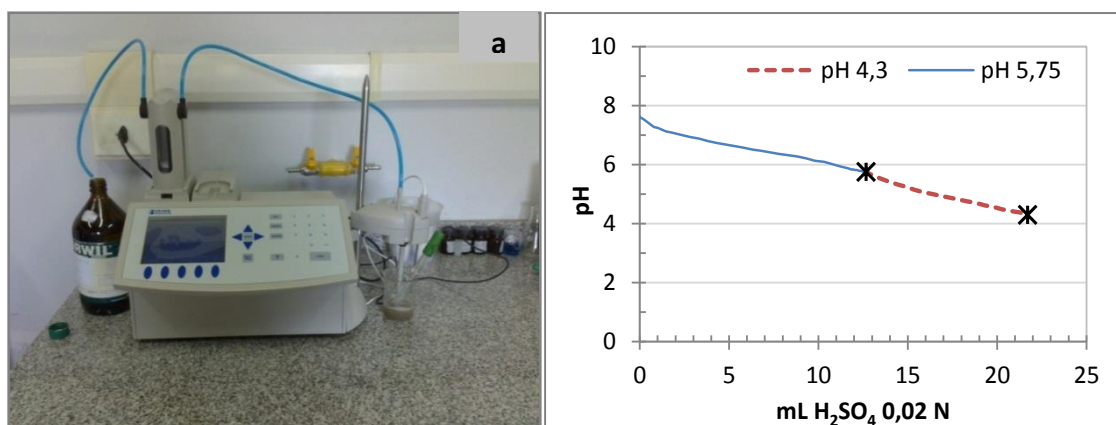


Figura III.4: a. Titulador automático Hanna mod. HI902. b. Gráfico de titulación de la muestra a pH 5,75 y 4,3

El cálculo de la alcalinidad se realiza a partir de las siguientes expresiones:

$$AT(\text{mg CaCO}_3/\text{L}) = \frac{V_{4,3} * N_{\text{H}_2\text{SO}_4} * 50}{V_m(\text{ml})} \quad \text{Ec. III.5}$$

$$AP(\text{mg CaCO}_3/\text{L}) = \frac{V_{5,75} * N_{\text{H}_2\text{SO}_4} * 50}{V_m(\text{ml})} \quad \text{Ec. III.6}$$

$$AI(\text{mg CaCO}_3/\text{L}) = \frac{(V_{4,3} - V_{5,75}) * N_{\text{H}_2\text{SO}_4} * 50}{V_m(\text{ml})} \quad \text{Ec. III.7}$$

$$RA = AI/AP \quad \text{Ec. III.8}$$

donde:

$V_{4,3}$ y $V_{5,75}$: volumen de ácido consumido hasta alcanzar los valores de pH 4,3 y 5,75 respectivamente.

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: normalidad del ácido sulfúrico utilizado para la determinación

V_m : volumen de muestra de sobrenadante

50: factor de conversión de equivalentes de H_2SO_4 en mg CaCO_3

2. 4. Determinación de la demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) se define como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica y los demás compuestos oxidables presentes en una determinada muestra. Para la determinación de la DQO se aplica la norma ASTM D 1252 – 00, Método B – micro DQO denominado *método de reflujo cerrado*. Este método se basa en la digestión de una muestra con exceso de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en un medio fuertemente ácido (H_2SO_4), durante un periodo de 2 horas a una temperatura de 150°C. La reacción es catalizada por sulfato de plata (Ag_2SO_4) y se eliminan posibles interferencias por haluros mediante sulfato de mercurio (HgSO_4). El exceso de dicromato posterior a la digestión es valorado mediante titulación con una solución de sulfato ferroso de amonio ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), utilizando ferroína como indicador.

Para la determinación se utilizaron tubos de cultivo de 10 mL de capacidad con tapas a rosca, a los cuales se le añade 1,5 mL de la solución de dicromato de potasio, 3,5 mL de la solución catalizadora de ácido y 2,5 mL de la muestra y/o el blanco según corresponda. Posteriormente se digieren las muestras en un termoreactor (Hanna modelo HI 839800, Figura III.5) a 150°C por un periodo de 2 horas. Finalmente se agrega una gota de solución indicadora de ferroína al contenido digerido y se titula con una solución de sulfato ferroso de amonio (SAF) 0,1 N, hasta viraje de color. El mismo procedimiento se aplica al blanco. El valor de DQO se calcula a partir de la Ec. III.9.

$$DQO(mg/L) = \frac{(A - B) * N * 8000}{V_{muestra}} \quad \text{Ec. III.9}$$

donde:

A: SAF requerido para la titulación del blanco [mL]

B: SAF requerido para la titulación de la muestra [mL]

N: normalidad del SAF

$V_{muestra}$: Volumen de muestra utilizada [mL].

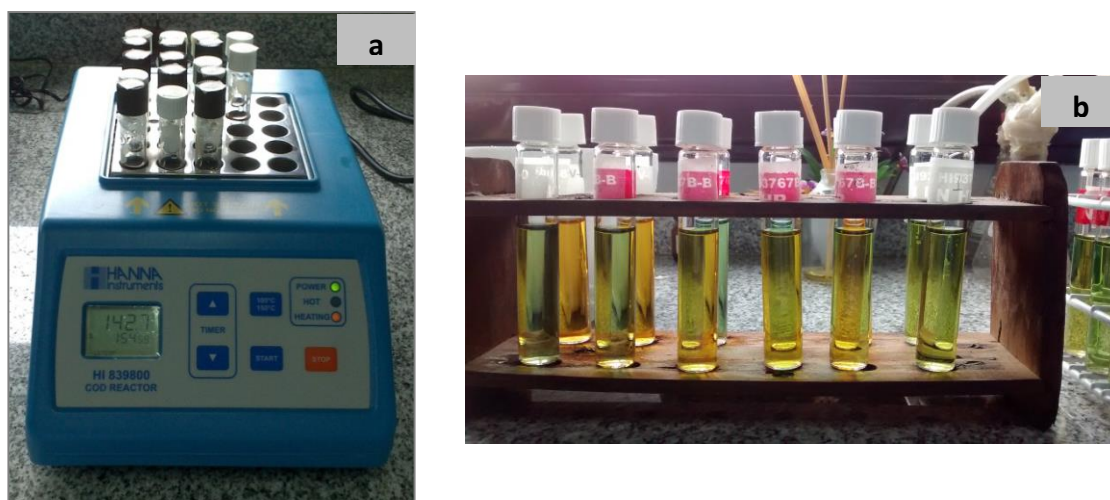


Figura III.5: a. Termoreactor Hanna modelo HI 839800 para la medición de DQO. b. Tubos de DQO

2. 5. Determinación de Nitrógeno Amoniacal

El nitrógeno amoniacal (NH_4^+) se determina mediante el método 4500- NH_3 B (APHA, 1999). Consiste en la destilación (Figura III.6. a) de una muestra de tamaño conocido a la cual se le agrega una solución tampón de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), que evitará que el pH de la muestra varíe durante la destilación) y una solución de hidróxido de sodio (NaOH), para aumentar el pH de la solución a valor de 9.5, necesario para asegurar que todo el amonio presente se encuentre en forma de amoniaco (NH_3).



El destilado de amoníaco es recogido sobre una solución indicadora de ácido bórico (H_3BO_3):



Una vez destilado se procede a la titulación con ácido sulfúrico (titulador automático Hanna, Figura III.4.a).



La determinación del punto final de titulación se produce por identificación del punto de inflexión considerado como el máximo en la primera derivada de la curva de pH en función del volumen de ácido agregado (Figura III.6 b).

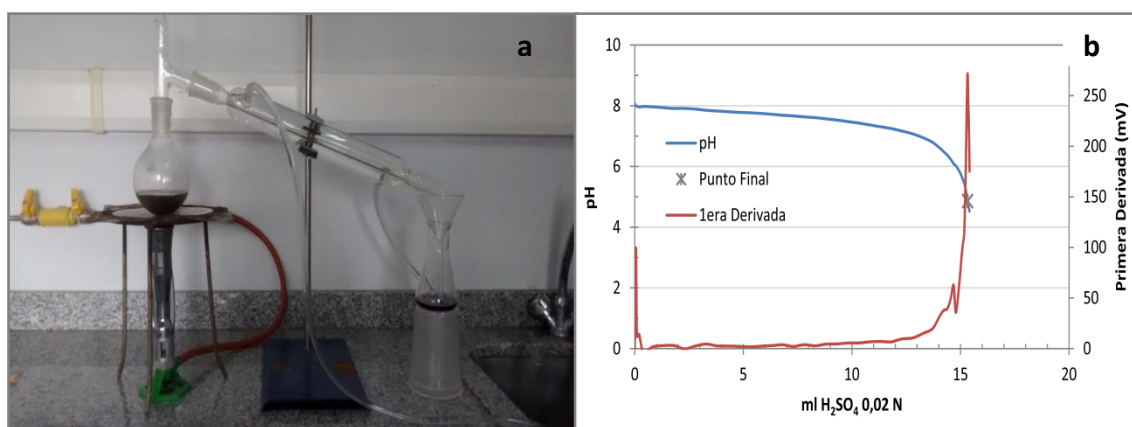


Figura III.6: Determinación de NH_4^+ : a. Equipo de destilación; b. Gráfico obtenido de la titulación del nitrógeno amoniacal con H_2SO_4 mediante el equipo Hanna HI 902

El cálculo de la concentración de nitrógeno amoniacal expresado en mg de $N-NH_4^+$ se realiza a partir de la siguiente ecuación:

$$N - NH_4^+ (mg/L) = \frac{(A - B) * 14.000 * (N_{H_2SO_4})}{V_{muestra}} \quad \text{Ec. III.13}$$

donde:

A: H_2SO_4 requerido para la titulación del blanco [ml]

B: H_2SO_4 requerido para la titulación de la muestra [ml]

14.000: Factor de conversión de N a NH_4^+

N: normalidad del H_2SO_4

$V_{muestra}$: volumen de muestra utilizado.

2.6. Determinación de Amoníaco libre

El amoníaco libre (NH_3) se calcula a partir de la concentración de nitrógeno amoniacal (NH_4^+), (Sección 2.5), del pH y de la temperatura del medio, teniendo en cuenta el siguiente equilibrio:



donde K_a se obtiene a partir de la funcionalidad del pK_a con la a temperatura (T) según la Ec. III.15 (Campos Pozuelo, 2001; Khanal, 2008).

$$pK_a = 10,072 - 0,0356 * T + 9 * 10^{-5} * T^2 + 4 * 10^{-8} * T^3 \quad \text{Ec. III.15}$$

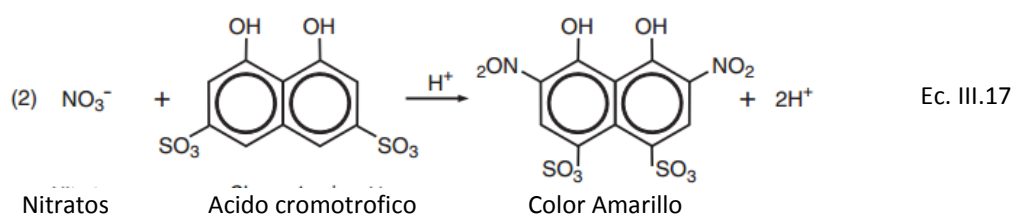
La concentración de amoníaco libre se determina a partir del valor de pK_a , del valor del pH y de la concentración de amoníaco total según la Ec. III.16 (Campos Pozuelo, 2001; Cuetos et al., 2009):

$$\text{NH}_3 = \frac{[\text{NH}_4^+]}{1 + 10^{pK_a - \text{pH}}} \quad \text{Ec. III.16}$$

2.7. Determinación de Nitrógeno Total

La determinación de nitrógeno total se basa en el método del ácido cromotrópico propuesto por Hanna Instrument (*Manual de Instrucciones C 214: Multiparameter Bench Photometer for wastewater treatment Application -01/2011*), el cual se divide en dos etapas para su realización:

- Una primera digestión con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) en el termoreactor (Figura III.5) a 105°C durante un periodo de 30 min. Este procedimiento permite que todos los compuestos nitrogenados sean oxidados a nitrato. Las posibles interferencias de óxido de halógenos son eliminadas mediante la adición de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).
- La segunda etapa corresponde a la cuantificación de los nitratos formados mediante el método de ácido cromotrópico, en donde los nitratos formados durante la digestión reaccionan con el ácido cromotrópico para formar un complejo de color amarillo con un máximo de absorbancia a 420 nm (Ec. III.17).



- Posterior a la generación de color se coloca el tubo en un espectrofotómetro (Hanna modelo HI 83214, Figura III.7) para la determinación directa de la concentración del nitrógeno total

presente en la muestra en unidades de mg/L. La determinación incluye todas las formas orgánicas e inorgánicas de nitrógeno



Figura III.7: Espectrofotómetro multiparamétrico Hanna modelo HI 83214

3. Cálculos de los resultados

La producción de metano por sí sola no es el único parámetro de comparación, ya que depende de factores tales como la cantidad de sustrato utilizado, del tipo de reactor y la forma en la que se haya realizado la experiencia, es por ello que se toman varios índices para realizar la comparación entre las diferentes experiencias.

3.1. Determinación de la producción final de metano (B_0)

De acuerdo con Chynoweth et al., (1999), la biodegradabilidad de un determinado sustrato en condiciones anaeróbicas es determinado por medio de la incubación de los mismos durante un periodo prolongado de tiempo y medida en términos de la producción final de metano y de la reducción de materia orgánica en términos de SV y/o DQO tal como se muestra en la Ec. III.18

$$\% \text{ remocion (SV o DQO)} = \frac{(SV \text{ o DQO})_{final} - (SV \text{ o DQO})_{inicio}}{(SV \text{ o DQO})_{inicio}} \quad \text{Ec. III.18}$$

El término productividad de metano se utiliza para indicar la eficiencia de producción de este gas (CH_4) por unidad de una variable determinada. De acuerdo a Moller et al., (2004) esta variable puede estar dada por los SV destruidos durante el proceso, los SV cargados al reactor, el volumen de reactor o el volumen de estiércoles producidos (en el caso de trabajar con estiércoles o purines de animales). Si la productividad de metano es medida en términos de los SV cargados inicialmente al reactor, se expresa en $\text{mL CH}_4/\text{g SV}_{iniciales}$, parámetro que se conoce como *producción final de metano* y se representa como B_0 (Ec. III.19). Este parámetro asume que el tiempo de residencia dentro del reactor se aproxima a infinito (Moller et al., 2004) y habitualmente es utilizado con fines comparativos.

$$B_0(\text{mL CH}_4/\text{g SV}) = \frac{\text{Volumen acumulado de CH}_4}{SV_{iniciales}} \quad \text{Ec. III.19}$$

El valor de B_0 siempre será menor que la producción teórica debido a varias razones, por un lado, una fracción del sustrato que se utiliza para sintetizar masa bacteriana, una fracción de materia orgánica se perderá en el efluente, y por otro lado, los compuestos que contienen lignina sólo serán degradados hasta un cierto límite. La inhibición del proceso biológico por inhibidores tales como amoníaco y ácidos grasos volátiles es otro factor que contribuye a que la producción de metano real sea inferior al potencial que se obtendría si la inhibición no estuviera presente. La producción teórica, puede servir como referencia y se determina en función de la composición de la materia orgánica en términos de AGV, carbohidratos, lípidos, proteínas según la Ec. III.20 obtenida a partir de los reportado por Moller et al., (2004) y Nielfa et al., (2015).

$B_{th} (mL CH_4/g SV)$

$$= 370 * \%AGV + 415 * \%carbohidratos + 496 \\ * \%Proteínas + 1014 * \%lípidos$$

Ec. III.20

4. Método utilizado para realizar las experiencias

A fin de poder cumplir con los objetivos propuestos en cada una de las unidades, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Se diagramó el diseño experimental en función de los diferentes factores a estudiar
 - Capítulo IV: tipo de inóculo
 - Capítulo V: relación sustrato-inóculo
 - Capítulo VI: composición de la alimentación
- Se caracterizaron los sustratos e inóculos, determinando los parámetros ST, SV, pH, alcalinidad, DQO, N-NH_4^+ , NH_3 .
- Se llevó a cabo la caracterización de las mezclas (sustrato + inóculo) al inicio y al final de la experiencia.
- Se armó el sistema de biorreactores batch (biorreactores + sistema de medición de gases) y se puso en marcha del proceso de DA, lo que implica la colocación de los reactores en el baño termostático.
- Se llevó a cabo el monitoreo diario de:
 - volumen de biogás y su composición (CH_4 , CO_2 , O_2),
 - la valoración semanal del pH y la alcalinidad total, parcial e intermedia del digestato.

4.1. Sustrato a utilizar

Los sustratos seleccionados para realizar las experiencias de co-digestión corresponden a:

- **PC fresco**, compuesto por estiércol, orines y agua de lavado, obtenidos del establecimiento de cría intensiva de porcinos ubicado en las afueras de la ciudad de Olavarría; el PC fue colectado del sistema de drenaje que conduce los efluentes hacia una laguna cubierta.
- **SL** fue obtenido de una empresa láctea y corresponde al efluente generado de la producción del queso tipo ricota.
- **FORSU** fueron obtenidos a partir de la recolección semanal de la fracción orgánica de los residuos domiciliarios. Una vez recolectados los mismos fueron triturados primeramente en forma manual y posteriormente mediante una procesadora de mesada a fin de disminuir su tamaño.

4.2. Inóculos a utilizar

Durante la presente tesis se utilizaron diferentes tipos de inóculos, la procedencia de los mismos corresponde a:

- **Rumen:** de tipo vacuno obtenido del matadero local y mantenido en un recipiente cerrado en condiciones mesofílicas hasta su uso a fin de evitar la degradación y mortandad de las bacterias que porta.
- **PC digerido:** obtenidos en el Laboratorio de Bioenergía de la Facultad de Ingeniería – UNCPBA, a partir de PC frescos, mantenidos en condiciones anaeróbicas y mesofílicas, y aplicados cuando el contenido la producción de biogás comenzó a descender, asegurando de esta manera que el sustrato utilizado como inóculo posee una baja concentración de materia orgánica y que por lo tanto la producción de biogás por parte del mismo es mínima.
- **Lodos de depuradora:** obtenidos de la planta depuradora de líquidos cloacales de la ciudad de Olavarría mantenidos en condiciones anaeróbicas en régimen mesofílico hasta su utilización y al igual que en el caso del PC digerido, fue mantenido en dichas condiciones hasta verificar que la producción de biogás/metano fue mínima.

5. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados experimentales se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI (v.16.2.04). Los datos de producción de metano al igual que los parámetros físico-químicos informados se expresaron como valor medio $\pm$ la desviación estándar del número de experimentos o determinaciones realizadas.

La significancia de los valores medios se realizó mediante la utilización del test de ANOVA que arroja resultados significativos (p -valor $<0,05$), cuando la media de al menos uno de los grupos difiere de la media de los demás, entonces se puede realizar una comparación de pares para indicar cuáles medias difieren de cuáles otras. La técnica utilizada corresponde a la prueba mínima de diferencias significativas (Fisher's least significant difference - Fisher's LSD). Este método forma un intervalo de confianza para cada par de medias a un nivel de significancia determinado α seleccionado. La magnitud de los límites indica la diferencia más pequeña entre dos medias que se pueden encontrar para representar una diferencia estadísticamente significativa entre ellas. Sólo se emplea cuando la prueba F en la tabla ANOVA indica diferencias significativas entre las medias de las muestras.

5.1. Modelado de los datos experimentales

El ajuste de los datos experimentales a diferentes modelos que representan la cinética de la producción de metano se realizó mediante el programa STATGRAPHICS Centurion XVI, utilizando el método de regresión no lineal. Este método ajusta una función determinada relacionando una sola variable dependiente con una o más variables independientes, estimando los parámetros de la ecuación a partir de cuadrados mínimos no lineales.

El ajuste de los datos a la ecuación fue evaluado mediante el parámetro R^2 (coeficiente de regresión) el que representa el porcentaje de variabilidad de la variable respuesta que ha sido explicado por el modelo de regresión ajustado, la variación de este parámetro va de 0% a 100%.

CAPITULO IV

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE INÓCULO SOBRE LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA DEL PURÍN DE CERDO

1. Introducción

Los residuos de porcinos, más específicamente el PC, es una importante fuente de emisiones de metano, debido principalmente a una gran concentración de materia orgánica, además de su contenido en bacterias metanogénicas provenientes del tracto intestinal de los animales (Zeikus, 1977). Sin embargo, si el objetivo es la producción de energía a través del tratamiento anaeróbico, estas bacterias no son capaces de alcanzar un buena performance en la producción de metano en cortos periodos de tiempo. Al respecto, Córdoba et al., (2013), analizaron la DA de estos residuos en régimen mesofílico sin la utilización de un inóculo externo, mostrando, que son necesarios periodos de tiempo mayores a 60 días para alcanzar la fase de crecimiento exponencial de producción de metano. Este periodo resulta aún más extenso a menores temperaturas, tal como observaron Massé et al., (2003) al analizar la producción de metano para el PC a temperaturas de 10 y 15°C encontrando una producción total menor a menores temperaturas, aunque en ambos casos las emisiones de metano se pueden extender por periodos tan prolongados como 270 días. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Llabrés-Luengo y Mata-Alvarez, (1987), quienes indicaron la importancia de la utilización de inóculos en sistemas anaeróbicos de tipo batch que utilicen sustratos provenientes de sistemas pecuarios, ya que sin la utilización de un inóculo, los productos intermedios pueden acumularse disminuyendo e incluso inhibiendo la actividad bacteriana. El tipo de inóculo a utilizar, su calidad, así como la cantidad del mismo son factores claves que determinan la duración de la puesta en marcha y funcionamiento de un reactor (Forster-Carneiro et al., 2007). La utilización de un inóculo altamente activo reducirá la cantidad requerida de este en un digester batch y consecuentemente el volumen del mismo (Forster-Carneiro et al., 2007). Es por esta razón que la performance del proceso dependerá fuertemente del tipo de sustrato y de su interacción con el inóculo seleccionado.

Diferentes tipos de inóculos han sido utilizados en el proceso de DA en condiciones mesofílicas. Entre los más empleados se pueden mencionar al rumen, lodos de depuradora y estiércoles de diferentes tipos de animales, en particular PC previamente digeridos provenientes de reactores en funcionamiento.

El rumen es un órgano exclusivo de los animales rumiantes, en el cual ocurre la digestión de la celulosa y de otras moléculas de polisacáridos. La capacidad de digestión de la celulosa que tienen estos microorganismos está relacionada con la presencia de microorganismos anaeróbicos, los cuales descomponen las cadenas poliméricas de la glucosa en acetato, para posteriormente convertirlo en metano y dióxido de carbono a través de los microorganismos metanogénicos (Budiyono et al., 2009; Lopes et al., 2004). Sin embargo el tipo de bacterias metanogénica presente en el rumen puede variar dependiendo de la especie animal de donde provenga, además de la dieta y de la zona geográfica a la cual pertenezca el animal (Hook et al., 2010). La influencia de este inóculo en el proceso de DA ha sido analizada sobre diferentes tipos de sustratos. Lopes et al., (2004) analizaron su influencia sobre la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales, en concentraciones que variaron en el rango 0 a 15% en volumen, encontrando que a mayor concentración de inóculo, mejor es la performance del

reactor medida como una función del volumen de biogás y su contenido en metano, de todas maneras se requirieron tiempos de operación cercanos a un año para reducir el contenido en materia orgánica en un 50%. Por su parte, Budiyono et al., (2009) analizaron la influencia del rumen sobre los estiércoles de ganado, para lo cual utilizaron seis porcentajes de inóculo en el rango 0 a 50%, encontrando que la mejor performance en términos de la producción de biogás se da en el rango de 25-50% de inóculo, aunque no brindaron información sobre la concentración de metano en el biogás. Por otro lado, Hu y Yu, (2006) demostraron que las plantas acuáticas, específicamente totoras, pueden ser efectivamente convertidas a ácidos grasos volátiles mediante la utilización de los microorganismo del rumen en un proceso anaeróbico, aunque el objetivo fue lograr una mayor degradación de la biomasa, por lo cual no se tuvo en cuenta la producción de biogás.

Por su parte, los barros producidos durante el tratamiento de las aguas residuales tienen características que dependen principalmente de su origen, es decir, si provienen del tratamiento de aguas industriales, aguas cloacales o aguas bebibles, como así también de la configuración específica de cada proceso. Por otra parte, los barros o lodos pueden ser clasificados de acuerdo al proceso del cual provienen, a saber, barros primarios, provenientes del tratamiento primario, generalmente tratamientos físicos o químicos a través de los cuales se retiene material particulado, barros secundarios, generados en el tratamiento biológico de las aguas, barros mixtos, una combinación de los anteriores y barros digeridos, correspondiente a cualquiera de los barros anteriores, que han pasado a través de una digestión anaeróbica (Rodríguez, 2011). Estos compuestos han sido utilizados como inóculo en la DA de PC (González-Fernández y García-Encina, 2005), reportando que a mayor concentración de inóculo en el reactor, mayor es la tasa de generación de metano, y menores son los problemas de inhibición por acumulación de AGV. Zhou et al., (2011) analizaron la DA de la pulpa de soja utilizando diferentes concentraciones de barros de aguas municipales, verificando también que las mayores producciones de metano se ven favorecidas cuanto mayor cantidad de inóculo es utilizado.

La utilización de PC digerido como inóculo ha sido también analizada por varios autores. Kougias et al., (2013) estudió la DA de los estiércoles de aves de corral, aunque el énfasis del trabajo estuvo puesto en la utilización de zeolitas para mejorar el proceso que en condiciones normales presenta problemas por inhibición de nitrógeno amoniacal. Panichnumsin et al., (2006) también utilizaron PC proveniente de un digestor en funcionamiento como inóculo para la co-digestión anaeróbica de pulpa de mandioca y PC fresco. Llabrés-Luengo y Mata-Alvarez, (1987) utilizaron como inóculo purín digerido, provenientes de un digestor en funcionamiento para analizar la co-digestión de paja de trigo con PC.

En todos los casos mencionados se ha utilizado un inóculo determinado para un sustrato dado, pero en ninguno de estos trabajos se indica el porqué de la elección de ese inóculo en particular ni se verifica si otro inóculo es capaz de generar o proveer mejores resultados. Sin embargo, se han encontrado trabajos que analizan la influencia de diferentes tipos de inóculos sobre un sustrato determinado. En este sentido, Neves et al., (2004) utilizaron dos tipos de inóculo, lodos granulares y lodos suspendidos y

cuatro relaciones sustrato/inóculo (entre 0,5 y 2,3) en la DA de residuos sólidos urbanos, hallando que sobre el proceso influye no sólo la relación sustrato/inóculo (RSI), sino también el tipo de inóculo, mientras que el inóculo granular evitó la acidificación de los reactores en todo las RSI estudiadas, los lodos en suspensión, mostraron acidificación de los reactores en las mayor RSI. Por su parte, Forster-Carneiro et al., (2007) evaluaron el efecto de diferentes tipos de inóculos (ensilado de maíz, residuos de restaurante digeridos con cáscaras de arroz, excremento bovino y estiércoles porcino, barros digeridos y una mezcla de barros y estiércoles de cerdo) sobre la DA de los FORSU, encontrando que los que presentaron una mejor performance del proceso en cuanto a la producción de biogás y remoción de materia orgánica fueron los lodos de depuradora, aunque el inóculo mezcla (lodos + estiércoles de cerdo) y lo estiércoles de cerdo solos también obtuvieron valores aceptables. Wakadikar et al., (2012) analizaron la influencia de dos tipos de inóculos, lodos de depuradora cloacales y lixiviados de un relleno sanitario sobre diferentes tipos de residuos orgánicos (residuos celulósicos, vegetales y residuos de comida) encontrando que el mejor inóculo resultó el lixiviado, y que para ambos inóculos, entre todos los residuos estudiados, los de tipo celulósicos mostraron la mayor producción de metano. Yue et al., (2012) analizaron la DA de las plantas acuáticas utilizando dos inóculos: rumen y lodos de depuradora digeridos, obteniendo que la mayor producción total de metano fue lograda utilizando lodos, aunque el rumen produjo la mayor velocidad de producción de metano. Azaizeh, (2010) evaluó el proceso de co-digestión anaeróbica de aguas provenientes de una planta de aceite de oliva y PC, en reactores de tipo batch y en régimen mesofílico, utilizando como inóculo lodos provenientes de cinco plantas de tratamiento tanto municipales como industriales resultando sólo dos de ellos eficientes en relación a la remoción de materia orgánica y la producción de biogás.

Como se observa del análisis de la búsqueda bibliográfica cada inóculo interactúa en forma particular con el sustrato, algunos fomentan en mayor medida la hidrólisis, mientras que otros la metanogénesis; bajo diferentes condiciones de proceso un mismo sustrato puede verse favorecido por diferentes inóculos, e incluso los lodos de depuradora de diferentes fuentes producen resultados diferentes. En general no se ha encontrado bibliografía que describa la cinética de la producción de metano durante el proceso de digestión anaeróbica del PC en función del tipo de inóculo.

Además del tipo de inóculo, la cantidad a utilizar es otro factor crucial. De acuerdo con Angelidaki et al., (2009) la concentración de inóculo, en términos de sólidos volátiles, debe ser siempre alta en comparación con la del sustrato; en contrapartida, Campos Pozuelo, (2001) utiliza un metodología previamente estudiada por Callaghan et al., (1999) y Flotats Ripoll et al., (1999) para la determinación de la viabilidad de las mezclas en co-digestión empleando ensayos similares a los de biodegradabilidad, pero con menor concentración inicial de inóculo (alrededor de 10% en peso del sustrato utilizado). Otros autores también proponen utilizar bajas proporciones de inóculo; en este sentido, Shuler y Kargi, (1992) indican que la concentración de inóculo en un reactor debe ser de entre el 5 y 10% en volumen para asegurar un proceso eficiente, aunque Lopes et al., (2004) reportaron el uso de inóculos en porcentajes inferiores al 15% en volumen. Según Campos Pozuelo, (2001) la realización de este tipo de ensayos, con

baja concentración de inóculo, evitará enmascarar posibles problemas ocasionados por sustancias inhibitoras presentes en el sustrato, además de permitir determinar la etapa limitante de la velocidad del proceso a través del análisis de la concentración de los AGV y de la medición del gas producido. La utilización de concentraciones bajas de inóculo permitirá analizar el comportamiento del sustrato en condiciones más cercanas a las reales y verificar cómo influye cada una de las cargas microbianas aportadas.

2. Objetivos

El objetivo de esta unidad es analizar en régimen mesofílico y en discontinuo la DA de PC frescos utilizando tres inóculos diferentes: rumen, PC previamente digeridos y lodos de depuradora. Se evaluará la eficiencia del proceso analizando el desempeño del mismo con respecto a la cinética de producción de metano y a la variación en la concentración de los AGV identificando los factores que afectan la puesta en marcha y la estabilidad del proceso.

3. Materiales y Métodos

3.1. Caracterización de los sustratos e inóculos

La Tabla IV.1 resume las características físico-químicas iniciales del sustrato y de los inóculos utilizados. Los valores que se muestran son promedios de las repeticiones $\pm$ desviación estándar. Las letras junto a los valores, indican si presentan o no diferencias significativas al 95% de confiabilidad para un determinado parámetro.

El sustrato, en comparación con los inóculos, se caracteriza por contener mayor proporción de ST ($7,21 \pm 0,39\%$) y mayor abundancia de materia orgánica, lo cual se refleja en sus valores de SV ($86,39 \pm 0,24\%$) y DQO ($84.576 \pm 8.045 \text{ mg/L}$). Tal como fue indicado previamente en el Capítulo II, sección 3.6.1, en un digestor anaeróbico, el nitrógeno amoniacal total se encuentra presente como ion amonio (NH_4^+) y como amoníaco libre (NH_3). Ambos en elevadas concentraciones presentan problemas de inhibición del proceso; sin embargo, en el sustrato tanto la concentración de nitrógeno amoniacal ($1059,2 \pm 39,3 \text{ mg NH}_4^+\text{-N/L}$), como la concentración de amoníaco libre ($1,8 \pm 0,1 \text{ mg/L}$) se encuentran por debajo de los rangos considerados como inhibidores del proceso, a saber, entre 3.000 y $5.000 \text{ mg NH}_4^+\text{-N / L}$ para el amonio (Drosg, 2013) y entre 50 y 150 mg/L para el amoníaco (Gerardi, 2003; Khanal, 2008).

De los tres inóculos, el purín digerido (I2) muestra valores de alcalinidad total ($11.374 \text{ mg CaCO}_3\text{/L}$) y nitrógeno amoniacal ($2.622,9 \pm 181,6 \text{ mg NH}_4^+\text{-N/L}$) sensiblemente mayores al resto; indicando una elevada capacidad tampón de este inóculo. Tal como fue informado por Molina et al., (2009) y Voß et al., (2009), valores de alcalinidad total mayores a 3.000 mg/L aseguran la estabilidad del proceso, permitiendo compensar caídas en los valores de pH ocasionados por la formación de los AGV (Gerardi,

2003). Por su parte los lodos de depuradora (I3) presentan un pH más alcalino (8,27) y un menor porcentaje de sólidos volátiles comparado con el resto de los inóculos utilizados.

Tabla IV.1: Caracterización físico-química del sustrato y de los inóculos utilizados

Parámetro	Sustrato	Inóculos		
	PC fresco	Rumen (I1)	PC Digeridos (I2)	Lodos (I3)
% ST	7,21±0,39 ^c	4,51±0,38 ^b	3,53±0,45 ^a	4,57±0,07 ^b
% SV (b.s.)	86,39±0,24 ^c	73,96±1,37 ^b	75,07±2,26 ^b	56,70±0,43 ^a
DQO (mg/L)	84.576±8.045 ^c	28.479±3.756 ^a	38.766±1.834 ^{ab}	49.664±10.708 ^b
pH	6,18	6,85	7,88	8,27
AT (mgCaCO ₃ /L)	4.776±28 ^a	5.903±82 ^c	11.374±262 ^d	5.063±65 ^b
NH ₄ ⁺ (mg/L)	1059,2±39,3 ^b	170,1±34,3 ^a	2.622,9±181,6 ^c	915,1±87,0 ^b
NH ₃ (mg/L)	1,8±0,1 ^a	1,4±0,3 ^a	211,0±14,6 ^c	161,8±15,4 ^b

Los valores que se muestran en la tabla son valores medios de las repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra en la misma fila no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) de acuerdo con el procedimiento de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD test)

3.2. Diseño experimental

El equipo utilizado para la realización de la experiencia es el mismo que el indicado en el *Capítulo III. Sección 1*, bioreactores de tipo batch de 1 L de capacidad mantenidos en condiciones mesofílicas. Se seleccionó 900 mL como volumen final de biomasa, correspondiente al 90% de capacidad de los bioreactores, para asegurar un espacio en el reactor para el biogás generado. La selección del porcentaje de inóculo se realizó en función del análisis de la información encontrada en la bibliografía, y se optó por utilizar una cantidad correspondiente al 10% en volumen para cada uno de los inóculos. La selección de este porcentaje permitirá determinar la viabilidad del proceso, analizar la eficacia de cada inóculo e identificar la etapa limitante.

La biomasa a colocar en cada digestor fue preparada mezclando el sustrato y el inóculo correspondiente en las proporciones que se indican en la Tabla IV.2 para cada uno de los cuatro tratamientos planteados. Cada tratamiento fue llevado a cabo por duplicado y no fue necesario el agregado de agua en los reactores, debido a que el contenido en sólidos totales del sustrato y de los inóculos resultaron menores al 10%, lo que corresponde a una digestión anaeróbica de tipo húmeda (menor al 10% en ST) (Bolzonella et al., 2003). A pesar de haber utilizado para el análisis un porcentaje de inóculo en volumen, se verifica la RSI expresada en función de los sólidos volátiles del sustrato y del inóculo, resultando en 1:0.06, 1:0.05 and 1:0.05 para T1, T2 y T3 respectivamente, no presentándose diferencias significativas entre los distintos tratamientos al 95% de confiabilidad, tal como se muestra en la Tabla IV.2, por lo cual el resultado de la comparación de los diferentes tratamientos permitirá observar el efecto de cada uno de los inóculos y su influencia sobre el proceso. El tratamiento T0 servirá como control y de referencia para los demás tratamientos, además permitirá verificar la viabilidad del proceso en función de las bacterias aportadas por el propio sustrato.

Tabla IV.2: Diseño Experimental

Tratamiento	Tipo de Inóculo	Porcentaje en Volumen		RSI
		Sustrato	Inóculo	g SV S/g SV I
T0		100	-	-
T1	I1	90	10	1:0,06 ^a
T2	I2	90	10	1:0,05 ^a
T3	I3	90	10	1:0,05 ^a

Las diferencias en los valores S/I resultan no significativas a $p>0,05$

4. Análisis de los resultados

Las características físico-químicas de los tratamientos al inicio de la experiencia se muestran en la Tabla IV.3. El contenido en ST para los distintos tratamientos se encuentran por debajo del 10% (DA húmeda), además de no presentar diferencias significativas al 95% de confiabilidad entre ellos. Por su parte, los tratamientos T1, T2 y T3, presentan un contenido en materia orgánica tanto en unidades de SV como en DQO menor que T0, como consecuencia de que los inóculos utilizados presentaron menores valores de estos parámetros (Tabla IV.3).

El valor de pH inicial varió entre 6,18 para T0 a 6,49 para T2. En lo que respecta a los valores de la alcalinidad, se observa la influencia de los distintos inóculos incorporados al sistema. Tal como se mencionó en la sección 3. 1 de este capítulo, el inóculo I2 posee el mayor valor de alcalinidad, lo que se refleja en el mayor valor de este parámetro en el tratamiento T2 (5.264 ± 36 mg CaCO_3/L) en comparación con los demás, sin embargo, en todos los tratamientos la AT es mayor que el valor mínimo (3.000 mg CaCO_3/L) sugerido para un proceso estable (Molina et al., 2009; Voß et al., 2009). En función de estos resultados, se consideró que no era necesario el agregado de ningún regulador de pH, tales como bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio, debido a que los valores de la alcalinidad son suficientes para compensar los posibles cambios de pH del sistema por la formación de los AGV. La relación entre la AP y la AI está dada a través del parámetro RA (relación de alcalinidad), y brinda información sobre la estabilidad del proceso. De acuerdo a lo que informa Ripley et al., (1986) este parámetro debe estar en el rango 0,3 a 0,4 para asegurar un proceso estable. Tal como se observa de la Tabla IV.3, el tratamiento que se aleja en mayor medida de este rango es el tratamiento control (T0) con un valor de $RA=4,51$ y una AP (relacionada a la capacidad buffer del sistema) menor que el resto de los tratamientos. En este sentido, el agregado de cualquiera de los inóculos provocó una disminución de la RA y un aumento en la AP del sistema. Se verificó la evolución de la RA durante todo el periodo de análisis a fin de determinar su influencia sobre la producción de metano. En cuanto a la concentración de nitrógeno amoniacal, el resultado es similar al encontrado con la AT, donde T2 mostró el valor más alto ($1.198 \pm 124,0$ $\text{NH}_4^+ -\text{N} / \text{L}$) como consecuencia de la naturaleza del inóculo (I2) que proporciona una alta concentración de este compuesto. Sin embargo, las diferencias entre los cuatro tratamientos no resultaron estadísticamente significativas ($p>0.05$) tal como se muestra en la Tabla IV.3. En lo que

respecta a la concentración de amoníaco libre, todos los tratamientos presentan valores bajos, principalmente debido a la naturaleza ácida de las biomásas.

Tabla IV.3: Características físico-químicas de los tratamientos

Parámetros	Tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
% ST	7,21 ± 0,39 ^a	6,94 ± 0,31 ^a	6,84 ± 0,30 ^a	6,95 ± 0,34 ^a
% SV (b.s.)	86,39 ± 0,24 ^c	85,15 ± 0,08 ^b	85,26 ± 0,00 ^b	83,42 ± 0,17 ^a
DQO, (mg/L)	84.576 ± 8.045 ^b	65.890 ± 6.007 ^a	66.747 ± 5.189 ^a	67.243 ± 4.694 ^a
pH	6,18	6,40	6,49	6,45
AT (mg CaCO ₃ /L)	4.776 ± 28 ^a	4.996 ± 129 ^b	5.264 ± 36 ^c	5.010 ± 155 ^b
AP (mg CaCO ₃ /L)	867±32 ^a	1.357±146 ^b	1.641±35 ^c	1.302±69 ^b
AI (mg CaCO ₃ /L)	3.909±15 ^b	3.639±27 ^a	3.623±69 ^a	3.708±95 ^a
RA	4,51 ^c	2,68 ^b	2,21 ^a	2,85 ^b
NH ₄ ⁺ (mg/L)	1.021,0 ± 37,9 ^a	922,1 ± 76,5 ^a	1.198 ± 124,0 ^a	1.016,5 ± 176,1 ^a
NH ₃ (mg/L)	1,8±0,1 ^a	2,8±0,2 ^{ab}	4,4±0,5 ^c	3,4±0,6 ^b

Los valores que se muestran en la tabla son valores medios de las repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra en la misma fila no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) de acuerdo con el procedimiento de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD test)

4. 1. Producción de metano y eficiencia del proceso en términos de remoción de materia orgánica

La experiencia fue llevada a cabo por un período de 140 días, correspondiente al tiempo en donde la producción de biogás comenzó a descender hasta alcanzar valores de producción casi nulos. La producción final de biogás y metano para cada uno de los tratamientos como valor medio de las experiencias realizadas se muestra en la Figura IV.1, donde la producción acumulada de biogás alcanza 6.376 ± 14 , 8.417 ± 108 , 19.005 ± 32 y 20.384 ± 2.232 mL para T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Por su parte, en lo que respecta a la producción de metano, el tratamiento T3 resultó ser el tratamiento con la mayor productividad obteniendo 13.538 ± 1.312 mL CH₄, seguido por T2 con 12.865 ± 85 mL, T1 con 4.352 ± 44 mL y T0 con 3.250 ± 29 mL.

El análisis de la influencia de los inóculos sobre el proceso de DA se puede llevar a cabo al comparar las producciones de biogás y metano de los distintos tratamientos respecto al tratamiento control (T0). Para T2 y T3 en donde se utilizaron PC y lodos de depuradora como inóculos, el biogás generado resultó 198% y 219% superior a T0, mientras que en términos de generación de metano el incremento resultó de 296% y 317% respectivamente. Por su parte, la aplicación del rumen (T1) mejoró sólo 32,0% y 33,9% la producción de biogás y de metano respectivamente en comparación con T0. Estos resultados también se reflejan en la Figura IV.1 donde se muestran las diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos tanto para la producción de biogás como de metano. Mientras que para T2 y T3 existen diferencias significativas al 95% de confiabilidad con el control (T0), para T1 las diferencias resultaron ser no significativas.

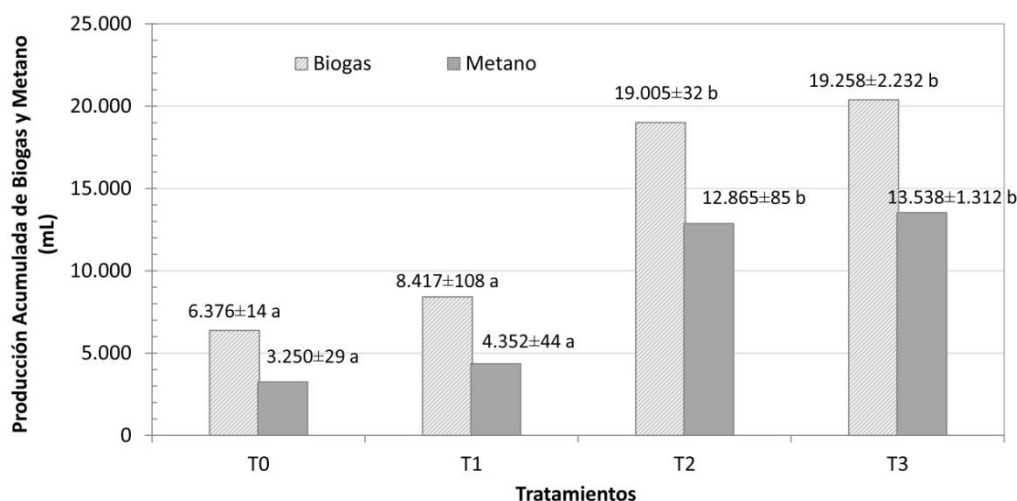


Figura IV.1: Producción acumulada de biogás y metano

La fracción de metano en el biogás resultó ser de 51,0, 51,7, 67,7 y 66,4% para los tratamientos T0, T1, T2 y T3 respectivamente, lo que indica que la utilización de un inóculo adecuado para el proceso no sólo permite incrementar la producción de biogás, sino también mejorar su calidad en términos del contenido energético.

Tal como se indicó en el *Capítulo III. Sección 3.1. Análisis de la biodegradabilidad de los sustratos*, otra de las maneras de analizar la eficiencia del proceso es en función de la remoción de materia orgánica en términos de SV y/o DQO. Más aun la producción de biogás tanto como la de metano están relacionadas con la materia orgánica disponible en el sistema (SV y/o DQO alimentados al reactor), la relación entre estos dos parámetros es la que determina la producción final de metano B_0 (L CH₄/g SV o L CH₄/g DQO), aunque también puede ser relacionada con la materia orgánica degradada durante el proceso, lo que definirá el parámetro B_u (L CH₄/g SV_{removidos}).

La remoción de materia orgánica en términos de SV y DQO se informa en la Tabla IV.4, en donde los tratamientos que lograron una mayor remoción de materia orgánica corresponden a T2 y T3 con valores de 46,0 y 49,8% para la remoción de SV y 53,0 y 52,0% de remoción de DQO respectivamente en comparación con T0 cuyos valores de remoción alcanzaron el 32,0% de SV y el 18,4% de DQO, mientras que T1 presentó valores de remoción de 35,9% en SV y de 14,6% de DQO. Si se considera que la producción de metano proviene de la digestión de los componentes orgánicos que componen el sustrato, principalmente carbohidratos, proteínas y lípidos (Moller et al., 2004), una mayor producción se reflejará en una mayor remoción de materia orgánica.

La producción de metano en términos de SV añadidos al reactor, denominada producción final de metano (B_0) también se muestra en la Tabla IV.4. El tratamiento con rumen como inóculo (T1) produjo sólo un 34,5% más metano que T0 (sustrato sin inóculo), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos valores (0,058 y 0,078 LCH₄/g SV para T0 y T1 respectivamente). Los tratamientos T2

y T3 produjeron 320,7% y 341,4% más metano por unidad de SV que T0, no observándose diferencias significativas a $p > 0,05$ entre ellos. Los valores finales de producción de metano obtenidos en T2 ($0,244 \pm 0,002$ L CH₄/g VS) y en T3 ($0,256 \pm 0,025$ L CH₄/ g VS) resultaron inferiores a los informados por Chynoweth et al., (1999) quienes reportan una producción potencial típica para el PC en el rango 0,32-0,48 L CH₄/g VS con un 40 a 60% de remoción de materia orgánica, aunque estos valores dependen fuertemente del tipo y composición de la alimentación de los animales. El valor de este parámetro sugerido en las Directrices del IPCC 2006 (National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006) para la estimación de las emisiones de metano de las aguas residuales porcinas para la región de América Latina es $0,29 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg VS}$, 13,3% mayor que el valor obtenido experimentalmente por T3.

Tabla IV.4: Resumen del desempeño de los tratamientos

Tratamiento	Remoción de Materia Orgánica		Producción Final de Metano	
	%DQO	%SV	B ₀ (L CH ₄ /g SVi)	Bu(L CH ₄ /g SVr)
T0	18,41± 6.0 ^a	32,01± 2.0 ^a	0,058 ± 0,0005 ^a	0,181 ± 0,010 ^a
T1	14,61± 3.3 ^a	35,85± 1.6 ^{ab}	0,078 ± 0,0008 ^a	0,227 ± 0,008 ^a
T2	53,06± 2.2 ^b	46,03± 6.4 ^{ab}	0,244 ± 0,002 ^b	0,534 ± 0,077 ^b
T3	52,05± 9.2 ^b	49,85± 7.6 ^b	0,256 ± 0,025 ^b	0,517 ± 0,029 ^b

i: inicial, r: removido. Los valores son medias de repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) según prueba LSD's.

4. 2. Análisis de la cinética de la producción de metano

De acuerdo con Gerardi, (2003), las únicas bacterias que son capaces de producir metano son las metanogénicas, y su actividad puede ser determinada a partir de los cambios en la concentración de los AGV o a través de la producción de metano. En función de esto, el estudio de la cinética del proceso para los diferentes tratamientos se realizará a través del análisis de las variaciones en el comportamiento de la producción diaria de metano, tanto en volumen como en porcentaje.

4. 2. 1. Variación de los porcentajes de metano

En la Figura IV.2 se muestra la variación en los porcentajes de metano y dióxido de carbono a lo largo de los 140 días de experiencia para cada uno de los tratamientos. Durante los primeros cinco días, correspondiente a lo que se podría considerar como la puesta en marcha del proceso, los porcentajes de ambos gases (metano y dióxido de carbono) crecen rápidamente hasta alcanzar valores cercanos al 50% en promedio en todos los tratamientos. Más allá de estos primeros días, los tratamientos comienzan a diferenciarse. En T0, correspondiente al tratamiento control la concentración de metano disminuye progresivamente a partir del valor inicial máximo, hasta alcanzar un valor mínimo de alrededor del 22% al día 60, a partir del cual comienza a crecer nuevamente hasta alcanzar un máximo de 72,95% CH₄ al día 125. Para el resto de los tratamientos, T1, T2 y T3, también se observa una leve disminución en la concentración de metano pero no tan marcada como en T0, ya que sus valores mínimos se dan entre los días 20 a 40 con concentraciones que se encuentran en el rango comprendido entre 40-50%. A partir del

día 40 se puede verificar un rápido aumento de los porcentajes de metano para los tratamientos con inóculo, alcanzando para el día 60 (correspondiente al mínimo de T₀) valores de 64,9, 68,6 y 66,2% CH₄ para T₁, T₂ y T₃ respectivamente. A partir del día 60 y hasta el final de la experiencia, las concentraciones de metano promedian el 60%, alcanzando un máximo de 69% al día 68 para T₁, mientras que para T₂ y T₃, el contenido en metano varió en el rango 70 - 80% alcanzando porcentajes máximos de 78,8 y 76,9 para los días 103 y 118 respectivamente. A partir de estos resultados se evidenció que el inóculo, en general evitó un brusco decrecimiento del contenido de metano, pero además cada inóculo influyó sobre el sistema de manera particular, siendo I₂ e I₃ los que favorecieron una mayor concentración de metano para este sustrato en comparación con I₁.

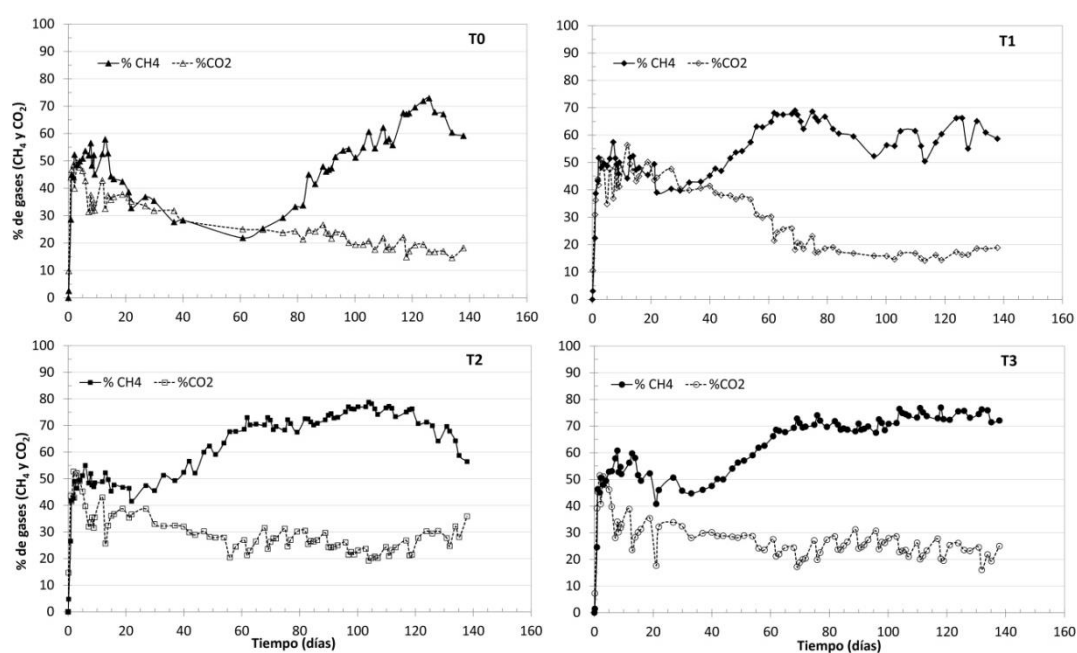


Figura IV.2: Variación de los porcentajes de CH₄ y CO₂ a lo largo de la experiencia para cada tratamiento.

4. 2. 2. Análisis de la velocidad de producción de metano

La velocidad de producción de metano para cada tratamiento, determinado como el volumen producido en mediciones sucesivas dividido por el tiempo transcurrido entre dichas mediciones, se muestra en la Figura IV.3. Para cada uno de los tratamientos, se puede distinguir dos etapas de elevada velocidad de generación de metano, separadas entre sí por una fase intermedia de baja producción. La primera etapa corresponde al periodo comprendido desde el inicio del proceso hasta el día 20 aproximadamente; mientras que la segunda etapa se extiende por un periodo más prolongado que la primera y se inicia después de la fase intermedia de baja o nula producción.

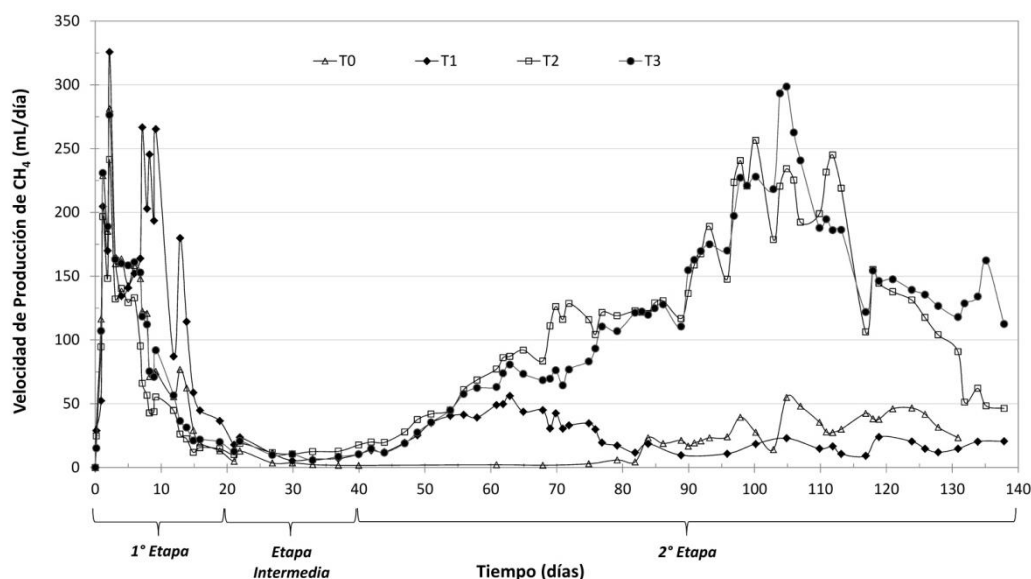


Figura IV.3: Velocidad de producción de metano (mL/día).

Durante las primeras 48 horas de proceso aproximadamente, se observa un rápido aumento en la velocidad de generación de metano, alcanzando durante este período picos de máxima producción. El valor más alto observado fue para el tratamiento T1 con 325 mL CH_4 /día, seguido por T0 con 281 mL CH_4 /día, T3 con 276 mL CH_4 /día y T2 con 241 mL CH_4 /día. El análisis estadístico de estos valores muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). Por lo cual, estas elevadas velocidades de producción podrían explicarse por la acción del consorcio bacteriano aportado por el propio sustrato (PC), ya que, en el caso de T0, el cual no posee ningún inóculo, las velocidades de producción son comparables al resto de los tratamientos, lo que da un indicio de que esta producción es debida principalmente al sustrato y no a los inóculos. A partir de estos picos máximos, la tasa de producción de metano disminuye hasta alcanzar los valores mínimos, desde casi nulo para T0, 5,4 mL/día para T1, 10,6 mL/día para T2 y 5,7 mL/día para T3. Esta etapa intermedia de baja producción se extiende hasta el día 75 aproximadamente para T0, mientras que para el resto de los tratamientos, el inóculo influye acortando este periodo de baja producción, permitiendo que la segunda etapa de crecimiento exponencial se inicie a partir del día 40 aproximadamente. La fase intermedia de baja producción podría ser considerada como una fase de retardo inducida. De acuerdo a Swinnen et al., (2006) la fase de retardo es observada como un retraso en el crecimiento de las poblaciones microbianas causada por un cambio repentino en algún parámetro ambiental como por ejemplo la temperatura. En este caso, cuando el sustrato es colocado en el digestor, la temperatura de la biomasa cambia repentinamente desde la temperatura ambiente de 5 a 15°C aproximadamente a 35°C correspondiente al régimen mesofílico. Estos cambios inducen una fase de retardo en el proceso, y como consecuencia la producción de metano decrece alcanzando producciones casi nulas para T0. En los tratamientos donde se aplicó inóculo, se puede observar la misma fase de retardo inducida pero de menor duración en relación al control lo que sugiere que la población microbiana aportada por el inóculo permite una recuperación más rápida del proceso.

La segunda etapa de producción de metano comienza por lo tanto, después de la fase intermedia o fase de retardo inducida. Durante esta etapa, T0 consigue un máximo de 54,97 mL CH₄/día el día 104 a partir del cual la producción se mantiene en un valor promedio hasta el final de la experiencia de $34,7 \pm 9,1$ mL/día. Para T1, T2 y T3, las tasas máximas resultaron 56,09, 256,50 y 298,61 mL CH₄/día alcanzadas en los días 62, 100 y 105 respectivamente. Estos resultados muestran que el inóculo acertó la fase intermedia y favoreció una mayor producción de metano. A pesar de que la segunda etapa de crecimiento exponencial comienza aproximadamente al día 53 para todos los tratamientos con inóculo, en el tratamiento con rumen (T1) la velocidad de producción permaneció aproximadamente constante en un valor promedio de $26,4 \pm 13,7$ mL CH₄/día, mientras que T2 y T3 continuaron incrementando su velocidad de producción alcanzando valores promedios para la segunda etapa de $120,7 \pm 68,1$ mL/día y $124,4 \pm 71,6$ mL CH₄/día, respectivamente. Los resultados obtenidos evidencian que tanto la acción del inóculo como la naturaleza del mismo influyen sobre las etapas de producción de metano, lo cual, considerando la carga bacteriana específica aportada por cada uno evidencia lo afirmado por Gerardi, (2003) en relación a que no todas las bacterias metanogénicas pueden utilizar todos los sustratos disponibles. De los inóculos utilizados, el PC digeridos y los lodos de depuradora resultaron ser los mejores inóculos para la producción de metano en la DA de PC fresco debido a que no sólo permitieron una recuperación más rápida de la fase de latencia inducida, sino que además aumentaron significativamente la producción de metano.

4.3. Análisis del proceso en términos de los distintos tipos de alcalinidades

4.3.1. Análisis de los AGV y AP

La medición de la alcalinidad intermedia (AI) da información sobre la concentración de los AGV en el sistema. Tal como se observa en la Tabla IV.3, al inicio de la experiencia los distintos tratamientos presentan elevadas concentración de estos compuestos, variando desde 3.623 mg CaCO₃/L para T2 a 3.909 mg CaCO₃/L para T0. Estas elevadas concentraciones se pueden explicar a través de la naturaleza del sustrato. Según indica Shao-Pin, (1999) los AGV son subproductos del proceso de digestión de los animales rumiantes y por lo tanto las aguas residuales de las granjas de cerdos contienen una alta proporción de estos compuestos. Las elevadas velocidades iniciales de producción de metano que se observaron en la Figura IV.3 están asociadas al consumo de los AGV disponibles en el digestato, aunque solo se observa una leve disminución en el tratamiento T3 en la primera semana de experiencia, en los demás tratamientos, la concentración de AGV aumenta desde el inicio como resultado de que la velocidad de formación de dichos ácidos es mayor que la de su consumo. Vinculada a esta producción de metano, la AP (asociada a la capacidad buffer) experimenta un leve aumento en sus valores, alcanzando concentraciones próximas a los 2.000 mg CaCO₃/L (Figura IV.4). Este aumento es el resultado de la descomposición de los compuestos orgánicos (proteínas y aminoácidos) que en el proceso liberan amoníaco y dióxido de carbono permitiendo el crecimiento de AP y favoreciendo el aumento de la capacidad tampón de la sistema (Cuetos et al., 2009; Gerardi, 2003; Ward et al., 2008), tal como fue explicado en el *Capítulo II. Sección 3.4.*

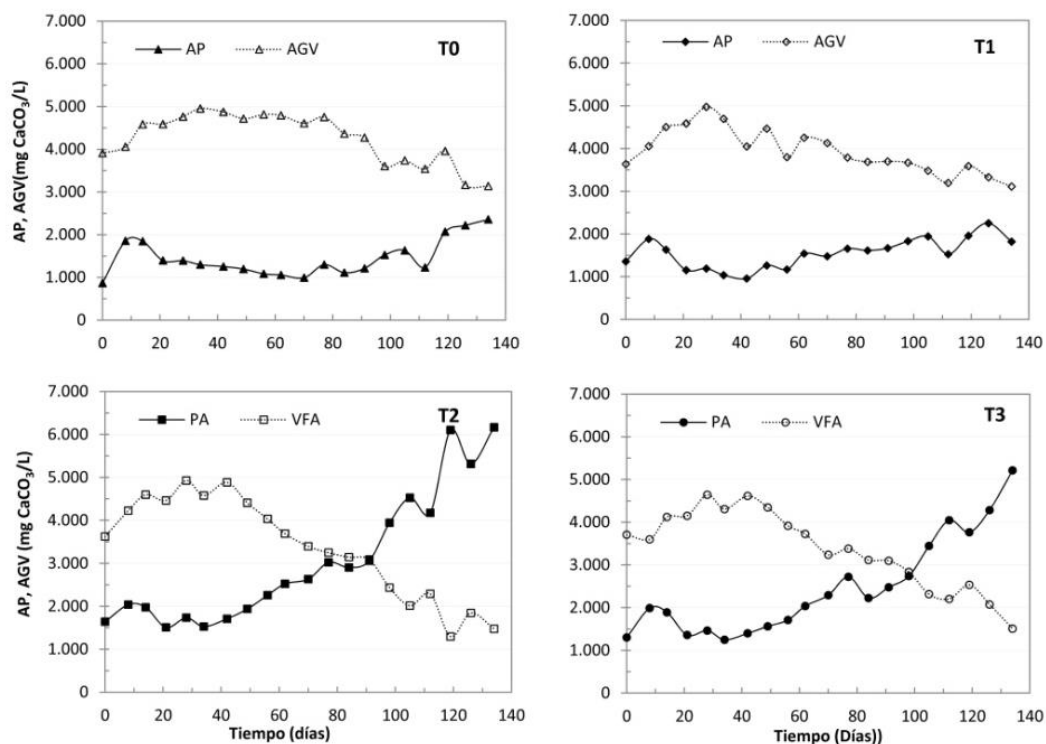


Figura IV.4: Evolución de la Alcalinidad y los AGV a lo largo de la experiencia.

Después de la etapa inicial de aproximadamente 15 días, se observa que la concentración de AGV continua aumentando para todos los tratamientos hasta alcanzar valores cercanos a los 4.900 mg CaCO₃/L hacia el día 40 aproximadamente. El máximo valor se observa para el tratamiento T1, el que alcanza 4.976 mg CaCO₃/L, seguido por T2 con 4.927, T0 con 4.953 y finalmente T3 con 4.614 mg CaCO₃/L. Las elevadas concentración de AGV consumen parte de la AP disminuyendo su concentración, y por lo tanto la capacidad buffer del sistema Figura IV.4.

Tal como fue mencionado anteriormente, la producción de metano durante la segunda etapa es el resultado de la acción de las bacterias aportadas por los inóculos, las cuales necesitan tiempos de adaptación al nuevo medio de aproximadamente 40 días; este resultado concuerda con lo reportado por Gerardi (2003), quien indicó que las bacterias metanogénicas presentan velocidad de crecimiento baja, que va desde unos pocos días hasta un período de una semana. Una vez adaptadas estas bacterias comienzan a producir metano a expensas del consumo de AGV disponible. Este comportamiento se puede observar claramente en T2 y T3 en donde la concentración de los AGV se reduce en un 70%^b y 67.3%^b respectivamente, mientras que para T0 y T1 sólo se consumieron 36.6%^a y 37.5%^a de la AGV disponibles (Figura IV.4). Letras diferentes en los porcentajes de consumos de AGV de los tratamientos indican diferencias significativas al 95% de confiabilidad. Estos resultados mostraron que las bacterias proporcionadas por I2 no fueron capaces de consumir la AGV disponible, disminuyendo el potencial de producción de metano para este sustrato. Las concentraciones de AGV al final del proceso fueron de 1.476 mg CaCO₃/L para T2 y de 1.509 mg CaCO₃/L para T3, valores inferiores a los obtenidos para T0

(3,178 mg CaCO_3/L) y para T1 (3,112 mg CaCO_3/L) lo que indica que aquellos inóculos que provean bacterias metanogénicas que sean capaces de adaptarse al nuevo medio y que puedan alimentarse de los sustratos disponibles, serán capaces de promover el consumo de AGV evitando su acumulación y propiciando la generación de metano. En los tratamientos T0 y T1 la elevada producción de AGV observada durante los primeros días, y su bajo consumo, ocasionan un exceso de AGV que podría desestabilizar el sistema, inhibiendo la acción metanogénica aun cuando los valores de pH (Figura IV.5) se encuentren dentro del rango ($6 < \text{pH} < 8$) establecido como adecuado para la subsistencia de las bacterias metanogénicas (Gerardi, 2003). Los resultados observados con respecto al rumen son análogos a los obtenidos por Yue et al., (2012), quienes utilizaron rumen y lodos de depuradora como inóculos para la DA de plantas acuáticas, encontrando que los reactores inoculados con rumen presentan una mayor actividad de los microorganismos hidrolíticos, que se observa como una mayor velocidad de producción de AGV, mientras que los lodos de depuradora presentan una elevada actividad metanogénica observada como una mayor producción de metano.

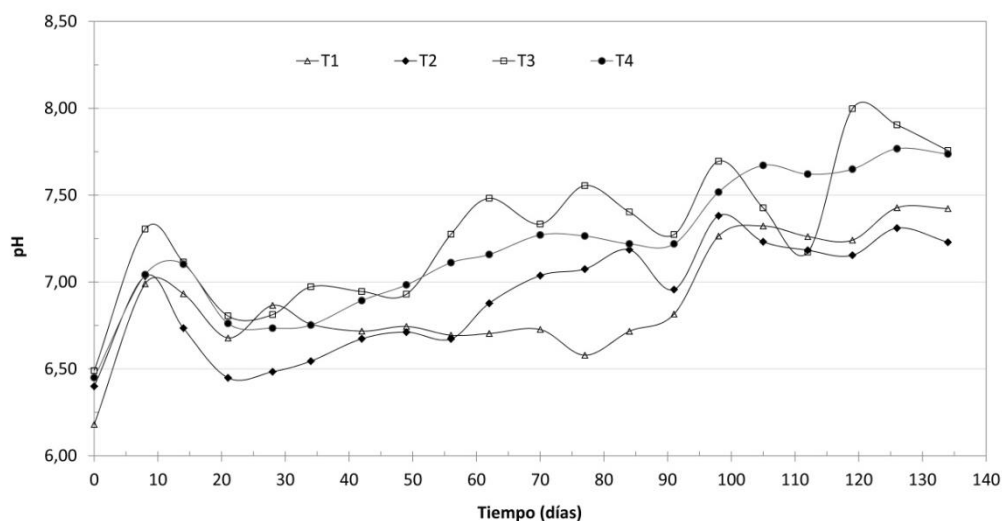


Figura IV.5: Variación de los valores de pH a lo largo de la experiencia

La AP para T0 disminuye desde el día 15 hasta aproximadamente el día 70, a partir de este punto comienza a aumentar lentamente, alcanzando un valor final de 2.358 mg CaCO_3/L ; T1 mostró un comportamiento similar, aunque la duración del período de disminución fue más corto, comenzando a aumentar a partir del día 42, logrando una alcalinidad final de 1.820 mg CaCO_3/L ; en T2 y T3 la alcalinidad mostró un crecimiento sostenido a partir de sus valores mínimos alcanzados entre los días 20 y 40, resultando en valores finales de 6.168 y 5.215 mg CaCO_3/L respectivamente (Figura IV.4). La comparación entre las Figura IV.4 (AI y AP) y Figura IV.5 (pH), muestra que los valores de pH siguen un patrón similar al de la AP.

4.3.2. Análisis de la RA

La Figura IV.6 muestra la relación de alcalinidad (RA), que como ya se ha indicado anteriormente brinda información sobre la estabilidad del proceso y relaciona la alcalinidad intermedia y la alcalinidad parcial.

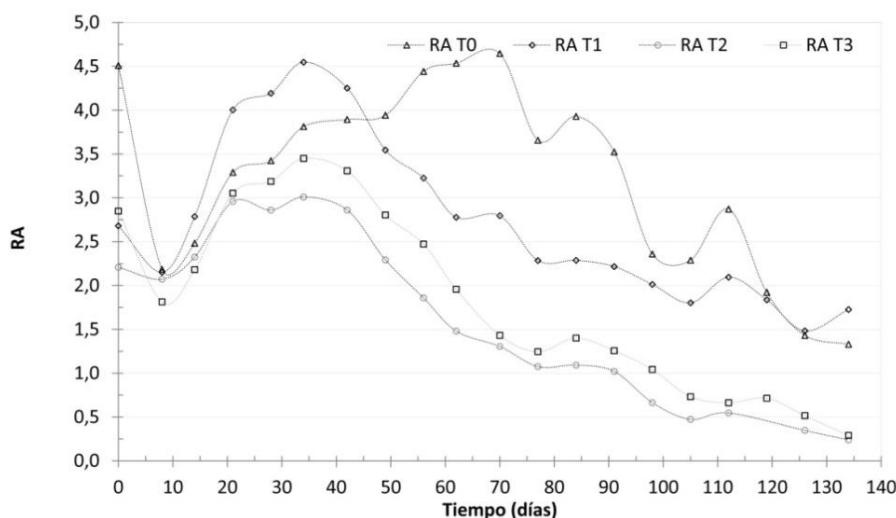


Figura IV.6: Relación de Alcalinidad (RA)

Valores de RA superiores a 0,4 indican acumulación de AGV y posible desestabilización del sistema (Campos Pozuelo, 2001). Una elevada actividad metanogénica, se asocia a la producción de metano, al consumo de AGV, al aumento de la capacidad tampón del sistema y por lo tanto a la disminución de la RA. Tanto en T0 como en T1, la menor producción de metano se ve reflejada en una disminución menor de la RA; mientras que en T2 y T3, tanto el aumento en la tasa de consumo de AGV así como el aumento la de la AP promovieron una disminución mayor de la RA. En T2, sólo después del día 90, la RA disminuyó a valores por debajo de 1,0, alcanzando una AP de 3.058 mg CaCO_3/L . Por su parte, T3 logró una RA inferior a 1 al día 98, registrando un valor de alcalinidad de 2.741 mg CaCO_3/L . Sin embargo ni T0, ni T1 fueron capaces de alcanzar una RA inferior a 1 en el periodo de análisis. Solo al final del proceso, los tratamientos T2 y T3, alcanzan valores de la RA por debajo de 0,4, valor sugerido para un sistema estable. En este sentido, según informa (Drosg, 2013), el valor absoluto de la RA para una determinada planta de biogás es única para dicha planta y el valor no es comparable con otras, aunque resulta una herramienta poderosa para realizar el control del sistema. Esto explicaría por qué aun cuando RA se encuentra en todo el proceso por encima del valor 0,4, el sistema aún es capaz de producir metano en forma estable y sostenida.

4.4. Producción acumulada de metano

De la Figura IV.7, se observa que la producción acumulada de metano, presenta dos etapas de producción exponencial con una fase intermedia de latencia en donde la producción es nula y/o mínima. Durante la primera etapa se producen 2.318 mL CH_4 en T1, seguido de 1.692 mL para T0, 1.668 mL para

T3 y 1.271 mL para T2. Estos valores representan 52,1, 53,3, 9,9 y 3,7% del total de la producción de metano acumulado para T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Después de la fase de latencia, durante la segunda etapa se produjeron 1.557 (T0), 2.033 (T1), 11.593 (T2) y 11.870 mL CH₄ (T3) evidenciando que tanto I2 como I3 resultaron los inóculos más adecuados para la producción de metano.

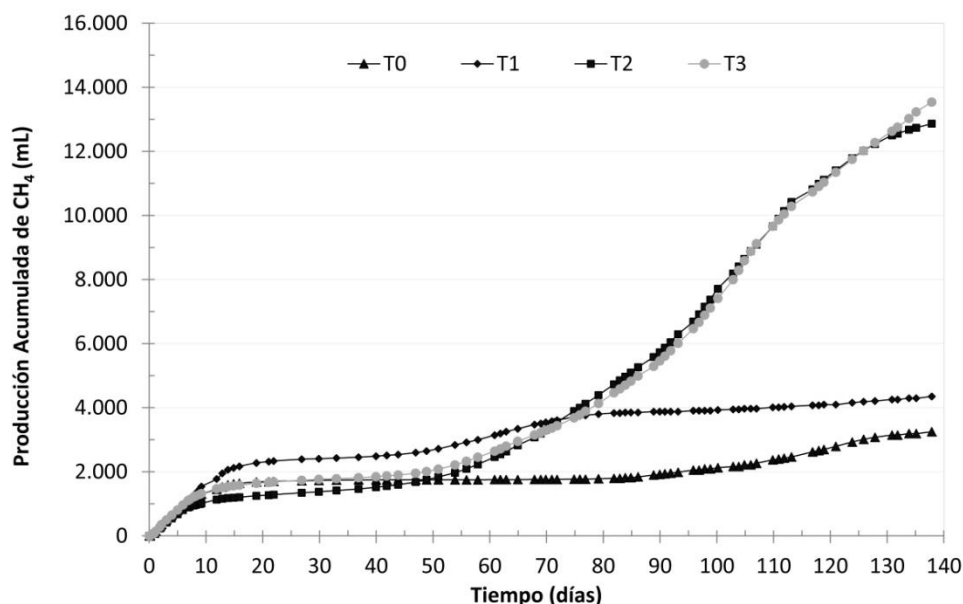


Figura IV.7: Producción acumulada de CH₄ para los cuatro tratamientos

Desde el punto de vista cinético, el tratamiento control (T0), en donde no se utilizó ningún inóculo mostró la fase de intermedia de producción nula de metano más larga, el menor consumo de AGV y por lo tanto, la menor producción final de metano. La utilización de un inóculo, cualquiera de ellos, contribuyó a reducir la duración de la fase intermedia, a aumentar la tasa de producción de metano durante la fase exponencial permitiendo finalmente una mayor generación final de metano a partir de un mismo sustrato, aunque estos parámetros son particulares para cada uno de los inóculos utilizados.

El comportamiento de todos los tratamientos en cuando a la existencia de dos etapas podría explicarse en función de la RSI, la cual en la experiencia realizada corresponde a valores de 1/0,05-0,06, una relación elevada en relación a los sugerido por algunos autores tales como Angelidaki et al., (2009); González-Fernández y García-Encina, (2005); Neves et al., (2004) quienes proponen que la RSI debe ser de al menos 1 a fin de evitar tiempos largos de digestión y la acumulación de AGV con la posterior desestabilización del proceso por la acidificación del reactor. Sin embargo, tal como indica Campos Pozuelo, (2001) la utilización de una baja concentración de inóculo, permite por un lado, analizar la viabilidad del proceso evitando enmascarar problemas de inhibición y pudiendo determinar la etapa limitante de la velocidad global del proceso. En función de los resultados encontrados, en donde se observó por un lado, que todos los tratamientos presentaron una rápida producción de AGV, y por otro, el bajo consumo de estos productos intermedios y la baja producción de metano en T0 en comparación con T2 y T3, se podría indicar que bajo las condiciones de estudio y en función de la alta RSI utilizada, la

etapa metanogénica podría ser considerada como la etapa limitante del proceso. Este resultado está relacionado con lo reportado por Veeken y Hamelers, (1999), quienes indican que la acumulación de los productos intermedios (AGV e hidrógeno) será el resultado de que la etapa hidrolítica presente una velocidad mayor que la metanogénica. Si bien para este tipo de residuos algunos autores reportan a la etapa hidrolítica como la etapa limitante de la velocidad del proceso, otros como Pavlostathis y Giraldo-Gomez, (1991) han reportado que la etapa hidrolítica podría afectar a la cinética del proceso global aun cuando se haya identificado a las etapas acidogénicas y/o metanogénicas sean las limitantes de la velocidad.

5. Conclusiones

La inoculación de PC fresco permitió incrementar no sólo la producción de biogás, sino también mejorar su calidad en términos del contenido energético, es decir, aumentar la concentración de metano en el biogás.

De los tres inóculos utilizados, los lodos de depuradora y el PC previamente digeridos mostraron una mejor capacidad que el rumen para actuar como promotores de la metanogénesis cuando se utiliza PC como sustrato. Ambos inóculos consiguen mayor porcentaje de remoción de materia orgánica (cerca del 50% en términos de remoción en SV y DQO) y mayor productividad de metano, alcanzando 0,25 L CH₄/g SV, cercano a los valores de la literatura. El rumen, en cambio, no produjo diferencias significativas en cuanto a la producción de metano y a la remoción de materia orgánica al comprar los valores obtenidos con el control (sustrato sin inóculo).

Las bajas concentraciones de inóculo utilizado conllevan largos periodos de adaptación del consorcio microbiano de aproximadamente 40 días antes del inicio de la fase exponencial de producción de metano. La naturaleza del sustrato como soporte de un consorcio microbiano permitió identificar una cinética de producción de metano en dos etapas: la primera generada por el sustrato en sí mismo, la cual disminuye rápidamente como consecuencia de los cambios de temperatura que sufre el sustrato lo que induce una fase intermedia de baja producción, y una segunda etapa más prolongada de producción en donde se alcanzó la máxima producción potencial de metano y cuya duración dependió del tipo de inóculo utilizado. La evolución de AGV y alcalinidad permitió explicar los resultados observados en cuanto a la cinética de producción de metano.

Para el sustrato estudiado, el rápido crecimiento en la concentración de los AGV, así como el largo tiempo que esta concentración se mantuvo en el digestor, dieron una indicación de que la etapa metanogénica fue el paso limitante de la velocidad global de proceso bajo las condiciones estudiadas.

La evolución de la RA mostró durante todo el proceso valores mayores al sugerido para asegurar un proceso estable, sin embargo, los resultados mostraron que durante el inicio del proceso este parámetro puede ser mayor que el indicado en la bibliografía sin afectar la producción de metano.

CAPITULO V

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO

1. Introducción

Tal como ha sido mencionado anteriormente, para que el proceso anaeróbico evolucione correctamente, se requiere de la presencia en el sistema de una gran diversidad de microorganismos que permitan degradar la materia orgánica, generando biogás como producto final de la degradación (Ahrling et al., 1995; Hegde y Pullammanappallil, 2007; Ward et al., 2008). Es por esta razón que resulta fundamental utilizar un inóculo que sea capaz de proveer todos los microorganismos necesarios (Angelidaki y Sanders, 2004). Como ya se ha demostrado en el capítulo IV, existen diferentes tipos de residuos que pueden utilizarse como inóculo en el proceso anaeróbico y que según sus características físicas y químicas actúan en mayor o menor medida favoreciendo la producción de metano. Además de las características intrínsecas a cada uno de ellos, influye la cantidad de inóculo que se añade al sistema. Por lo general es deseable utilizar bajas cantidades de inóculo, ya que podría distorsionar los resultados si la producción de biogás por parte de este es alta en comparación con la del sustrato de estudio. En contraste, la utilización de bajas concentraciones de inóculo podría llevar a la sobrecarga del proceso con la correspondiente acidificación del reactor (Angelidaki y Sanders, 2004).

Según indica Angelidaki et al., (2009), la cantidad de inóculo a añadir por unidad de sustrato en términos de SV, también denominada relación sustrato/inóculo (RSI) ha sido reconocida como uno de los parámetros que más afectan el resultado de la DA. La actividad y concentración de los microorganismos (biomasa) del inóculo, así como de la concentración y biodegradabilidad del sustrato definen el volumen de inóculo a utilizar. A mayor número de microorganismos, menor será la cantidad de inóculo necesario para lograr un proceso eficiente, reduciendo el volumen del digestor, así como el tiempo de proceso. Resultados similares han sido reportado por Forster-Carneiro et al., (2008); Lopes et al., (2004) y Neves et al., (2004), quienes indicaron que la cantidad de inóculo añadido es un factor crucial en el funcionamiento de un reactor, ya que si la cantidad utilizada no es la adecuada pueden presentarse problemas de inhibición por acumulación de AGV, como consecuencia de una baja cantidad de bacterias metanogénicas presentes en el reactor.

Varios autores han analizado el efecto de la RSI sobre diferentes tipos de sustratos, utilizando valores de esta relación muy dispares. En este sentido Gunaseelan, (2007) ha sugerido la utilización de una RSI de 1:1 para la determinación del potencial bioquímico de metano (PBM), el cual permite determinar la biodegradabilidad y la producción potencial de metano de un determinado sustrato. Por su parte, Chynoweth et al., (1993) propone utilizar una RSI de 1:2 en el caso de sustratos o residuos más recalcitrantes y de difícil tratamiento mediante DA. Mientras Lesteur et al., (2010) reportan que RSI de entre 1:1 y 1:3 son generalmente elegidas por los investigadores, aunque la relación que optimiza el proceso dependerá fuertemente del sustrato utilizado. Estos autores también indican que para la selección de la RSI óptima debe tenerse en cuenta varios parámetros, entre ellos, la producción de biogás del propio inóculo, la fase de retardo (tiempo de adaptación de las bacterias al medio) que pueda tolerarse y la capacidad buffer del sistema. Si bien estos autores recomiendan concentraciones de

inóculo elevadas de una parte de inóculo por cada parte de sustrato o aún mayores, del análisis de los distintos trabajos que se encuentran en la literatura se observa que en general la RSI utilizada puede variar en un amplio rango, encontrando resultados muy diversos.

Según reporta Raposo et al., (2006), quienes trabajaron con ensilado de maíz como sustrato y lodos de depuradora como inóculo con diferentes RSI (1, 0,66, 0,5 y 0,33 a 1), encontraron que este parámetro tuvo un efecto preponderante sobre la cinética del proceso, especialmente sobre la fase de retardo, aunque no observaron diferencias en la producción específica de metano, la cual, según estos autores, sólo dependió del contenido de materia orgánica del sustrato. Por su parte Zhou et al., (2011) quienes trabajaron con el residuo de la producción de tofu en régimen mesofílico utilizando 13 valores de RSI entre 0,1 y 3, encontraron que la producción de metano depende fuertemente de la RSI, presentando una tendencia lineal y creciente cuando se trabaja con RSI de 0,1 a 0,6, mientras que la máxima producción se obtiene en el rango 0,6-0,9. A valores superiores de la RSI disminuye la producción de metano como consecuencia de un cierto grado de acumulación de los AGV.

Sin embargo, no todos los autores han trabajado con RSI tan bajas como propone Lesteur et al., (2010); o como ha utilizado Raposo et al., (2006). En este sentido, Cheng y Zhong, (2014), quienes trabajaron con tallos de algodón como sustrato con RSI variable entre 1 y 6, encontraron que solamente se presentó un cierto grado de inhibición para la mayor RSI (6:1), lo que redujo la producción final de metano; en contraste para el resto de las RSI utilizadas no se observaron diferencias en la producción de metano. Por su parte Neves et al., (2004) analizaron la influencia de la RSI sobre residuos de comida, trabajando con dos tipos de inóculo (barros suspendidos y barros granulares) y con RSI entre 0,5 y 2,3 a 1, encontrando que el lodo granular logró evitar la acidificación del reactor en todo el rango de RSI estudiado, pero los lodos suspendidos previnieron la acidificación sólo en los valores de RSI más bajos, demostrando que el tipo de inóculo define cuál RSI es óptima en función de su actividad metanogénica. Liu et al., (2009) demostraron que durante la DA de residuos orgánicos con RSI variables entre 1,6 y 5 en régimen termofílico la producción de metano disminuye cuando aumenta la RSI, lo que fundamentan en base a una menor actividad metanogénica observada como resultado de menor cantidad de inóculo añadido al sistema.

Del análisis de la bibliografía consultada se desprende, que las diferencias encontradas por los distintos autores son la consecuencia de que sobre el proceso influyen el tipo del inóculo utilizado, su actividad metanogénica, así como su interacción con el sustrato. Por lo tanto, no es posible concluir de antemano cuál será la RSI que permita una adecuada evolución del proceso, sino que será necesario llevar a cabo un análisis de cada caso en particular.

En el capítulo IV se demostró que el inóculo ejerce una acción favorable sobre la producción de metano con diferencias significativas según su naturaleza. De los tres inóculos estudiados, el PC digerido y los lodos de depuradora lograron incrementar la producción de metano alrededor de 300% en comparación

con el sustrato sin inóculo, aunque la baja concentración utilizada (RSI 14:1) prolongó los tiempos del proceso y generó un cierto grado de acumulación de AGV. De todos los inóculos analizados, los lodos de depuradora demostraron una acción sinérgica para la producción de metano cuando el sustrato es PC fresco. Sobre estos resultados y considerando que tienen alta disponibilidad (constituyen los residuos sólidos de las plantas cloacales) y que no requieren de tratamientos previos, se propone utilizar este inóculo para estudiar el efecto de la RSI sobre la producción de metano de los tres sustratos (PC, SL y FORSU), los cuales serán a analizados posteriormente en el proceso de co-digestión.

2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es encontrar la RSI óptima que maximice la producción de metano y la capacidad volumétrica del reactor sin inhibir el proceso de DA utilizando los tres sustratos (PC, SL y FORSU). Se evaluará el grado de remoción de materia orgánica y la evolución de la concentración de AGV, AP y pH del sistema como indicadores de la eficiencia del proceso. Además se estudiará la cinética de la producción de metano utilizando la ecuación de primer orden y la ecuación de Gompertz descriptas en el *Capítulo II. Sección 5.2*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Caracterización de los sustratos e inóculos

Las características físico-químicas de cada uno de los sustratos utilizados y las del inóculo se muestran en la Tabla V.1. Se puede observar que la FORSU, presenta un contenido en ST ($22,45 \pm 0,79\%$) significativamente mayor que el resto de los sustratos y del inóculo; además presenta características similares al SL, ya que ambos poseen un elevado contenido en materia orgánica, tanto en unidades de SV (85,14% y 91,23%) como en DQO (188.670 mg/L y 72.290 mg/L), además de presentar un valor de pH ácido (4,3), lo que hace que su alcalinidad sea nula. Otra de las características de estos sustratos es su baja concentración de nitrógeno amoniacal (283,2 mg/L para FORSU y 126,1 mg/L para SL), comparada con la de PC de 1.959 mg/L.

Si bien el pH del PC es ligeramente más ácido (6,5) que el del inóculo (7,52), la AT del PC es 6.285 mg/L, significativamente mayor a la del inóculo (1.957 mg/L). La RA, que brinda información sobre la relación entre la AI y la AP, indica que los lodos de depuradora corresponden a un sustrato que ya ha sido degradado en gran medida, a diferencia del PC cuya RA es de 3,03, mayor al valor sugerido de 0,3 - 0,4 (Campos Pozuelo, 2001; Ripley et al., 1986). De todos modos, este elevado valor de la RA no impedirá que el proceso de DA evolucione y produzca metano, tal como se observó en el Capítulo IV.

Como indica Moller et al., (2004), las características físico-químicas del PC dependerán de diversos factores, tales como la alimentación del animal y su edad, la cantidad de agua de lavado utilizada, entre otros. Al comparar las características físico-químicas del PC utilizado como sustrato para la experiencia

del presente capítulo, y el utilizado para la experiencia del *Capítulo IV*, se pueden observar diferencias en todos los parámetros, tanto en el contenido de humedad y de materia orgánica como en los valores de AT, RA, así como en el valor de la concentración de nitrógeno amoniacal. Más adelante cuando se analice la producción de metano, se podrá analizar si las diferencias en estas variables influyen sobre la evolución de la producción de metano.

Tabla V.1: Caracterización físico-química del inóculo y de los sustratos

Parámetros	Inóculo	Sustratos			ANOVA
	Lodos de Depuradora	PC	FORSU	SL	
%ST	4,59±1,04 ^a	5,57±0,66 ^a	22,45±0,79 ^b	5,80±0,02 ^a	(p=0,0000)
%SV (b.s)	56,33±3,09 ^a	82,6±1,01 ^b	85,14±4,55 ^b	91,23±0,06 ^c	(p=0,0000)
DQO (mg/L)	45.267±2.991 ^a	56.109±3.794 ^b	188.670±1.897 ^d	72.290±609 ^c	(p=0,0000)
pH	7,52	6,15	4,3	4,3	
AT (mg CaCO ₃ /L)	1.957±461 ^a	6.285±112 ^b			(p=0,0002)
RA	0,28±0,06 ^a	3,03±0,01 ^b			(p=0,0000)
NH ₄ ⁺ (mg /L)	289,6±69,8 ^b	1.959±50 ^c	283,2±22,2 ^b	126,1±1,1 ^a	(p=0,0000)
NH ₃ (mg /L)	10,8±3,0 ^b	3,2±0,1 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	(p=0,0021)

Los valores que se muestran en la tabla son valores medios de las repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra en la misma fila no presentan diferencias significativas (p>0,05) de acuerdo con el procedimiento de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD test)

3. 2. Diseño Experimental

Del análisis de la bibliografía relevada en el que se ha evaluado la influencia de la RSI sobre el proceso para distintos tipos de sustratos, no se ha observado un patrón definido en cuanto al uso de una determinada cantidad de inóculo. Mientras que algunos autores utilizan RSI elevadas cuando analizan el proceso anaeróbico de diferentes tipos de sustratos (tallos de algodón, residuos sólidos urbanos) (Cheng y Zhong, 2014; Neves et al., 2004), otros utilizan RSI tan bajas como 0,1:1 (Lesteur et al., 2010; Raposo et al., 2006; Zhou et al., 2011). En general se ha respetado que alguna de las experiencias que se desarrollarán contenga una RSI 1:1 sugerida por Gunaseelan, (1997), como adecuada para que el proceso transcurra en forma eficiente. Teniendo en cuenta esta información y con el fin de optimizar la capacidad volumétrica del reactor evitando problemas de inhibición, se definieron las RSI 1:1, 3:1 y 6:1 expresadas en unidades de g SV de sustrato por g SV inóculo para evaluar la evolución tanto del proceso de producción de metano como de los principales parámetros físico-químicos que son indicadores del mismo como pH y alcalinidad.

En la Tabla V.2 se muestra la cantidad de sustrato y de inóculo que fue utilizada en cada tratamiento. Para un determinado sustrato, la cantidad (FORSU) o el volumen (PC, SL) según corresponda se mantuvo constante y se modificó el volumen de inóculo a fin de obtener la RSI seleccionada. Cada tratamiento fue llevado a cabo por duplicado. Dado que el contenido de agua tanto del PC como del SL se encuentra

alrededor de 5% (DA húmeda) no fue necesario el agregado adicional de agua a los reactores. En el caso de FORSU, la Tabla V.2 muestra la cantidad de agua añadida al reactor para que cada tratamiento presente un contenido de ST de aproximadamente 5%. En paralelo a los distintos tratamientos (sustrato + inóculo), se realizó una experiencia control utilizando 500mL de inóculo, a fin de determinar la producción de metano intrínseca al inóculo y poder restarlo de la producción de los distintos reactores con el objetivo final de determinar el valor de B_0 .

Tabla V.2: Diseño experimental

RSI gr SV/gr SV	PC		FORSU*		SL	
	Sustrato [mL]	Inóculo [mL]	Sustrato [gr]	Inóculo [mL]	Sustrato [mL]	Inóculo [mL]
1:1	250	533,3	90	796,5	200	357,4
3:1	250	177,8	90	265,5	200	119,1
6:1	250	88,9	90	132,8	200	59,6

*Cantidad de agua añadida a cada reactor 272 mL.

Las condiciones de acidez y baja alcalinidad que presentan tanto SL como FORSU (Tabla V.1), generan un medio poco propicio para el crecimiento de las bacterias metanogénicas, pudiendo ocasionar un fallo completo en el sistema en el caso de que no se acondicione correctamente el reactor. De acuerdo con Gerardi, (2003), existen varios compuestos químicos que pueden ser utilizados para ajustar la alcalinidad del sistema y el pH, pero aquellos que aportan alcalinidad bicarbonatada son los más aconsejables, debido a que las bacterias metanogénicas requieren de este tipo de alcalinidad. Entre los compuestos químicos que pueden ser utilizados, el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y el bicarbonato de potasio (KHCO_3) son los más recomendados debido a su elevada solubilidad, a su fácil manejo y los mínimos perjuicios sobre el digestor. Teniendo en cuenta estas recomendaciones, se optó por utilizar bicarbonato de sodio para neutralizar la acidez de los sustratos, para lo cual se tomó en consideración el método sugerido por Griffin et al., (1998), que implica el monitoreo y control diario del valor del pH del reactor adicionando un compuesto químico (el autor sugiere carbonato de sodio) para mantener el pH del reactor cercano a la neutralidad. En nuestro caso se utilizó dicho método pero con una leve variación: antes del agregado del inóculo se añadió bicarbonato de sodio al sustrato, hasta alcanzar un pH cercano a la neutralidad ($\text{pH}=7$), para lo cual se verificó diariamente el valor de pH del sustrato por un periodo de 5 días, y se agregó bicarbonato las veces que fueran necesarias. En el caso de FORSU, el pH se mantuvo relativamente constante a lo largo de este periodo después del primer agregado de bicarbonato, mientras que para SL, fue necesario un control más exhaustivo, debido a que se verificó una caída diaria del valor de pH a valores por debajo de 4. Una vez neutralizados los sustratos se procedió al agregado del inóculo y armado final de los digestores.

4. Análisis de los resultados

Las características físico-químicas de las mezclas de sustratos e inóculo se muestran en la Tabla V.3. Las letras indican si se presentan o no diferencias significativas entre los tratamientos con distintas RSI para un mismo sustrato, pero no compara los valores entre sustratos.

El contenido en ST para los distintos tratamientos y sustratos, se encuentran alrededor del 5% por lo tanto se considera que el proceso se desarrolla en una DA de tipo húmeda, es decir, posee un contenido en ST menor al 10%. La concentración de SV varía de acuerdo al sustrato y a la cantidad de inóculo añadido al reactor. En general se observa que a mayor concentración de sustrato mayor concentración de SV en el reactor, aunque en el caso de PC estas diferencias no son estadísticamente significativas. El valor de DQO sigue un comportamiento similar: a medida que aumenta la concentración de sustrato en el reactor, mayor es el valor de este parámetro, aunque en el PC y en la FORSU, no se presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Los valores de pH se mantienen en el rango 6,50 - 7,68 suficientemente cercano al rango considerado óptimo para el adecuado crecimiento de las bacterias acidogénicas como de las metanogénicas, establecido en 6,8 - 7,4 (Khanal, 2008). El valor de AT, depende tanto del sustrato como de la RSI; en las experiencias para PC, aumenta a medida que aumenta la cantidad de sustrato en el reactor, como resultado de que la AT del sustrato es mayor a la del inóculo (Tabla V.1). Por su parte, para FORSU y SL, la AT es proporcionada principalmente por el bicarbonato añadido al sistema para compensar los bajos pH de los sustratos, lo cual influye también sobre el valor de la RA. Se observa que a medida que aumenta la RSI, también lo hace la RA alejándose del rango óptimo de 0,3-0,4 establecido como adecuado para un proceso estable, y por lo tanto el sistema se encontrará más propenso a fallar en el caso de verificarse un aumento sustancial de la concentración de AGV. Entre todos los sustratos, SL presenta el menor valor de RA como resultado del bicarbonato añadido para compensar el pH del sistema.

Tal como se muestra en la Tabla V.1, el sustrato con el valor mayor de la concentración de nitrógeno amoniacal corresponde a PC, y por lo tanto los tres tratamientos con PC son los que presentan la mayor concentración de amonio, siendo el tratamiento con la RSI 6:1 (1.515 ± 1 mg/L) el de mayor valor, aunque inferior al reportado por Yenigün y Demirel, (2013) como inhibidor del proceso anaeróbico (1.700 - 1.800 mg/L) lo cual otorga un margen de seguridad al proceso. Por su parte los tratamientos que utilizan FORSU presentan la menor concentración de nitrógeno amoniacal, debido principalmente a la dilución que se realizó del sustrato con el objetivo de disminuir la concentración de ST. Tal como se explicó en la *Sección 3.6.1. del Capítulo II*, la concentración de amoníaco (NH_3) se encuentra en equilibrio con la concentración de amonio (NH_4^+), dependiendo este equilibrio de la temperatura y del pH del reactor. Es por esta razón, que la concentración de amoníaco libre en SL es mayor que en el resto de los sustratos, aun cuando la concentración de nitrógeno amoniacal sea mayor en PC. Más allá de este resultado, todos

los tratamientos presentan valores que se encuentran por debajo del límite de 150 mg/L reportado por Gerardi, (2003) y Yenigün y Demirel, (2013) como tóxico para las bacterias metanogénicas.

Tabla V.3: Características físico-químicas de los tratamientos para el PC, FORSU y SL

Parámetros	PC			FORSU			SL		
	1:1	3:1	6:1	1:1	3:1	6:1	1:1	3:1	6:1
ST %	4,22±0,22 ^a	4,69±0,34 ^a	4,96±0,42 ^a	4,21±0,17 ^a	4,68±0,33 ^a	4,95±0,49 ^a	5,59±0,15 ^a	5,66±0,11 ^a	5,70±0,08 ^a
SV % (b.h)	3,56±0,75 ^a	4,68±0,33 ^a	4,95±0,49 ^a	2,94±0,12 ^a	3,58±0,20 ^b	3,96±0,27 ^b	3,48±0,1 ^a	4,04±0,08 ^b	4,44±0,06 ^c
DQO, (mg/L)	48.201±1.647 ^a	52.043±2.799 ^a	55.886±3.293 ^a	51.927±3.293 ^{ab}	50.996±2964 ^a	58.331±4.446 ^b	55.831±152 ^a	60.564±153 ^b	62.605±1.521 ^b
pH	7,13	6,70	6,50	7,01	6,89	6,63	7,61	7,56	7,48
AT (mg CaCO ₃ /L)	3.736±222 ^a	4.957±118 ^b	5.687±158 ^c	3.173±25 ^a	3.489±3 ^a	3.986±256 ^b	5.417±20 ^a	8.790±127 ^b	10.920±230 ^c
AP (mg CaCO ₃ /L)	1.645±120 ^b	1.228±22 ^a	1.058±0 ^a	1.582±12 ^b	1.126±13 ^a	1.163±68 ^a	3.222±104 ^a	4.756±28 ^b	5.968±75 ^c
AI (mg CaCO ₃ /L)	2.091±102 ^a	3.730±140 ^b	4.629±157 ^c	1.592±37 ^a	2.364±10 ^b	2.823±187 ^c	2.195±83 ^a	4.034±99 ^b	4.952±304 ^c
RA	1,27±0,03 ^a	3,04±0,17 ^b	4,37±0,15 ^c	1,01±0,03 ^a	2,10±0,03 ^b	2,43±0,02 ^c	0,68±0,05 ^a	0,86±0,02 ^a	0,83±0,06 ^a
NH ₄ (mg/L)	836±12 ^a	1.182±16 ^b	1.515±1 ^c	245±6 ^b	132±10 ^a	102±13 ^a	376±11 ^a	412±4 ^a	420±18 ^a
NH ₃ (mg /L)	12,8±0,2 ^c	6,8±0,1 ^b	5,5±0,0 ^a	2,9±0,1 ^c	1,2±0,1 ^b	0,5±0,1 ^a	16,9±0,5 ^a	16,5±0,5 ^a	22,0±0,9 ^b

Los valores corresponden a los valores medios $\pm$ la desviación estándar. Para cada parámetro se analizaron las diferencias en los parámetros para las distintas RSI para un determinado sustrato. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los valores de un parámetro al 95% de confiabilidad.

4. 1. Producción de metano y eficiencia del proceso en términos de remoción de materia orgánica

La performance del proceso fue evaluada para cada sustrato en función de la producción de biogás, de metano y de la remoción de materia orgánica. A fin de determinar la producción final de metano (B_0) de los sustratos estudiados y para las diferentes condiciones de proceso, se procedió restando de la producción total de metano de los reactores, la cantidad de metano que produce intrínsecamente el inóculo (Hansen et al., 2004; Jackowiak et al., 2011; Kolář et al., 2005) para luego dividir por la cantidad de sólidos volátiles aportados por el sustrato (Kolář et al., 2005; Zhou et al., 2011), tal como indica la Ec. V.1.

$$B_0 \left(\frac{ml}{gr\ SV\ añadidos} \right) = \left(\frac{Biogás/metano_{sustrato} - Biogás/metano_{inóculo}}{gr\ SV\ sustrato} \right) \quad Ec. V.1$$

4. 2. Producción de biogás y metano

El proceso de DA tuvo una duración que dependió del sustrato analizado, siendo de 80 días para PC, y de 70 para FORSU y SL. La producción acumulada de biogás y metano por unidad de SV para cada sustrato y cada RSI se muestra en la Figura V.1, donde del análisis comparativo se puede deducir que para cualquiera de los sustratos la mayor producción de biogás y de metano se obtiene para la RSI 1:1, y en la medida que la concentración de inóculo disminuye la producción de biogás y de metano también lo hacen.

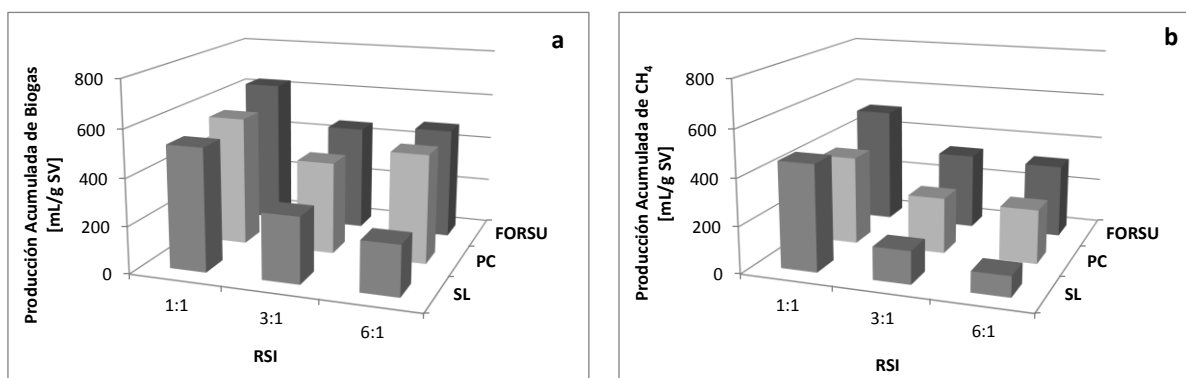


Figura V.1: a. Producción acumulada de biogás. b. Producción acumulada de metano para los tres sustratos y las tres RSI

Para PC la producción acumulada de biogás no presenta diferencias significativas al 95% de confiabilidad entre las distintas RSI, obteniendo 554 ± 75 ml/g SV, 394 ± 25 ml/g SV y 466 ± 7 ml/g SV, con porcentajes promedio de metano en el biogás de 70%, 61% y 50% para las relaciones 1:1, 3:1 y 6:1 respectivamente. La producción acumulada de metano decrece por lo tanto de 382 ± 22 a 232 ± 5 ml/g SV con el incremento de la RSI de 1:1 a 6:1 (Tabla V.4). Los valores obtenidos para RSI 1:1, tanto para la producción acumulada de metano (382 ± 22 ml/g SV) como para la remoción de materia orgánica en unidades de SV ($45,1 \pm 3,7\%$ SV) se encuentran en el orden de los valores informados por otros autores. En este sentido, Chynoweth et al., (1999) reportó que la producción final de metano en el PC se encuentra en el rango 0,32 a 0,48

m³/kg SV con una remoción de materia orgánica en el orden de 40-60% en SV. Por su parte Moller et al., (2004), quienes obtuvieron una producción de metano a partir de PC en régimen mesofílico de 0,35 m³/kg SV informaron que este valor dependió fuertemente del pretratamiento del sustrato y de las condiciones de digestibilidad del mismo. Estos autores, también estimaron la producción teórica de metano a partir de la composición química promedio del sustrato³, encontrando un valor de 0,516 m³/kg SV, 35% superior al valor encontrado por esta experiencia para la RSI 1:1, aumentando esta diferencia a 122% si de la compara con el valor obtenido por la RSI 6:1.

Una comparación adicional puede realizarse entre los valores obtenidos para la producción de metano de PC en las diferentes experiencias realizadas en esta tesis, por un lado, el valor reportado en el capítulo IV, para el tratamiento T3, en el cual se utilizó lodos de depuradora como inóculo y donde la producción alcanzada fue de 0,256 ± 0,025 L/g SV, comparable al valor de 0,232±0,005 L/g SV correspondiente al tratamiento que utiliza una RSI 6:1. Consecuentemente, al utilizar bajas concentraciones de inóculo la producción final de metano será comparable en magnitud, aun cuando el sustrato utilizado presente diferencias en sus características físico-químicas iniciales, tal como se observó y se indicó en la *sección CAPITULO IV3. 1* de este capítulo.

Tabla V.4: Resumen del desempeño de los tratamientos

Sustrato	RSI	Remoción de materia orgánica		Producción de biogás	Producción de metano	
		% SV	% DQO	(mL CH ₄ /g SV _i)	B ₀ (mL CH ₄ /g SV _i)	B _u (mL CH ₄ /g SV _r)
PC	1:1	45,1±3,7 ^a	50,2±1,0 ^a	554±75 ^a	382±22 ^b	424±10 ^b
	3:1	61,5±3,9 ^b	55,7±6,0 ^a	394±25 ^a	241±12 ^a	294±4 ^a
	6:1	38,8±0,1 ^a	30,7±15,4 ^a	466±7 ^a	232±5 ^a	739±14 ^c
<i>p-valor</i>		0,0113	0,1524	0,0874	0,0037	0,0001
FORSU	1:1	50,5±1,0 ^a	73,5±5,0 ^a	630±28 ^b	503±18 ^b	498±28 ^a
	3:1	62,5±0,0 ^b	58,6±0,3 ^a	455±24 ^a	330±19 ^a	396±23 ^a
	6:1	65,3±4,3 ^b	66,7±14,0 ^a	478±6 ^a	316±2 ^a	415±24 ^a
<i>p-valor</i>		0,0192	0,3555	0,0075	0,0021	0,052
SL	1:1	42,5±4,7 ^a	42,6±0,0 ^a	522±7 ^c	455±11 ^c	365±49 ^b
	3:1	37,4±0,5 ^a	52,3±11,2 ^a	280±7 ^b	140±8 ^b	227±16 ^a
	6:1	35,9±1,2 ^a	48,1±1,4 ^a	213±20 ^a	88±1 ^a	184±8 ^a
<i>p-valor</i>		0,1899	0,4311	0,0003	0,0000	0,0190

i: inicial, r: removido. Los valores son medias de repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas (p> 0,05) según prueba LSD.

La máxima producción de biogás y de metano para FORSU se obtiene para RSI 1:1 con 630±28 y 503±19 mL/g SV respectivamente, lo que representa un porcentaje promedio de metano en el biogás de 80%,

³ La composición promedio de los sustratos estudiados, obtenido a partir de diferentes referencias bibliográficas se encuentran en el *Capítulo II. Sección 3. 7. 5.*

disminuyendo a 73% y 66% para las relaciones 3:1 y 6:1 respectivamente. Estos últimos valores son estadísticamente superiores a los obtenidos por los demás sustratos ($p\text{-valor} = 0,0020$)⁴. Tanto la producción de metano como la remoción de materia orgánica para el tratamiento con la RSI 1:1, son superiores a los valores informados por Nielfa et al., (2015) quienes obtuvieron una producción promedio de metano de 201,5 mL/g SV con una remoción de materia orgánica en el orden del 42% en SV. Estos autores también indicaron que la producción de metano teórica calculada a partir de la composición química elemental (Capítulo II. Sección 3. 7. 5) resultó 546,1 mL/g SV, valor 8,5% mayor que el obtenido por este trabajo. Por su parte, Kigozi et al., (2014) reportan una recopilación bibliográfica, en el cual la FORSU presenta una producción de biogás en el orden 300-500 mL/g SV, con un contenido en metano promedio de 65%. Mientras que Khalid et al., (2011) reporta que la producción de metano puede rondar alrededor de los 360 a 530 mL/g SV. Una comparación de los valores obtenidos por este trabajo y los valores reportados por otros autores se muestra en la Tabla V.5 para los distintos sustratos. Del análisis de esta tabla, se puede deducir la fuerte influencia que presenta la RSI así como la composición del sustrato utilizado sobre la producción de metano, sobre todo en residuos como la FORSU, cuya composición varía con factores tales como el nivel socio-económico, la época del año en que es generado, el lugar geográfico, etc.

En el caso de SL, el incremento de seis veces en la RSI provocó disminuciones del 59% en la producción de biogás (522 a 213 mL/g SV), y de 81% en la producción de metano (455 a 88 mL/g SV) resultando este comportamiento el más acentuado respecto del resto de los sustratos estudiados, donde la disminución observada en el metano producido fue 39% para PC y de 37% para FORSU. En general se observa la dificultad para encontrar bibliografía que informe sobre la producción de biogás/metano a partir del SL en reactores de tipo batch. En este orden, Ergüder et al., (2001), quienes trabajaron con SL en reactores batch reportaron una producción de metano en el orden de 424 mL/g DQO lo que equivale a 23,4 L/L SL, el cual resulta similar al valor obtenido por esta experiencia para RSI 1:1 de 24,49 L/L SL, aunque disminuye a 4,6 L/L SL para el tratamiento con la RSI 6:1.

⁴ Las tablas de ANOVA relacionadas con este análisis se pueden ver en el apartado Anexo (1.1)

Tabla V.5: Comparación de los valores de producción de metano obtenidos experimentalmente y los valores reportados

Sustrato	Valor obtenido	Valor reportado
PC	0,256 ± 0,025 L/g SV Capitulo (IV)	0,32 a 0,48 m ³ /kg SV (Chynoweth et al., 1999)
	0,382 – 0,232 L/g SV (RSI 1:1 – 6:1)	0,35 m ³ /kg SV(experimental) 0,516 m ³ /kg SV (teórico) (Moller et al., 2004)
FORSU	0,316 – 0,503 L/g SV (RSI 1:1 – 6:1)	0,201 L/g SV (experimental) 0,546 m ³ /kg SV (teórico) (Nielfa et al., 2015)
		360 - 530 mL/g SV (Khalid et al., (2011) Kigozi et al., (2014)
SL	0,088 - 0,455 L/g SV (RSI 1:1 – 6:1) 24,49 – 4,6L/L SL (RSI 1:1 – 6:1)	424 mL/g DQO o 23,4 L/L SL (Ergüder et al., 2001)

La remoción de materia orgánica para los distintos sustratos varió entre 35,9 y 65,3% en SV y entre 30,7 y 73,5% en unidades de DQO (Tabla V.4), aunque no se observa una tendencia clara en cuanto a la RSI para los diferentes sustratos. En este sentido, la mayor remoción en PC se obtuvo para RSI 3:1, para FORSU con RSI 6:1 y en el SL con la RSI 1:1. Si bien algunos autores como Liu et al., (2009) indican que la producción de metano se relaciona directamente con la remoción de materia orgánica, también observaron algunas discrepancias, dando un error del 23% en el ajuste, las que según indicaron los autores pueden estar relacionadas a la pérdida de componentes volátiles durante el proceso de secado para la determinación de ST y SV.

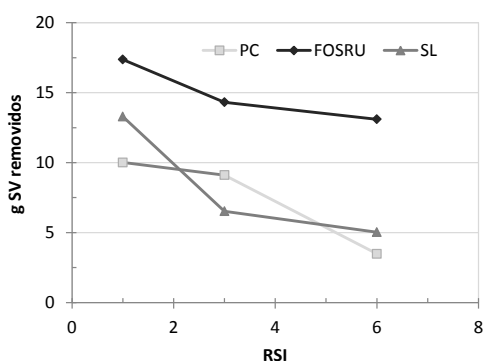


Figura V.2: Remoción de materia orgánica (g SV) para cada sustratos y cada RSI

Si en lugar de analiza la remoción porcentual, se analiza la cantidad de materia orgánica removida (SV iniciales menos finales) se observa que al disminuir la cantidad de inóculo utilizado, también lo hace la capacidad de remoción del sistema. Dado que no se observaron diferencias significativas en la producción de metano a partir de PC para la RSI 3:1 y 6:1 se esperarían remociones de materia orgánica comparable entre estos dos tratamientos, aunque se observan diferencias tanto en %SV (Tabla V.4) como en gr SV removidos (Figura V.2). La diferencia observada podría atribuirse a la heterogeneidad del sustrato (PC), tal como ha sido reportado por otros autores, entre ellos Neves et al., (2004). Para el caso de la FORSU, se observa una tendencia cuasi lineal mientras que para SL el aumento de la RSI disminuye sensiblemente la capacidad de remoción de materia orgánica, pero también lo hace la producción de metano.

A fin de corroborar estadísticamente los resultados obtenidos, se analizó la influencia del tipo de sustrato y de la RSI sobre la producción de biogás y de metano, identificando además posibles interacciones sobre ambos factores, lo que permitirá detectar si el efecto de un factor depende del nivel del otro. El análisis de ANOVA⁵ muestra que ambas producciones (biogás y metano), se encuentran influidas por el tipo de sustrato ($p\text{-valor}_{\text{biogás y metano}}=0,0000$), y por la RSI ($p\text{-valor}_{\text{biogás y metano}}=0,0000$), pero que además se verifica que existe una fuerte interacción entre ambos parámetros ($p\text{-valor}_{\text{biogás}}=0,0070$ y $p\text{-valor}_{\text{metano}}=0,0000$).

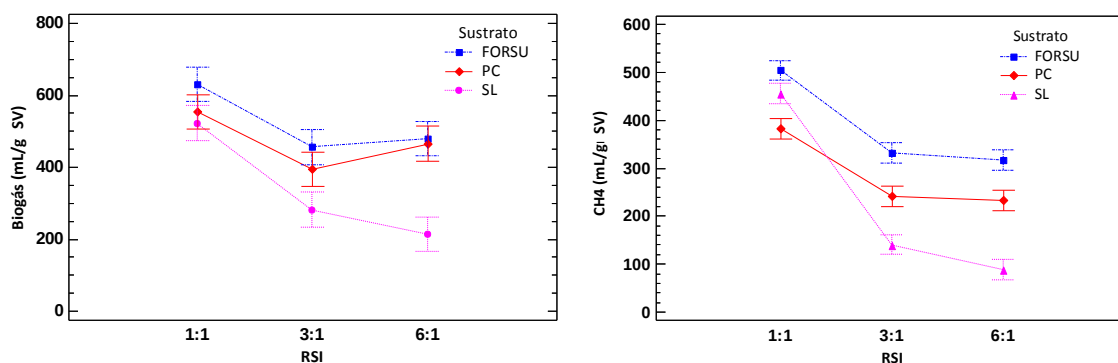


Figura V.3: Interacción entre el tipo de sustrato y la RSI sobre la producción de biogás y de metano

La Figura V.3 muestra cómo interactúan el tipo de sustrato y la RSI sobre la producción de biogás y de metano. Se verifica que la producción de biogás, es en todos los casos superior en FORSU, le sigue PC y en último lugar se encuentra SL. La producción de metano presenta una tendencia similar, en donde para los tratamientos con RSI 3:1 y 6:1 la tendencia es idéntica a la producción de biogás, pero que se invierte para la RSI 1:1, donde el SL es mayor al PC. El mayor cambio en la producción de biogás como de metano se produce al aumentar la RSI de 1:1 a 3:1, siendo más pronunciado este cambio en el metano que en el biogás. Del análisis de estos resultados se puede indicar que, aun utilizando una elevada concentración de inóculo como sucede con RSI 1:1, el sustrato utilizado tiene una influencia preponderante sobre la producción tanto de biogás como de metano.

4. 3. Análisis cinético de la producción de metano

La producción acumulada de metano (mL/g SV), la velocidad de producción de metano (mL/gr SV día) y el porcentaje de metano a lo largo del proceso de DA se muestra en la Figura V.4 para cada uno de los sustratos y cada RSI. A continuación se detallará el comportamiento de cada uno de ellos.

⁵ Ver Anexo, sección 2. 2., tablas de ANOVA.

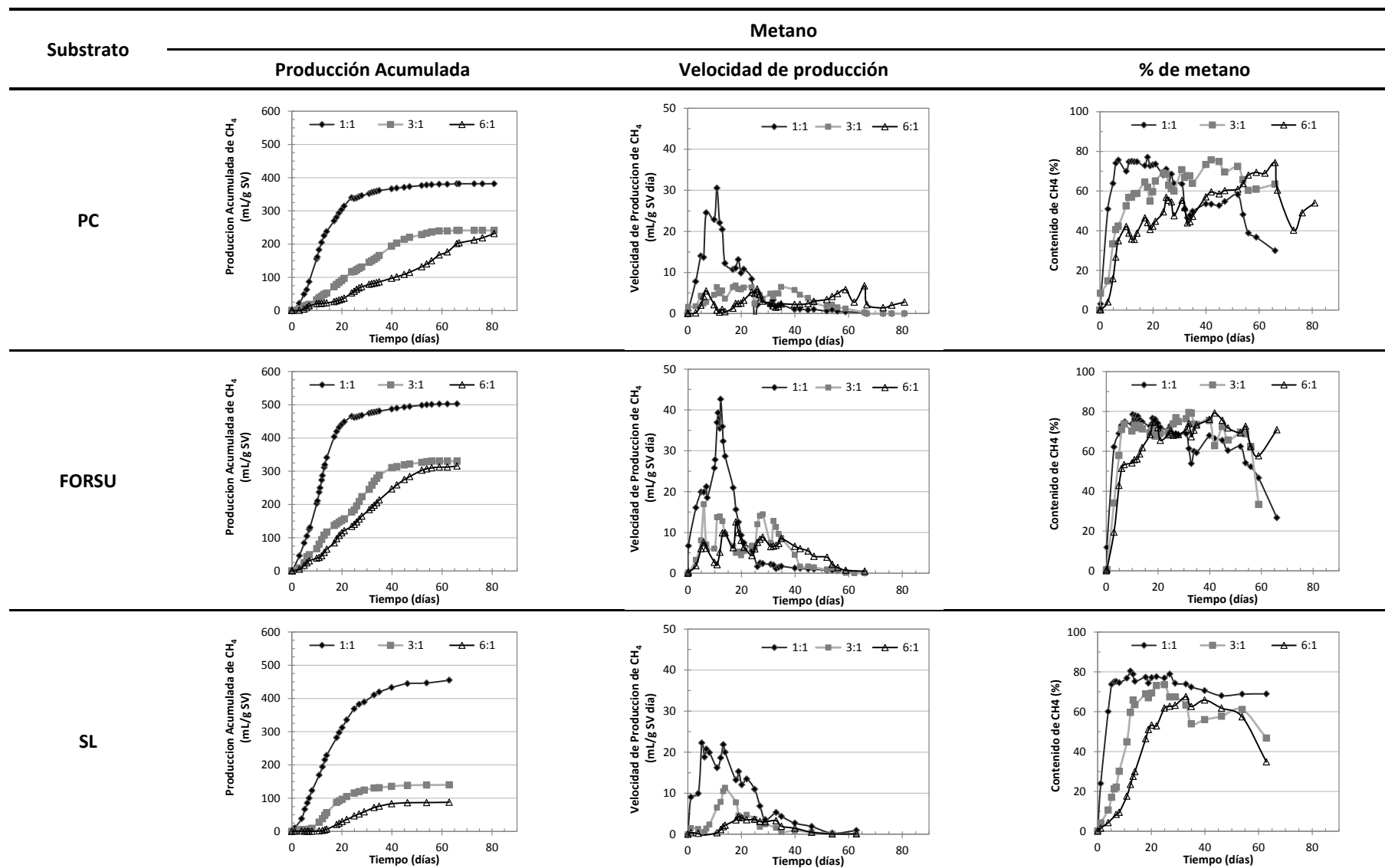


Figura V.4: Evolución de la generación de metano en la DA de los tres sustratos

4. 3. 1. Producción acumulada de metano

Se observa que a medida que aumenta la cantidad relativa de inóculo añadido al sistema, la producción de metano es mayor y más rápida. Un parámetro tecnológico que se utiliza para evaluar el desempeño del proceso en términos de producción de metano es el Tiempo de Digestión Técnica (TDT). Corresponde al tiempo necesario para generar 80% de la producción máxima de metano en el digestor (Cheng y Zhong, 2014; G. Esposito et al., 2012; Feng et al., 2013). En la FORSU el TDT se alcanza al día 17 para la RSI 1:1, aumento a 33 y 39 días para las relaciones 3:1 y 6:1 respectivamente. El PC presenta un comportamiento similar, donde el 80% de la producción total es generada durante los primeros 20 días para el tratamiento con la RSI 1:1, aumento este valor a 41 días y 66 días para la RSI 3:1 y 6:1 respectivamente. Para el SL, el TDT es alcanzado al día 25 tanto para la relación 1:1 como para la relación 3:1, aumentando a 33 para la relación 6:1. En este sentido, se puede indicar, que tal como se observa de la Figura V.5 el TDT disminuye a medida que se incrementa la cantidad de inóculo (reducción de RSI) con variaciones que dependen del tipo de sustrato utilizado, y en donde el mayor aumento de TDT en función de la RSI se da en PC.

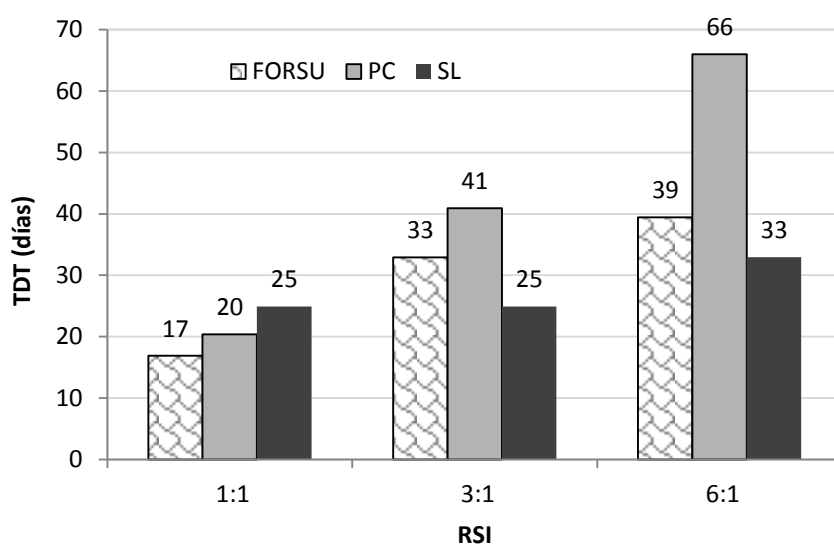


Figura V.5: TDT para los tres sustratos y las tres RSI analizadas

4. 3. 2. Velocidad de producción de metano

En lo que respecta a la velocidad de producción de metano, para la RSI 1:1 en general se verifica un rápido aumento desde el inicio del proceso. Las máximas velocidades alcanzadas para FORSU y PC fueron 42,6 y de 30,5 mL/g SV día a los días 12 y 10 respectivamente, disminuyendo rápidamente hacia el final de la experiencia. El comportamiento observado para SL resultó ligeramente diferente ya que la máxima velocidad de producción (22,2 mL/g SV día) se alcanzó al día 5, permaneciendo aproximadamente constante alrededor de 20 mL/g SV día hasta el día 12, a partir del cual disminuye progresivamente hasta el final del proceso. En general se observa que FORSU presenta la mayor velocidad de producción de metano para todas las RSI estudiadas, esto se explica sobre la base de su

composición la cual cuenta con una elevada concentración de materiales de fácil degradabilidad (Nielfa et al., 2015). En este sentido, Lesteur et al., (2010), indica que cuando el sustrato presenta materia orgánica más soluble tales como carbohidratos simples, amino ácidos, lípidos simples y AGV, la degradación es más rápida. Teniendo en cuenta esta referencia se podría esperar que el SL, el cual está compuesto principalmente de carbohidratos de rápida degradabilidad, presentara la mayor velocidad de producción de metano, sin embargo las menores velocidades observadas por este sustrato podrían estar relacionadas con un cierto grado de inhibición ocasionado por elevadas concentraciones de AGV. De la comparación entre las distintas RSI utilizadas para un mismo sustrato, se puede observar que con el aumento de la RSI disminuyen las velocidades máximas (Figura V.4), reduciéndose las velocidades en más de un 50% al aumentar la RSI de 1:1 a 6:1.

En resumen, una mayor concentración de inóculo en el reactor permite obtener una mayor producción de metano en menos tiempo (mayor velocidad), comportamiento que fue verificado en los tres sustratos estudiados. Cheng y Zhong, (2014) y Lopes et al., (2004) encontraron resultados similares al trabajar con tallos de algodón y FORSU como sustratos. Donde, las velocidades de producción de metano para los distintos sustratos, están influidas principalmente por la cantidad de inóculo utilizada, lo que influye directamente sobre la cantidad de bacterias metanogénicas aportadas al sistema. Sin embargo, el tipo de sustrato utilizado en el proceso anaeróbico es otro factor preponderante, ya que del análisis de los resultados se podría concluir que las bacterias aportadas por el inóculo pueden adaptarse y generar productos intermedios distintos de acuerdo al sustrato presente en el reactor, lo que influirá directamente sobre la velocidad de producción de metano.

4. 3. 3. Análisis de la variación de la concentración de metano

En la Figura V.4, además de la producción acumulada y de la velocidad de producción de metano, se muestra la evolución del porcentaje de metano. En general, al utilizar mayor cantidad de inóculo, se observa un mayor aumento en la concentración de metano, aunque este comportamiento no fue tan marcado en FORSU. Las diferencias entre PC y FORSU radican en el tiempo en que se obtiene el máximo, más que en el valor alcanzado. En el caso de PC por ejemplo, alcanzó los máximos 77,1% (RSI 1:1), 75,7% (RSI 3:1) y 74,4% (RSI 6:1) a los días 18, 42 y 66 respectivamente mientras que FORSU alcanzó 78,5% (RSI 1:1), 79,5% (RSI 3:1) y 79,3% (RSI 6:1) a los días 10, 32 y 42 respectivamente y SL 80,4% (RSI 1:1), 73,6% (RSI 3:1) y de 67,6% (RSI 6:1) a los 12, 25 y 33 días respectivamente. Estos resultados muestran que los valores máximos no están influenciados por la cantidad de inóculo pero sí lo está el tiempo necesario para alcanzarlos. Esto es una evidencia que cuanto menor sea la concentración de inóculo en el reactor, se requerirán mayores tiempos de adaptación de las bacterias al nuevo medio, lo que influirá directamente sobre la producción de metano. Los bajos porcentajes máximos de metano para las RSI 3:1 y 6:1 para el SL podrían indicar cierto grado de inhibición, lo cual debería confirmarse a través del análisis de la evolución de la concentración de AGV y pH del sistema, estudio que se aborda en la sección 4. 4. 1 de este capítulo.

4. 4. Análisis del proceso en términos de AGV, AP y pH

Los parámetros, AP, AGV (AI) y pH fueron medidos semanalmente con el objetivo de verificar su evolución, y obtener información sobre la estabilidad del proceso. La Figura V.6 muestra la variación semanal de la AP, AGV a lo largo del periodo de estudio para cada sustrato y cada RSI.

4. 4. 1. Variación de la concentración de AGV

La concentración inicial de AGV en el tratamiento con PC, aumentó con la RSI desde 2.091 mg CaCO₃/L (RSI 1:1), 3.729 mg CaCO₃/L (RSI 3:1) hasta 4.600mg CaCO₃/L (RSI 6:1). Estos niveles permitieron que las bacterias metanogénicas existentes en el sistema puedan generen metano al inicio del proceso, a expensas de su consumo. De la gráfica se puede observar una elevada reducción de los AGV durante los primeros 7 días de proceso para todas las relaciones estudiadas en este capítulo, aunque, el nivel de reducción dependió de la RSI. En este periodo inicial, la concentración de AGV descendió $54,89 \pm 3,90\%$, $47,49 \pm 2,17\%$ y $26,38 \pm 0,69\%$ para las RSI 1:1, 3:1 y 6:1 respectivamente. Al final del proceso, la concentración de AGV fue 533,87 mg/L (RSI 1:1), 774,0mg/L (RSI 3:1) y 2085,9 mg/L (RSI 6:1). Este comportamiento fue contrario al observado para el tratamiento T3 del Capítulo IV, donde la concentración de AGV aumentó 25% durante los primeros 40 días cuando se utilizó una RSI de 14:1 y lodos de depuradora como inóculo. La mayor proporción de inóculo utilizada en este capítulo evitó problemas de inhibición relacionada con la acumulación de AGV.

A diferencia del PC, durante el periodo correspondiente a los primeros 7 días de experiencia, tanto para FORSU como para SL, se verificó un aumento en la concentración de AGV para todas las RSI estudiadas, siendo este aumento más pronunciado a medida que aumenta la RSI. Este comportamiento es el resultado de la hidrólisis inicial de los sustratos en sustancias más simples (carbohidratos, proteínas y lípidos) que se convierten rápidamente en AGV por acción de las bacterias acidogénicas. La presencia de una mayor cantidad y variedad de bacterias metanogénicas añadidas con el inóculo permitió un consumo más rápido de los AGV presentes en el sistema, evitando problemas de inhibición por acumulación de los mismos. En este sentido tanto para FORSU como para SL, la concentración de AGV aumentó 41 y 56% para RSI 1:1, pero cuando la RSI aumentó a 6:1, el incremento en AGV durante esos primeros días alcanzó 133 y 156% respectivamente.

La diferencia que se observa en cuanto a la variación de la concentración de AGV en PC respecto a FORSU y SL, radica fundamentalmente en que PC es un sustrato que en su mayoría ya ha sido digerido en el tracto animal y por lo tanto, la materia orgánica ha sido hidrolizada mayoritariamente previo al proceso anaeróbico, es por esta razón que en su composición se encuentran presentes AGV, pero además aquellos AGV que puedan formarse serán consumidos rápidamente por las bacterias metanogénicas presentes en el sistema (Moller et al., 2004; Zeikus, 1977). En FORSU y SL, es necesaria una etapa previa de hidrólisis para que las bacterias metanogénicas puedan producir metano a expensas

de los AGV producidos luego de la etapa hidrolítica, lo que se verifica como un aumento en la concentración de los AGV durante el inicio del proceso.

En mayor o menor medida al final del proceso anaeróbico se verificó reducción de la concentraciones de AGV con respecto al valor inicial, aunque la concentración final dependerá de la RSI, pasando de 713,6 a 1.984 mg CaCO_3 / para FORSU y de 1.759 a 7.978 mg CaCO_3 /L para SL al aumentar la RSI de 1:1 a 6:1. Solamente para SL para las RSI 3:1 y 6:1 el porcentaje de variación entre el valor inicial y el valor final, mostró un aumento en la concentración de AGV en 39,9% y 61,1% respectivamente, en contraposición con las demás experiencias.

Tal como han reportado algunos autores, el problema principal para tratar anaeróbicamente el SL radica en los problemas de acidificación que presenta este sustrato. Según reporta Ghaly, (1996), la lactosa presente en el SL es fácilmente convertida por los microorganismos en ácidos orgánicos, los cuales debido a las diferentes velocidades de las etapas acidogénica y metanogénica, no suelen ser convertidos posteriormente en metano, provocando la acumulación de los mismos y disminuyendo el pH del sistema causando inhibición y bajas producciones de biogás y metano. Por su parte Ergüder et al., (2001) quienes analizaron la producción de biogás utilizando SL como sustrato en reactores batch, encontraron que la adición al sistema de nutrientes, metales trazas y/o suplementación de la alcalinidad es de vital importancia para evitar el fallo del proceso. Si el valor de pH se encuentra dentro de los límites adecuados, tal como se puede verificar de la Figura V.7, entonces se debería analizar si las elevadas concentraciones de AGV podrían ser las responsables de la desestabilización del sistema. Según Lin et al., (2012), una concentración de AGV superior a 5.000 mg/L, podría inhibir la actividad de las bacterias metanogénicas, aunque este valor límite no es tan estricto y debería analizarse cada caso particular. De acuerdo a los resultados observados en cuanto a la baja producción de metano detectada para las RSI 3:1 y 6:1, conjuntamente con las elevadas concentración de AGV observada a lo largo de todo el proceso, exhibiendo valores máximo de 8.596 mg/L y 12.568 mg/L durante la primera semana de proceso, se podría deducir que el proceso anaeróbico presento inhibición. Por lo tanto, cuando se trabaja con un sustrato complejo, como es el caso del SL, es necesario asegurar una elevada alcalinidad en el sistema, que permita compensar los cambios de pH por la acumulación de AGV, además de una elevada concentración de inóculo, que permita consumir rápidamente los AGV que puedan formarse. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo estudios posteriores tendientes a verificar cual es la relación óptima entre la cantidad de inóculo y compensación de la alcalinidad que asegure un proceso estable.

En general, con el incremento de la concentración de inóculo en un sistema, aumenta las velocidad de consumo de AGV, lo que se verifica como concentraciones de AGV menores a lo largo de todo el proceso, pero en el caso de sustratos de rápida velocidad de degradación y por lo tanto de rápida formación de ácidos como lo es el SL, es necesario aportar al sistema no sólo una elevada concentración de bacterias metanogénicas, sino también asegurar un valor de alcalinidad adecuado que evite la disminución del valor de pH.

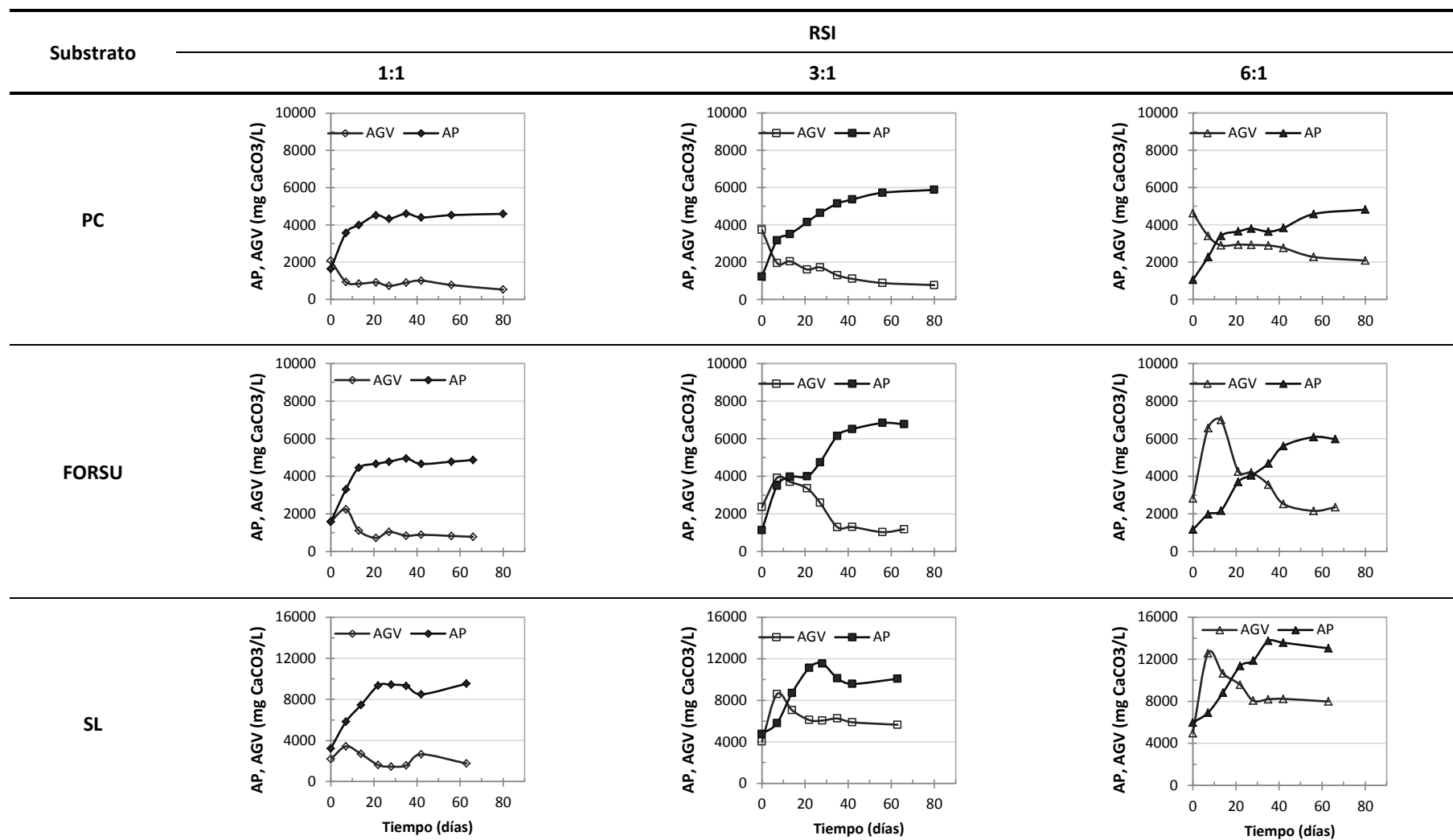


Figura V.6: Variación de la concentración de la AP y los AGV para los tres sustratos y para las tres RSI

4. 4. 2. Variación de la concentración de AP

La AP o los cambios en la capacidad buffer del sistema es otro parámetro que se debe analizar conjuntamente con la evolución de la concentración de los AGV. En todos los tratamientos aplicados se observó un aumento de la AP con el progreso de la DA (Figura V.6). En los tres sustratos analizados, para la RSI 1:1 se observó un rápido aumento de AP durante los primeros 20 días, estabilizándose en una meseta cuyos valores finales resultaron 4.598 mg/L para PC, 4.863 mg/L en FORSU y 9.528 mg/L en SL. En términos porcentuales, el incremento de AP resultó similar para los tres sustratos (180% para PC, 208% para FORSU y 195% para SL). El elevado valor de AP observado en SL comparado con el resto se explica por el agregado de bicarbonato inicial para compensar el bajo pH del sustrato.

Los tratamientos con la RSI 3:1, incrementaron su AP en mayor medida que los tratamientos con la RSI 1:1. Para PC el incremento fue de 379% con un valor final de la AP de 5.879 mg/L, mientras que para FORSU se observaron aumento de 501%, alcanzando un valor final de 6.769 mg/L. En el caso de SL, el valor final resultó 10.072 mg/L aumentando 111% desde el valor inicial, aunque el aumento observado no es comparable con el de los demás sustratos, como resultado de que el proceso presentó inhibición. Tal como se explicó en *Capítulo II. 3.4.*, la AP aumenta como consecuencia de la degradación de los compuestos orgánicos, los que liberan dióxido de carbono (CO_2) y amoníaco (NH_3). Por lo tanto, una mayor alcalinidad es un indicio de una mayor degradación de la materia orgánica, esto podría explicar parcialmente los resultados encontrados a partir del análisis de la remoción en SV de la Tabla V.4, donde para la RSI 3:1, tanto PC como FORSU, la reducción del contenido en SV fue de 62%, mayor que la reducción alcanzada para la RSI 1:1 que fue 45,5 y 50,5% para PC y FORSU respectivamente.

En lo que respecta a los tratamientos con la RSI 6:1, el comportamiento fue diferente, en el caso de PC como en FORSU, la AP aumenta durante los primeros 14 días y permanece constante durante los siguientes 20 días resultando en un valor final de 4.598 mg/L y 5.979 mg/L, lo que representan incrementos desde el inicio del proceso de 355% y 414% respectivamente. Este comportamiento en donde la AP permanece constante puede ser explicado en un consumo de AP por parte de los AGV generados. En el caso del SL el valor final de 13.040 mg/L representa un aumento desde el inicio del proceso de 118% pero al igual que para la RSI 3:1 los valores no son comparables con los demás sustratos debido a la inhibición que sufrió el proceso.

Los resultados encontrados para los tres sustratos estudiados, indicaron que a medida que aumenta la RSI, aumentan los problemas por sobrecarga del proceso, esto es, acumulación de AGV y por lo tanto baja producción de metano. Este comportamiento fue reportado por otros autores, quienes trabajaron con otros tipos de sustratos tales como residuos de vinagre (subproducto de la fermentación en estado sólido de cereales y su salvado para hacer vinagre)(Feng et al., 2013) y residuos de comida (Neves et al., 2004).

4. 4. 3. Análisis de la variación del pH

El equilibrio entre los valores de la concentración de AGV y AP determinan finalmente los valores de pH que alcanzará el sistema. Tal como se observa de la Figura V.7, el pH aumenta rápidamente en PC durante los primeros días de la experiencia, para luego mantenerse en el rango comprendido entre 7,0-8,0. Los valores finales alcanzados corresponden a 7,95, 8,10 y 7,80 para las RSI 1:1, 3:1 y 6:1 respectivamente, valores cuya tendencia resulta similar a los valores alcanzados para la AP, donde el mayor valor de pH se observa para RSI 3:1 correspondiente al de mayor valor de AP en el reactor (Figura V.6).

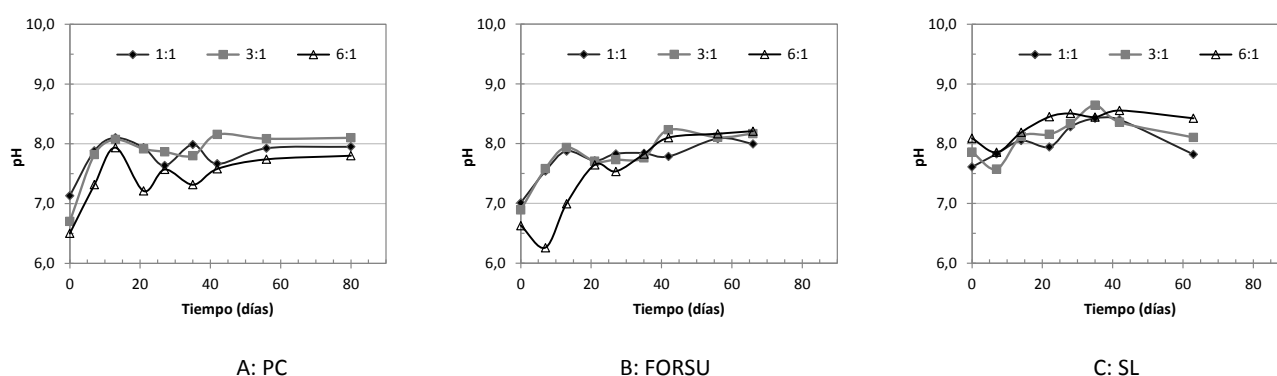


Figura V.7: Variación de pH

En lo que respecta a FORSU, se verifica para RSI 1:1 y 3:1 un rápido aumento en el pH durante los primeros días, en contraste para la RSI 6:1 donde se observa una leve disminución, vinculada a una mayor concentración de AGV durante los primeros días de experiencia. Esto no impide que el sistema sea capaz de recobrar rápidamente la neutralidad, alcanzado al final valores similares entre los distintos tratamientos (8,0, 8,17 y 8,21 en orden creciente de RSI).

En función de las elevadas concentraciones de AGV observadas en el tratamiento con SL, principalmente para RSI 3:1 y 6:1, se esperaría un decrecimiento marcado en los valores de pH, aunque debido a la elevada capacidad buffer del sistema, sólo se observa una pequeña reducción del pH durante la primera semana, esto no significa que el sistema se encuentre equilibrado, ya que como ha observado Ahning et al., (1995), sustratos con elevada capacidad buffer pueden reportar pequeños cambios de pH tal como se verifica a menudo en reactores con elevado nivel de amoníaco, aun cuando el sistema se encuentra altamente estresado. Los elevados valores de AP (Figura V.6) provocan que el valor de pH se mantenga durante casi toda la experiencia por encima de 8 para todas las RSI analizadas.

4. 4. 4. Análisis de la variación de la RA

La RA, parámetro que relaciona la concentración de AGV con AP, es un indicador de la estabilidad de un proceso. Feng et al., (2013) identifica tres rangos para determinar la viabilidad del proceso de DA: $RA < 0,4$ refleja un proceso estable, $0,4 < RA < 0,8$ puede haber algún grado de inestabilidad, y $RA > 0,8$ indica

inestabilidad significativa. La Figura V.8 muestra los valores de la RA alcanzados al final del proceso por todos los tratamientos, se observa que cuando se utiliza una RSI baja (1:1) el proceso presenta una elevada estabilidad, para la RSI 3:1 a excepción de SL, los demás sustratos mostraron adecuada estabilidad y para RSI 6:1 no se puede asegurar que el proceso tenga un funcionamiento estable.

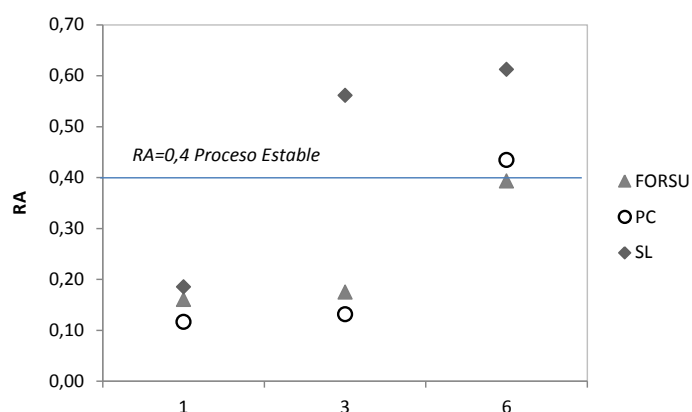


Figura V.8: RA para cada sustrato y cada RSI

4. 4. 5. Nitrógeno amoniacal

El amonio (NH_4^+) y el amoníaco libre (NH_3) son las dos formas preponderantes de nitrógeno inorgánico en un reactor anaeróbico, y la relación entre estas dos formas depende principalmente del valor de pH del efluente. De estos dos, el amoníaco libre es el más tóxico, debido que puede pasar a través de la membrana celular causando desbalance de protones y deficiencia de potasio; por otro lado, concentraciones de NH_3 por debajo de 200 mg/L es beneficioso para el proceso de DA debido a que el nitrógeno es un nutriente esencial para los microorganismos (Lin et al., 2012). Los valores iniciales y finales de estos analitos, así como el porcentaje de variación que sufrieron durante el proceso anaeróbico se muestran en la Tabla V.6. El sustrato que presenta la mayor concentración inicial de NH_4^+ es PC, mientras que la mayor concentración inicial de NH_3 la presenta el SL, como resultado de los elevados valores de pH que presenta este sustrato, aunque en ningún caso los valores se encuentran por fuera de los rangos que pueden ser considerados como inhibidores del proceso.

Respecto a la concentración final de NH_4^+ , en todos los casos se observaron incrementos a lo largo del proceso, aunque de diferente magnitud: en PC, varió entre 20,7 (RSI 6:1) y 38,2% (RSI 1:1), en FORSU entre 194% (RSI 1:1) y 623% (RSI 6:1), y en SL entre 120 y 89% para las RSI 1:1 y 6:1 respectivamente.

Tabla V.6: Variación en la concentración de NH_4^+ y NH_3 durante el proceso anaeróbico

		NH ₄ ⁺ (mg/L)			NH ₃ (mg/L)		
		Inicial	Final	% variación	Inicial	Final	% variación
PC							
	1:1	865,7±12,3	1.155,2±24,9 a	38,2	12,8±0,2	102,4±8,9 a	700
	3:1	1.181,8±16,3	1.456,5±127,8 b	23,2	6,8±0,1	181±34,4 b	2.565
	6:1	1.515,1±0,7	1.828,9±28,8 c	20,7	5,5±0,0	109,1±6,0 a	1.882
	<i>p-valor</i>	0,0000	0,0000		0,0000	0,0008	
FORSU							
	1:1	245,3±6,3	722,9±9,9 a	194,7	2,9±0,1	89,7±14,0 a	3.033
	3:1	131,9±9,7	803,7±23,0 b	509,1	1,2±0,1	116,1±7,5 b	9.815
	6:1	102,1±12,5	737,8±31,4 a	623	0,5±0,1	106,9±12,6 ab	21.298
	<i>p-valor</i>	0,0014	0,0018		0,0001	0,0308	
SL							
	1:1	376,0±10,6	827,5±45,3	120,1	16,9±0,5	58,6±3,5 a	247
	3:1	411,6±4,0	743,9±50,2	80,7	16,5±0,2	93,1±1,8 b	463
	6:1	419,6±17,9	796,9±100,3	89,9	22,0±0,93	181,7±33,0 c	728
	<i>p-valor</i>	0,0722	0,1959		0,0052	0,0000	

La concentración de NH_3 que puede inhibir la actividad metanogénica no es un valor estricto, tal como fue analizado en el *Capítulo II Sección 3.6.1*, sino que depende de varios factores, tales como la temperatura y la aclimatación de los microorganismos, entre otros. En este sentido, Lin et al., (2012) reportó como valor límite 200 mg/L, mientras que Yenigün y Demirel, (2013) y Gerardi, (2003) indicaron 150 mg/L. De todos los tratamientos, solamente SL con RSI 6:1 mostró un valor final elevado de NH_3 de 181,7 mg/L, lo que puede atribuirle un cierto grado de responsabilidad sobre la inhibición de la actividad metanogénica en sinergia con las elevadas concentraciones de AGV observadas.

4.5. Modelado de la producción de metano

Si se asume que la hidrólisis de la materia orgánica sigue una cinética de primer orden, la producción acumulada de metano puede ser modelada mediante una ecuación de primer orden (PO) Ec. V.2.

$$B(t) = B_0 * (1 - e^{(-kt)}) \quad \text{Ec. V.2}$$

donde B(t) representa la producción acumulada de metano al día t de digestión (mL/g SV), B₀ es la producción potencial de metano del sustrato (mL/g SV), k es la constante de desintegración de primer orden que representa la velocidad de producción de metano (1/día) y t es el tiempo (días). Esta ecuación ha sido utilizada por Kafle y Kim, (2013) y Kwak et al., (2013) para modelar la producción de metano de estiércol de cerdo mientras que Gunaseelan, (2004) la aplicó en el estudio de la cinética de residuos sólidos de frutas y verduras. Un factor importante para interpretar la fase de puesta en marcha de cualquier sistema de DA, es conocer el periodo que necesitan las bacterias metanogénicas para adaptarse al sustrato y al sistema en general. Este tiempo es habitualmente denominado fase de retardo o fase “de retardo” y se considera una medida de la eficiencia del proceso. Este tiempo puede ser calculado a partir de la ecuación o Modelo de Gompertz (MG) que se describe a través de la Ec. II.31:

$$M_p = P * \exp \left[-e^{\left\{ \frac{R_m}{P} (\lambda - t) * e^{1+1} \right\}} \right] \quad \text{Ec. V.3}$$

donde M_p representa la producción acumulada de metano (mL/g SV), P es la producción final de metano (mL/g SV), R_m representa la velocidad de producción de metano durante la fase exponencial (mL/g SV día), λ representa la fase retardo (días) y t representa el tiempo del proceso. Esta ecuación ha sido ampliamente utilizada como una herramienta para analizar la variación de los parámetros en función de las diferentes condiciones de proceso. Una recopilación de referencias bibliográficas al respecto puede encontrarse en el *Capítulo II Sección 5. 2*.

En esta etapa se aplicarán ambos modelos con la finalidad de identificar cuál de ellos presenta el mejor ajuste a los valores experimentales obtenidos en cada ensayo y además evaluar la influencia de las condiciones del proceso sobre los parámetros cinéticos.

Un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos se muestra en la Tabla V.7. La primera columna muestra los valores de la producción final de metano, que para el modelo de PO está representado por B₀ mientras que en el MG está representado por P. Estos valores fueron comparados con la producción final de metano experimental, y se calculó el error para cada uno de los ajustes, donde a medida que aumenta la RSI el error cometido en el valor estimado por ambas ecuaciones también aumenta; siendo mayor el correspondiente al ajuste mediante la ecuación de PO. Si se toma en cuenta el tratamiento que utiliza PC como sustrato con una RSI 6:1 se puede observar que mientras que el MG subestima el valor experimental en 13,8%, el modelo de PO lo hace en 108,3%. El mayor error observado puede atribuirse a que para menor cantidad de inóculo utilizado, los microorganismos necesitan mayor tiempo de

adaptación lo que se observa en un mayor valor de la fase de retardo. Dado que el modelo PO no predice la existencia de esta fase, ya que describe el proceso una vez que comenzó la fase exponencial de metano, no resulta adecuada para explicar el proceso en su totalidad, sobre todo cuando el proceso muestra un periodo de adaptación elevado. Los valores del coeficiente de correlación (R^2) para el modelo de PO se encuentran en el orden 87-98%, mientras que el MG logra explicar más del 99% de los resultados experimentales. Los ajustes de los modelos correspondientes a los sustratos PC, FORSU y SL se muestran en las Figura V.9, Figura V.10 y Figura V.11 respectivamente.

Tabla V.7: Resultado del estudio cinético utilizando el modelo de primer orden (PO) y el modelo de Gompertz (MG)

Compart2 (mL/g)										
Producción final de metano (mL/g SV añadido)				Error %		R²		Parámetros Cinéticos		
	Experimental	B₀	P	PO	MG	PO	MG	PO	MG	
								k (d⁻¹)	Rₘ (mL/g SV día)	λ (días)
PC										
1	381,73	398,07	374,25	-4,3%	2,0%	96,776	99,705	0,063	20,89	2,58
3	241,19	388,06	253,74	-60,9%	-5,2%	96,908	99,712	0,015	6,20	5,80
6	231,90	483,03	263,88	-108,3%	-13,8%	94,599	99,015	0,006	3,67	11,31
FORSU										
1	502,81	525,41	495,923	-4,5%	1,4%	95,376	99,667	0,067	31,99	3,05
3	330,37	411,28	342,828	-24,5%	-3,8%	96,482	99,147	0,027	9,87	3,61
6	315,92	563,40	335,45	-78,3%	-6,2%	96,536	99,664	0,013	8,01	6,61
SL										
1	454,87	526,92	449,10	-15,8%	1,3%	97,778	99,8357	0,041	18,77	2,04
3	139,88	193,082	137,74	-38,0%	1,5%	90,594	99,860	0,028	8,09	7,33
6	87,62	121,45	89,256	-38,6%	-1,9%	87,179	99,926	0,018	4,16	13,40

En cuanto al análisis de los parámetros cinéticos (k para el modelo de PO y R_m y λ para el MG) se observó un comportamiento similar para todos los sustratos: a medida que aumenta la concentración de inóculo en el sistema, aumentan las velocidades (k y R) de producción de metano y disminuye el tiempo de adaptación de los microorganismos al medio, disminuyendo por lo tanto, el tiempo necesario para que comience la etapa de crecimiento exponencial.

De la comparación de los valores obtenidos para la velocidades de producción de metano (k y R_m) entre los distintos sustratos y considerando la RSI 1:1, se observa que FORSU presenta la mayor velocidad (0,06746 día⁻¹ y 31,99 mL/g SV día) en comparación con el resto de los sustratos analizados, que mostraron valores de 0,06252 día⁻¹ y 20,90 mL/gr SV día para PC seguido de 0,04148 día⁻¹ y 18,78 mL/g SV día para SL. Esta tendencia no se pudo verificar para RSI superiores; donde PC mostró los valores más bajos de k y R_m para las RSI 3:1 y 6:1. Esto es, sobre los parámetros cinéticos, no solo influye el tipo de sustrato, sino también la RSI.

El análisis de la fase de retardo mostró que para RSI 1:1, SL es el sustrato de más rápida biodegradabilidad (2,04 días), aunque no se presentan diferencias significativas al 95% de confiabilidad con los valores obtenidos para los demás sustratos, en donde el PC y la FORSU mostraron una fase de retardo de 2,58 días y 3,05 días respectivamente. Para las demás RSI analizadas, se invierte la tendencia general, donde ahora el SL pasa a ser el sustrato que presenta la mayor fase de retardo, mientras que es el FORSU el que presenta los menores tiempos. Posiblemente, esta inversión en los valores sea el resultado de la inhibición del proceso que se observó en las mayores RSI para SL, lo cual pudo generar un aumento mayor de lo esperado para este parámetro.

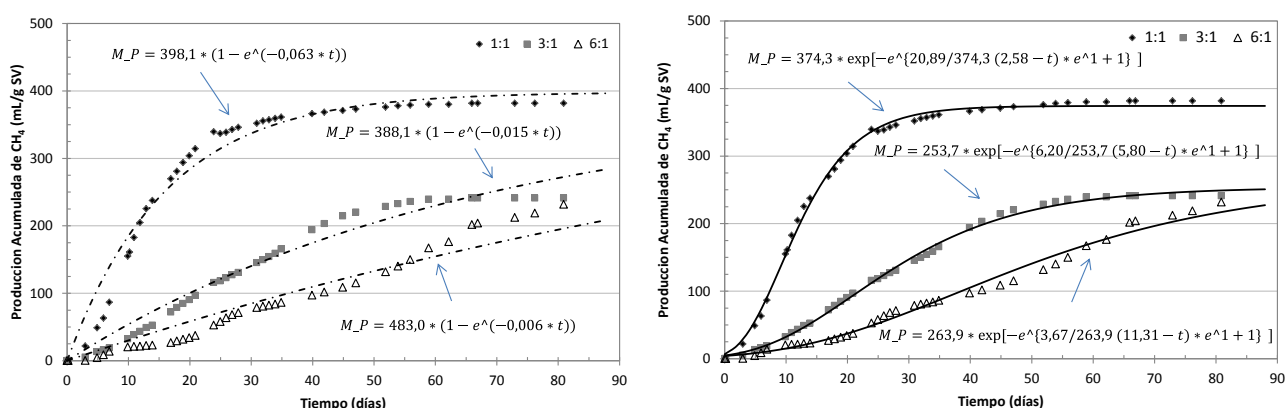


Figura V.9: Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Primer Orden (PO) y a la Ecuación de Gompertz (MG) para PC.

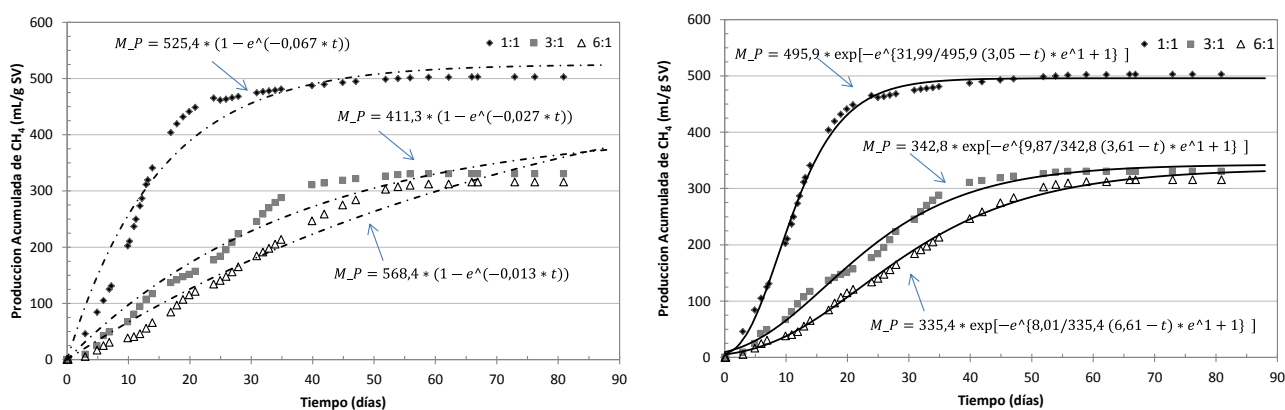


Figura V.10: Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Primer Orden (PO) y a la Ecuación de Gompertz (MG) para FORSU.

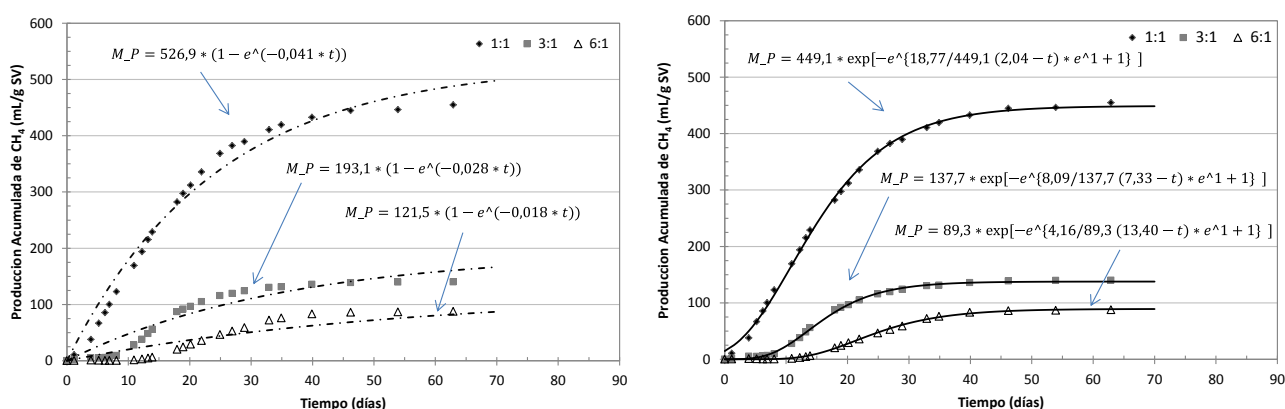


Figura V.11: Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Primer Orden (PO) y a la Ecuación de Gompertz (MG) para SL.

Una forma de analizar el comportamiento de cada sustrato en relación a la fase de retardo es a través de la degradabilidad de sus componentes. La composición química de cada sustrato que fue reportada en el *Capítulo II. Sección 3.7.5*, en donde se indicó que el SL está conformado por un 80,9% de azúcares de fácil biodegradabilidad, principalmente azúcares, almidón y pectina (Labatut et al., 2011), esto justificaría en gran medida que la fase de retardo para el SL sea menor que la de los demás sustrato. Por su parte, el PC presenta 79% de sus componentes de fácil degradabilidad, lo cual incluye, lípido, proteínas, carbohidratos y AGV, mientras que FORSU según Nielfa et al., (2015) contiene solamente 11,6% promedio entre proteínas, lípidos y carbohidratos, con una elevada concentración de fibra alrededor del 35%, lo que hace que el proceso sea más lento al inicio, lo que se verifica como una fase de retardo más elevada que en el resto de los sustratos tal como se verificó para la RSI 1:1. A medida que se incrementa la concentración de sustrato en el digestor, la fase de retardo aumenta, principalmente como resultado de una menor disponibilidad de inóculo y por lo tanto, menor concentración de bacterias metanogénicas presentes en el reactor. El aumento en la fase de retardo al aumentar la RSI de 1 a 6 fue de 338%, 116% y 560% para PC, FORSU y SL respectivamente. En este sentido se puede indicar, que no todos los sustratos presenta el mismo incremento en la fase de retardo al disminuir la concentración de inóculo en el reactor, esto es el resultado de que las distintas composiciones de los sustratos determinarán los distintos productos intermedios en el reactor. En el SL, el aumento observado puede ser el resultado de la inhibición que se presentó. Por lo tanto, las características del sustrato determinan la evolución del proceso evitando en mayor o menor medida problemas de inestabilidad, en casos donde se utilizan bajas RSI se debe prestar mayor atención a la naturaleza del sustrato, ya que definirá la estabilidad del proceso, en este sentido, tanto PC como FORSU mostraron una mejor capacidad para mantener un proceso en condiciones estables aun cuando el aporte de inóculo es bajo.

4. 5. 1. Análisis de la variación de los parámetros cinéticos con la RSI para el PC

En este apartado se analizará la variación de los parámetros cinéticos correspondientes a la ecuación de Gompertz, fase de retardo (λ) y la velocidad de generación de metano (R_m) para PC para las distintas RSI (1:1, 3:1 y 6:1) estudiadas en este capítulo, pero con la finalidad de verificar la variación de estos parámetros en un rango más amplio de RSI, se utilizaron también, los valores experimentales obtenidos en la experiencia T3 del Capítulo IV correspondiente a una RSI de 14:1 (PC con 10% lodos como inóculo). Para ello fue necesario en primer lugar ajustar los datos experimentales al MG. Debido a que en dicho ensayo se verificaron dos etapas de producción de metano, una debido a las bacterias aportadas por el sustrato mismo y la segunda debida a las bacterias aportadas por el inóculo, se ajustaron los datos de producción acumulada de metano a un modelo doble de Gompertz, de forma tal que permita identificar las variables cinéticas que caractericen cada etapa. La Figura V.12, muestra el ajuste de la ecuación doble de Gompertz a los datos experimentales del tratamiento T3 (Capítulo IV). Para poder comparar con los datos de este capítulo, se utilizaron solamente los parámetros cinéticos correspondientes a la segunda etapa de producción de metano, los cuales fueron de 3,5 mL/g SV día para R_m y 68 días para λ .

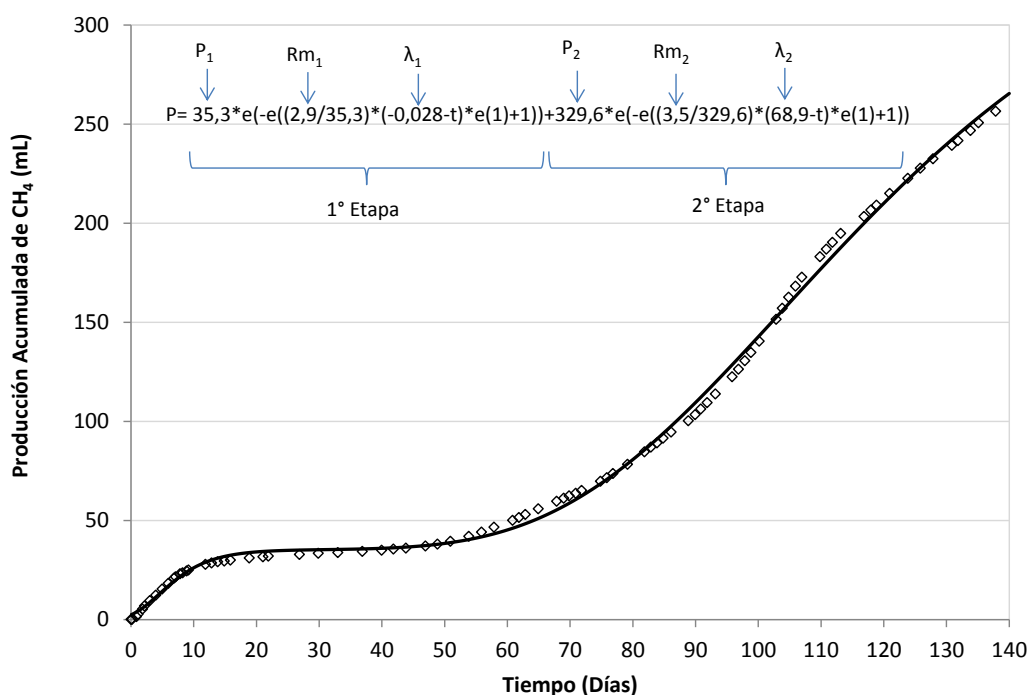


Figura V.12: Ajuste de la Ecuación de Gompertz a los datos experimentales del tratamiento T3 del Capítulo IV.

En la Figura V.13 se muestra la relación entre los parámetros cinéticos obtenidos para todos los ensayos realizados con PC y la RSI. Swinnen et al., (2004) considera a la fase de retardo como un fenómeno inherente a la cinética microbiana observado como un retraso en la respuesta de las poblaciones microbianas ante cambios bruscos de las condiciones ambientales, que se encuentra influenciada además por la cantidad de inóculo utilizado. En base a este análisis, habría de esperar un aumento en el valor de la fase de retardo a medida que disminuye la cantidad de inóculo utilizado, es decir, en el

sentido RSI 1:1 $\rightarrow$ RSI 14:1. El valor de la fase de retardo ($2,67 \pm 0,22$ días) para el tratamiento 1:1 indica una adecuada actividad metanogénica del inóculo, ya que la producción de metano se inicia rápidamente a partir de la inoculación, creciendo a una velocidad exponencial con el aumento de la RSI. La figura muestra además que si se hubieran considerado para el análisis de la variación de la fase de retardo, solamente las primeras tres RSI, la mejor regresión hubiera sido una regresión lineal, en tal caso, la fase de retardo obtenida para la RSI 14:1 hubiera sido de 25 días, mientras que el valor obtenido experimentalmente corresponde a 68 días, es decir, la regresión habría subestimado el valor de la fase de retardo en un 68%. Tomando en consideración todo el rango estudiado, la tendencia que mejor responde corresponde a una de tipo exponencial, con la cual la diferencia entre el valor predicho para λ por la regresión es de 72 días, es decir, solamente un 5,9% mayor que el valor experimental.

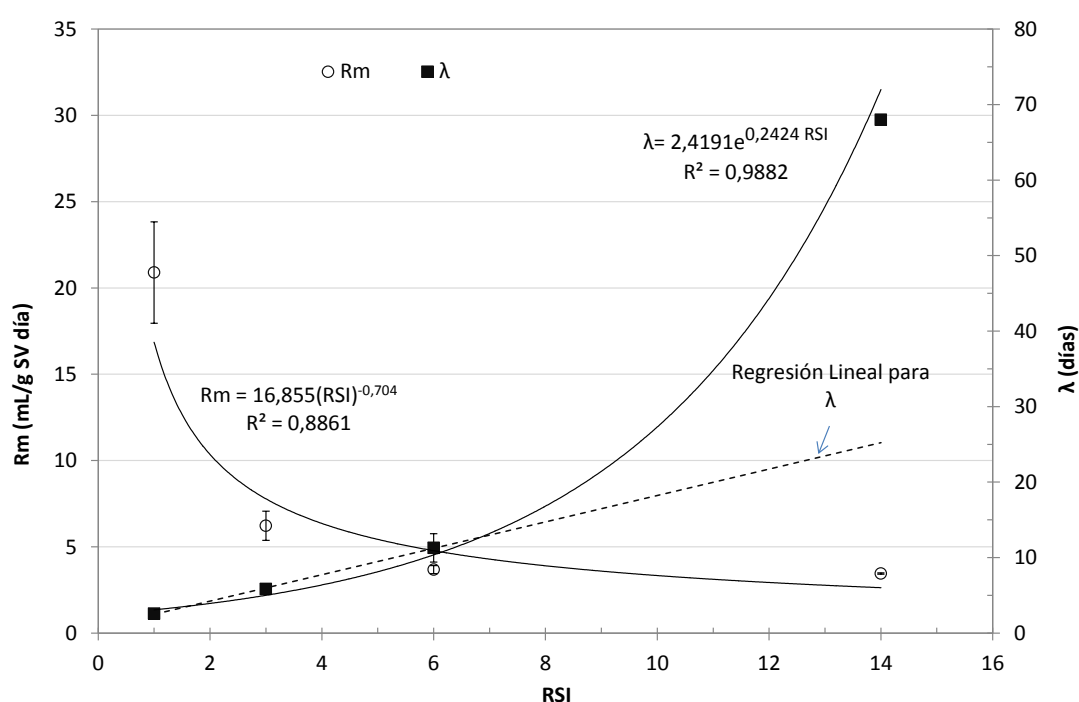


Figura V.13: Velocidad de producción de metano (R_m) y fase de retardo (λ) para las diferentes RSI utilizadas durante la DA de PC.

En lo que respecta a la constante cinética R_m (velocidad de producción de metano), esta decrece con el aumento de la RSI, indicando la ocurrencia de un proceso inhibitorio que reduce la velocidad de generación de metano a medida que aumenta la concentración de sustrato en el reactor. El aumento de RSI de 1:1 a 3:1 provoca un rápido decrecimiento de R_m (70,2%), a partir del cual el incremento de la cantidad de sustrato no afecta significativamente este parámetro, mientras que para la RSI 6:1 la disminución observada con respecto a la RSI 1:1 fue 82,4%, para la RSI 14:1 la disminución fue de 83,5%. En otras palabras, a valores elevados de RSI la cantidad de inóculo influye en menor medida sobre la velocidad de producción de metano (p -valor= 0,0035). Resultados similares fueron encontrados por Raposo et al., (2006) quienes reportaron que las constantes cinéticas de producción de metano decrecen a medida que aumenta la cantidad de sustrato en el reactor, aunque el rango de análisis fue

para las RSI de 1:1, 0,7:1, 0,5:1 y 0,3:1, a diferencia del presente estudio en donde la concentración de inóculo fueron menores.

5. Conclusiones

Del análisis de la influencia de la cantidad de inóculo sobre la DA de los tres sustratos estudiados se destacan los siguientes resultados parciales:

- El incremento de la RSI disminuyó tanto la producción de metano (y biogás) como la velocidad de generación del mismo, independientemente del sustrato utilizado. Las concentraciones máximas de metano para un mismo sustrato resultaron similares para las diferentes RSI utilizadas, difiriendo en el tiempo necesario para alcanzar este máximo (mayor RSI mayor tiempo). Por lo tanto, el incremento en la RSI, implican disminuciones en el volumen de inóculo utilizado, disminuyendo la concentración de bacterias metanogénicas en el reactor, generando un retardo el proceso.
- El tipo de sustrato utilizado tiene un efecto decisivo sobre la producción de metano; del análisis para una misma RSI, FORSU demostró ser el sustrato que presenta la mejor capacidad de producción de metano, tendencia que se mantiene para las diferentes RSI estudiadas. La mayor cantidad de inóculo además favorece una mayor remoción de materia orgánica aunque se observaron leves diferencias en el porcentaje removido entre RSI 1:1 y 3:1.
- En lo que respecta a la variación de las concentraciones de AGV, se observan diferencias significativas entre sustratos: mientras que en PC disminuyó su concentración desde el inicio del proceso para todas las RSI estudiadas, en FORSU y en SL se evidenciaron incrementos durante la primera semana de proceso siendo este aumento mayor a medida que aumentó la RSI. En SL para las RSI 3:1 y 6:1, el aumento en la concentración de AGV provocó la inhibición del proceso. En general al aumentar la concentración de inóculo en el sistema, se verifica un aumento en la velocidad de reducción de la concentración de AGV. Una situación particular la presenta SL, sustrato que ha demostrado ser de difícil tratamiento mediante DA, debido a su tendencia a la acidificación, por lo cual se requiere no sólo asegurar una adecuada alcalinidad al sistema a través del aporte externo de un agente buffer sino además de asegurar una elevada concentración de bacterias metanogénicas. Para altas RSI habría que tomar precauciones mayores durante el período inicial del proceso para evitar incrementos en la concentración de AGV que puedan desestabilizarlo.
- El análisis de la RA demostró que tanto para la RSI 1:1 como para la 3:1, al final del proceso presenta un valor que corresponde a un proceso estable, la única excepción corresponde al SL cuyo valor se encuentra por encima de 0,4 (proceso estable), mientras que para la RSI 6:1 todos los sustratos presentan un cierto grado de inestabilidad.
- Respecto a los modelos cinéticos propuestos, los datos experimentales ajustaron mejor al modelo de Gompertz principalmente a mayor RSI, donde la fase de retardo observada no puede ser predicha por la ecuación de primer orden.

- En cuanto al análisis de los parámetros cinéticos (k para el modelo de PO y R_m y λ para el MG) para los tres sustratos se observó que a medida que aumenta la concentración de inóculo en el sistema, aumentan las velocidades (k y R_m) de producción de metano y disminuye la fase de retardo acelerando el inicio de la fase metanogénica.
- En general se pudo observar que utilizar una elevada concentración de inóculo (menor RSI) asegura mayor producción de metano evitando problemas de inhibición. Sin embargo, aplicar una relación RSI 3:1 contribuiría a incrementar la capacidad del reactor sin presentar problemas de acumulación de AGV favoreciendo el aumento de la AP del sistema y de la remoción de materia orgánica, aunque requeriría mayor control en la fase inicial del proceso.

CAPITULO VI

ANÁLISIS DE LA CO-DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE PURÍN DE CERDO, SUERO DE LECHE Y LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

1. Introducción

La co-digestión anaeróbica es un proceso a través del cual se trata una mezcla de dos o más tipos de residuos de diferentes características con el objetivo de optimizar la producción de metano. La mezcla de sustratos genera una heterogeneidad que provee los nutrientes y elementos trazas necesarios para favorecer el adecuado crecimiento y diversificación de los microorganismos lo cual, según Pagés-Díaz et al., (2014) se evidencia a través de una producción de metano mayor que la que generarían las fracciones individuales.

De los desafíos que plantea la co-digestión anaeróbica el principal es encontrar una concentración adecuada de sustratos que maximice la producción de metano (Hublin y Zelic, 2013; Mata-Alvarez et al., 2000; Pagés-Díaz et al., 2014). Considerando además que, si bien son múltiples las combinaciones posibles que se pueden utilizar, según Esposito et al., (2012) cada caso particular debe investigarse, para determinar las condiciones de operación óptimas en términos de las fracciones relativas de cada sustrato en la mezcla a digerir. Una estrategia adecuada sería la de utilizar residuos que sean capaces de compensar carencias de algunos co-sustratos o de atenuar fenómenos inhibitorios, por ejemplo, la adición de residuos de fácil degradabilidad, tales como residuos de frutas y verduras a los estiércoles de animales, podría incrementar la producción de biogás, como resultado de cambios en las características de los sustratos que serán alimentados al reactor (Callaghan et al., 1999; Li et al., 2009). Aunque si las concentraciones relativas de los sustratos no son las adecuadas para la configuración del sistema, podrían generarse problemas de sobrecarga orgánica, acidificación e inestabilidad del proceso (Carneiro, 2005; Gontupil, 2013; Li et al., 2009).

Los estiércoles provenientes de diferentes tipos de establecimientos de cría intensiva de animales, tales como el purín de cerdo, los estiércoles de gallina o los efluentes provenientes de los tambos, son en general sustratos que abundan y que han sido ampliamente utilizados para la producción de biogás, aunque la DA de estos sustratos como única alimentación al reactor ha sido dificultosa debido principalmente a los elevados contenidos de amonio en los residuos, lo que puede ocasionar el fracaso del proceso (Callaghan et al., 1999; Hansen et al., 1998). Según reporta González-Fernández y García-Encina, (2005) el PC, suele presentar un bajo potencial de producción de metano cuando es digerido sin un co-sustrato. En este sentido, los resultados encontrados en el Capítulo V de esta tesis, muestran que la producción de metano del PC fue en promedio 26% menor que la producción de la FORSU y un 16% menor que la producción del SL⁶. Sin embargo, según reporta Campos Pozuelo, (2001) este residuo es un buen sustrato base para la co-digestión, porque, generalmente, presenta un elevado contenido de agua, una elevada capacidad tampón y además aporta una amplia variedad de nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos anaerobios. En este sentido, el PC mostró un contenido de humedad de 94,4%, mayor que la del FORSU (77,5%), además, una alcalinidad inicial mayor (6.285 mg

⁶ en este caso solo se compararon los valores obtenidos para la RSI 1:1, ya que en las demás RSI estudiadas se verificó inhibición del proceso y por lo tanto no son comparables.

CaCO_3/L) que la del SL o la del FORSU, la cuales fueron nulas, presentando además valores de pH ácidos. En contraste, la DA de FORSU suele presentar deficiencia de nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos anaerobios (relación C/N muy elevada), baja alcalinidad y excesivo contenido en sólidos (Carneiro, 2005). Por su parte el SL, sub-producto de la industria láctea, presenta un elevado contenido de carbohidratos de fácil biodegradación (Gelegenis et al., 2007) aunque su baja o nula alcalinidad, la alta carga orgánica (DQO) y la tendencia a acidificarse rápidamente (Kavacik y Topaloglu, 2010) lo convierten en un sustrato de difícil tratamiento mediante DA. Los resultados encontrados en el Capítulo V concuerdan con lo reportado por estos autores, en donde la tendencia a la acidificación del SL dificultó su tratamiento mediante DA. Por lo tanto, la co-digestión del PC como sustrato base con SL y la FORSU como co-sustratos podría ser planteada como una solución a los problemas generados por cada uno de ellos, lo que permitiría compensar la carencia de nutrientes y la baja alcalinidad de los co-sustratos, así como el bajo potencial de producción de metano en el PC.

Entre las distintas experiencias que han sido encontradas en la literatura relativa al proceso de co-digestión anaeróbica, por lo general se ha trabajado solamente con dos sustratos. En este sentido, Gelegenis et al., (2007) han estudiado el proceso de SL con guano de gallina, encontraron que es factible de evolucionar sin problemas hasta concentraciones de suero de 50% en volumen. Por su parte, Kavacik y Topaloglu, (2010) analizaron la DA de SL con estiércoles provenientes de tambos en reactores continuos a dos regímenes de temperatura (25°C y 34°C), encontrando que el inicio del reactor es un factor fundamental para el proceso, destacando además, la importancia de iniciar el proceso con un estiércol digerido con la finalidad de asegurar la estabilidad del mismo.

La FORSU, por su parte, al presentar un alto contenido en carbohidratos, representa un buen co-sustrato. En este sentido, Yusof et al., (2014) quienes analizaron la producción de metano en co-digestión con estiércol de gallina, encontraron que la máxima producción se obtiene a concentraciones de FORSU de 20% y, que más allá de este porcentaje la producción disminuye como consecuencia de problemas de acidificación. Shin et al., (2008) quienes estudiaron la co-digestión de PC con FORSU, determinaron que la mayor producción de metano se obtiene al utilizar una relación PC/FORSU de 60:40. Kim et al., (2003) por su parte, analizaron el proceso anaeróbico de los FORSU en co-digestión con lodos de depuradora en régimen mesofílico concluyendo que la utilización de una concentración de FORSU de 39,1% en SV optimiza el proceso. En función de los resultados encontrados en la bibliografía se puede establecer que para un determinado sistema, existe una concentración de co-sustratos óptima, donde la producción de biogás será mayor que la de los sustratos individuales. Más allá de esta concentración, se reduce la estabilidad del sistema y por lo tanto la producción de metano, sobre todo cuando se trabaja con residuos con alta carga orgánica y de fácil acidificación.

Más aun, resulta difícil generalizar sobre las características de un sustrato en particular. En el caso de los estiércoles considerado como un buen sustrato base, sus características suelen variar ampliamente de acuerdo a factores tan diversos como la cantidad de agua de lavado, el tipo de alimentación y la edad de

los animales, entre otros (Moller et al., 2004). Por esta razón, es que cada caso debe ser tratado en forma particular.

En lo que se refiere a la selección de la concentración del sustrato a estudiar, del análisis de la literatura se ha observado diferentes criterios: en muchos casos se analiza el rango de 0-100% de co-sustrato (Shin et al., 2008), de 0- 80% en SV (Kim et al., 2003), de 0-70% en SV (Kougias et al., 2010) o concentraciones de hasta el 50% (Callaghan et al., 1999), mientras que otros acotan aún más los rangos analizados, utilizando por ejemplo 0-20% de co-sustrato (Campos et al., 1999). En la mayoría de estos casos, se suele verificar cuál de las experiencias realizadas es la que produce una mayor cantidad de metano o la mayor remoción de materia orgánica y en función de dicha información, se selecciona la concentración de co-sustrato óptima. Sin embargo, mediante dicha metodología resulta difícil determinar si una concentración intermedia de co-sustratos resultaría mejor que las estudiadas.

De acuerdo con lo informado por Venkateswara Rao y Baral, (2011), la revisión de la literatura no reveló una técnica básica para la selección de las proporciones de residuos adecuadas para el proceso de co-digestión que sea capaz de maximizar la producción de biogás y reducir en forma eficiente los SV en el digestor. Tampoco se han encontrado estudios que permitan entender el efecto de la composición sobre la biodegradación del proceso a fin de optimizar las variables de respuesta. Aunque durante los últimos años, para el estudio de la co-digestión anaeróbica ha comenzado a utilizarse el tipo de análisis estadístico conocido como diseños de experimentos, el cual hace referencia al proceso realizado para planear el mismo, con la finalidad de recabar los datos necesarios que posteriormente serán analizados con métodos estadísticos para llegar a conclusiones válidas y objetivas (Montgomery, 2004). Dentro de los diseños de experimentos se puede mencionar un caso particular conocido como diseños de mezcla, en donde se explora cómo cambia una propiedad del proceso al cambiar la composición de la mezcla, y la interacción entre los componentes es estudiada con el objetivo de maximizar la respuesta. Este tipo de diseños tiene la particularidad de que la respuesta dependerá de la cantidad relativa de los componentes en la mezcla y no de su cantidad absoluta (Coronado et al., 2014; Venkateswara Rao y Baral, 2011). La propiedad del proceso finalmente es analizada mediante la metodología de superficie de respuesta, la cual representa al conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras, con el objetivo final de optimizar la variable estudiada. Este método estadístico ha sido aplicado al proceso de co-digestión para analizar la performance del mismo utilizando diferentes tipos de residuos. Capela et al., (2008) quienes estudiaron la producción específica de metano y la remoción de SV en el proceso de co-digestión de FORSU, barros industriales y estiércol de vaca, encontraron que los primeros aumentan la producción de metano, mientras que los barros compensan la alcalinidad del sistema. Pagés-Díaz et al., (2014) analizaron mediante la metodología de superficie de respuesta la producción de metano y su velocidad de generación, identificando los efectos sinérgicos y antagónicos que influyen sobre dichas variables para finalmente optimizar el proceso de la co-digestión de residuos de matadero (rumen, sangre y relleno de intestinos), estiércoles (50% cerdo, 25% de caballo y 25% de vaca), cultivos

(70% fruta verde y residuos de vegetales y 30% de paja) y FORSU. Por su parte, Venkateswara Rao y Baral, (2011) utilizaron la metodología de diseño de mezcla y superficie de respuesta para encontrar la combinación de sustratos que optimice tanto la producción acumulada de metano como la remoción de SV de dos conjuntos de residuos, los que incluían lodos de depuradora, estiércol provenientes de tambos, residuos de jardín y efluentes de la producción de jugos de fruta, encontrando que las mezclas de lodos y estiércoles producían efectos sinérgicos, mientras que la utilización de las aguas residuales de jugo de fruta disminuían los valores de pH de las mezclas, reduciendo la producción de metano. Como puede observarse, esta metodología permite analizar diferentes variables de respuesta, lo que ofrece una herramienta que puede adaptarse a cada estudio en particular. En el proceso de generación de metano, es importante identificar las diferentes etapas que se producen y conocer parámetros que las representan con la finalidad de proveer información para un futuro modelado del proceso, sin embargo, no se han encontrado trabajos que analicen los parámetros que caracterizan la cinética de producción de metano mediante esta metodología. Más aun, en todos los trabajos mencionados se han analizado a los co-sustratos en el rango 0-100%, sin embargo, dependiendo del objetivo del trabajo, si lo que se busca es aumentar la producción de metano de uno de los sustratos en particular mediante la adición de otros co-sustratos, el análisis en todo el rango no sería adecuado, ni brindaría la información que se está buscando. Si por el contrario se define un diseño con rangos acotados, donde se respete que el sustrato base se encuentre en mayor proporción, pero que además la adición de co-sustratos se realice de modo tal que la relación de nutrientes (C/N) se encuentre dentro de los límites establecidos como adecuados para el crecimiento de los microorganismos, acotaremos el rango de trabajo, reduciremos la cantidad de experiencias a realizar, obteniendo finalmente mayor información sobre la producción de metano.

2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es estudiar el proceso de co-digestión anaeróbica del PC utilizando dos co-sustratos altamente disponibles en la zona de estudio, como son los FORSU y el SL. Se aplicará el proceso de co-digestión en biodigestores de tipo batch bajo régimen mesofílico y se estudiará el efecto de la composición de la alimentación sobre la producción de metano, explorando la formulación que optimice los parámetros cinéticos. Se aplicará el procedimiento estadístico de diseño de mezcla y análisis de superficie de respuesta identificando efectos sinérgicos y/o antagónicos que puedan influir sobre la productividad del sistema.

3. Materiales y Métodos

A continuación se detalla el procedimiento realizado para llevar a cabo la experiencia de co-digestión:

- Se seleccionará un diseño estadístico de tipo mezcla a fin de especificar los distintos tratamientos a llevar a cabo, los que se diferenciarán en su composición (concentración de PC, SL, FORSU), para lo cual se establecieron límites en los sustratos considerando:
 - El PC se debe encontrarse en mayor proporción (sustrato principal o sustrato base) por lo tanto debe estar presente en todas las mezclas.
 - La concentración de los co-sustratos se establecerá de forma tal que la relación DQO/N_{total} para todas las mezclas se encuentren dentro del rango 30/1 – 40/1 considerado como adecuado para mantener un proceso estable (Carneiro, 2005; Durruty et al., 2012; Riquelme, 2009).
- Una vez realizada las mezclas se acondicionarán teniendo en cuenta las características físico-químicas de las mismas, con el objetivo de que cada reactor posea los mismos valores de pH y ST. Posteriormente se le añadirá el inóculo, en este caso se optó por utilizar lodos de depuradora en la RSI 3:1, relación que fue seleccionada a partir de los resultados obtenidos previamente en el Capítulo V.
- El primer análisis de los resultados se realizará en función de la producción específica de metano ($mL\ CH_4/gr\ SV$) y la remoción de materia orgánica de cada tratamiento con la finalidad de intentar establecer la influencia de cada sustrato.
- Posteriormente se llevará a cabo el estudio cinético de la producción de metano, en tres etapas:
 - En primer lugar se ajustarán los datos de la producción acumulada de metano para cada uno de los tratamientos a la ecuación de Gompertz y se determinarán los tres parámetros característicos, producción final de metano (**P**) ($mL/ g\ SV$), velocidad de producción de metano durante la fase exponencial (**R_m**) ($mL/g\ SV\ día$), y la fase de retardo (**λ**) (días).
 - Se aplicará el análisis de superficie de repuesta a cada uno de los parámetros de la ecuación de Gompertz, para encontrar el modelo matemático que mejor represente cada uno.
 - Por último se llevará a cabo una optimización conjunta de los tres parámetros, con el objetivo de determinar la composición de la zona o zonas que optimicen todas las variables, buscando que la producción de metano sea mayor, más rápida y que el tiempo de adaptación de las bacterias al nuevo medio sea lo más bajo posible.

3.1. Diseño de experimentos con mezclas (Conceptos Generales)

En los Diseño de Mezclas, los factores están representados por los componentes o ingredientes de la mezcla (x_q), y la característica especial, es que los niveles de cada factor no son independientes, esto es, la suma de los porcentajes de cada componente en una mezcla determinada debe ser 100%. Además sus proporciones (niveles de los factores) deben variar entre 0 y 1 (Eriksson et al., 1998; Kuehl, 2001; StatPoint Technologies, 2010).

Asumiendo una cantidad de componentes q , que serán mezclados juntos en distintas proporciones, la suma total de todos los componentes debe ser igual a un valor determinado T (Ec. VI.1)

$$x_1 + x_2 + \dots + x_q = T \quad \text{Ec. VI.1}$$

Donde T a menudo resulta ser 100%. Además de esta restricción, cada componente debe respetar un límite mínimo y máximo (Ec. VI.2), cuyos valores pueden ser simplemente $L_j=0\%$ y $U_j=100\%$ o ser más restrictivos, en cuyo caso los diseños suelen llamarse diseños restringidos.

$$L_j \leq x_j \leq U_j \quad \text{Ec. VI.2}$$

Las características que definen a las ecuaciones anteriores pueden ser descritas geográficamente dentro de un espacio experimental o factor espacial denominado Simplex. El número de componentes en un experimento con mezclas es el que define el número de ejes que tendrá el factor espacial, es decir, el simplex representa una figura de lados regulares con q vértices en $q-1$ dimensiones. Esto es, para un diseño con dos componentes ($q=2$) el espacio de los factores es una línea recta, mientras que para $q=3$, la región experimental corresponde a un triángulo equilátero (Maldonado Arce, 1996). La Figura VI.1 muestra el simplex para una mezcla de tres componentes y dos dimensiones, el cual es representado como un triángulo equilátero.

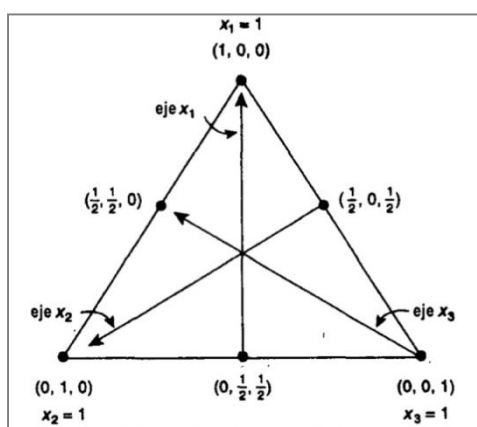


Figura VI.1: Ejes de coordenadas simplex para una mezcla de tres componentes con coordenadas del diseño

Fuente: (Kuehl, 2001)

Los vértices del triángulo representan mezclas de un solo componente o mezclas puras, es decir, $x_j = 1$ y los demás igual a 0. Los lados del triángulo representan las coordenadas del diseño para mezclas de dos componentes con el tercero igual a cero, mientras que las coordenadas del diseño en el interior del triángulo representan mezclas de tres componentes con $x_1 > 0$, $x_2 > 0$ y $x_3 > 0$. Cualquier combinación de proporciones de componentes para un experimento de mezcla debe estar en la frontera o dentro del triángulo de coordenadas que se muestra en Figura VI.1.

3. 1. 1. Metodología de superficie de respuesta

En muchos de los estudios que se realizan con mezclas multicomponentes el énfasis está en la medición de una característica físico-química determinada (variable de respuesta). En un experimento de mezcla con tres componentes ($q=3$), el triángulo equilátero definirá todas las posibles mezclas, y las respuestas a medir para las diferentes proporciones del estudio se representan por medio de una superficie de respuesta que se encuentra sobre el triángulo. En este sentido, la metodología de superficie de respuesta se puede definir como una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y en el análisis de problemas, en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es la optimización de la respuesta (Montgomery, 2004).

Se puede asumir que la superficie de respuesta está representada por una función que relaciona el valor de la respuesta N con las diferentes proporciones de mezcla $(x_1, x_2, \dots, x_q)$ y se debe asumir que la función φ es continua dentro de los $x_j > 0$, con $j=1, 2, \dots, q$. (Ec. VI.3)

$$N = \varphi(x_1, x_2, \dots, x_q) \quad \text{Ec. VI.3}$$

El problema ahora se centra en encontrar la ecuación matemática que represente adecuadamente a la función φ . En general, dichas funciones son representada a través de una función polinómica (Lal, 2007).

La respuesta N puede ser visualizada gráficamente de dos maneras, la primera, donde la respuesta se grafica tridimensionalmente contra los niveles de las variables $(x_1, x_2, \dots, x_q)$ y se denomina *superficie de respuesta* mientras que la segunda opción corresponde a una *gráfica de contorno*, donde líneas de respuesta constante son trazadas en el plano $(x_1, x_2, \dots, x_q)$.

3. 1. 2. Puntos de diseño para los experimentos de mezcla

Para realizar modelos de mezclas de multicomponentes es necesario llevar a cabo algunos experimentos, medir sus características y posteriormente definir una ecuación polinomial que se ajuste a los resultados y que además pueda estimar las respuestas sobre la región del Simplex (Maldonado Arce, 1996). Con la finalidad de estudiar el efecto que cada componente tiene sobre una o más variables respuestas, se puede seleccionar entre los siguientes tipos de diseño de mezcla. La selección dependerá

del número de componentes, de la naturaleza de las restricciones impuestas, así como del modelo al cual se quiera ajustar la superficie de respuesta.

- *Simplex-Lattice*: corresponde a un espaciado del conjunto de puntos sobre un simplex por medio de un arreglo ordenado, el cual consiste en distribuir uniformemente espaciados los puntos sobre la región. Para un diseño lattice $\{q, m\}$, donde q representa los componentes y al que se desea ajustar a un modelo de grado m , el diseño consiste en puntos cuyas coordenadas son definidas por la combinación de proporciones de componentes, donde se utilizarán $m+1$ puntos espaciados igualmente tal como define la Ec. VI.4:

$$x_j = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \quad \text{Ec. VI.4}$$

Si se busca ajustar a un modelo lineal, se utilizan sólo las mezclas puras; mientras que para un modelo cuadrático se aplican mezclas binarias y para un modelo cubico, mezclas ternarias. El número de puntos totales se obtiene por combinaciones de $q+m-1$ en m ($q+m-1 \text{ C } m$). En la Figura VI.2, se muestra el espaciado de puntos en el simplex para un diseño lattice $\{3,3\}$.

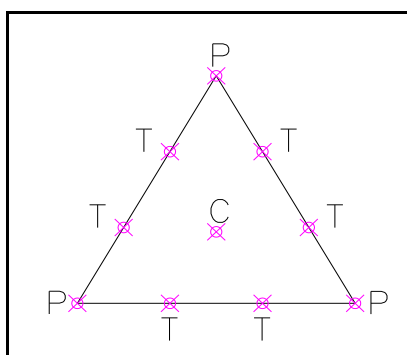


Figura VI.2: Distribución de los puntos en el simplex para el diseño simplex-lattice $\{3,3\}$, donde P (mezclas primarias), T (mezclas ternarias) y C (centroide)

- *Simplex-centroid*: el diseño consiste en $2^q - 1$ corridas de todas las mezclas principales, mezclas binarias, ternarias, etc.; este diseño incluye el punto central dada por la siguiente ecuación.

$$\left(x_1 = \frac{1}{q}, x_2 = \frac{1}{q}, \dots, x_q = \frac{1}{q} \right) \quad \text{Ec. VI.5}$$

La diferencia de este diseño con el diseño simplex-lattice es que éste tiende a ubicar más puntos en el interior del simplex a diferencia del simplex lattice que los ubica sobre los límites, lo que ayuda a detectar curvaturas en la superficie de respuesta.

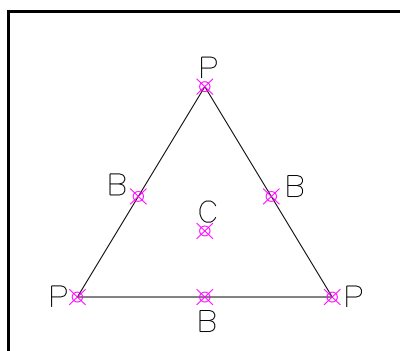


Figura VI.3: Distribución de los puntos en el simplex para el diseño simplex-centroide. P (mezclas primarias), B (mezclas binarias) y C (centroide)

Tal como se observa de las Figura VI.2 y Figura VI.3, la mayoría de las corridas están ubicadas en la frontera de la región, de modo que con excepción del punto central, sólo se analizan mezclas de los $q-1$ componentes. Una posibilidad para resolver esta situación es realizar un aumento del diseño ubicando puntos en el interior del simplex, donde las mezclas están formadas por la totalidad de los componentes.

- *Vértices extremos*, corresponde al diseño en donde cada corrida representa los vértices de la región de estudio. Si se aplican límites superiores e inferiores en los componentes, el diseño espacial puede contener restricciones y por lo tanto la forma del simplex suele no ser regular. En tales casos, los otros dos diseños no se pueden aplicar y este es el único disponible. Un ejemplo de este tipo de diseño se muestra en la Figura VI.4.

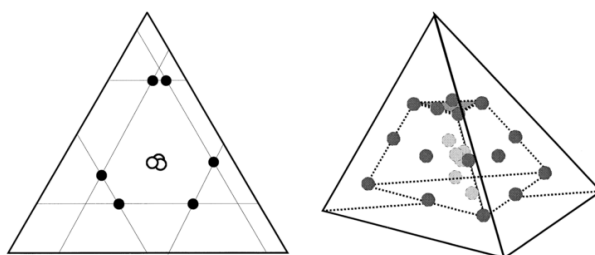


Figura VI.4: Ejemplos de regiones irregulares de mezcla para mezclas de tres y cuatro componentes. Las formas irregulares de estas regiones de la mezcla son causados por las restricciones relacionales a los límites inferior y superior distintos de 0 y 1.

Fuente: (Eriksson et al., 1998)

Una vez seleccionado el diseño y obtenidos los datos de la variable respuesta, se debe identificar el modelo que mejor ajuste a los datos. Los modelos estándares disponibles al que pueden ajustarse los datos corresponden a un modelo lineal, a un modelo cuadrático, a un modelo cubico especial y a un modelo cúbico, cuyos términos se detallan a continuación:

- *Modelo Lineal*

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$$

Ec. VI.6

- *Modelo Cuadrático*

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad \text{Ec. VI.7}$$

- *Modelo cúbico especial*

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad \text{Ec. VI.8}$$

- *Modelo cúbico*

$$\begin{aligned} Y = & \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \\ & + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \delta_{12} x_1 x_2 (x_1 - x_2) + \delta_{13} x_1 x_3 (x_1 - x_3) \\ & + \delta_{23} x_2 x_3 (x_2 - x_3) \end{aligned} \quad \text{Ec. VI.9}$$

En donde β representa a los coeficientes de regresión y x_1 , x_2 y x_3 representan a cada uno de los componentes de la mezcla. Cuando existe curvatura derivada de una mezcla no lineal entre pares de componentes, el coeficiente β_{ij} representa la interacción entre ellos, pudiendo representar efectos sinérgicos (+) o antagónicos (-). El agregado en el modelo de un término de mayor orden suele ser necesario debido a que estos fenómenos de mezclas pueden ser complejos y el término β_{ijk} dará información sobre dicha complejidad.

En algunos diseños de mezcla no es posible explorar el rango completo ($0 \leq x_j \leq 1$) con todos los componentes, esto puede ser porque se requiera que al menos uno de ellos se encuentre en cierta proporción en todas las mezclas. Esto define un tipo de diseños conocido como *diseños restringidos*, donde en lugar de trabajar con componentes se suele trabajar con pseudocomponentes (x'_i), los que tienen la particularidad de variar entre 0 - 1. La transformación de los componentes a pseudocomponentes se realiza de la manera que se indica a continuación a través de las Ec. VI.10 a Ec. VI.13, donde l_i representa el límite inferior de una variable. El mismo procedimiento debería aplicarse en caso de contar con un límite superior para un componente determinado.

$$l_i \leq x_i \leq 1 \quad \text{Ec. VI.10}$$

$$x'_i = \frac{x_i - l_i}{(1 - \sum_{j=1}^p l_j)} \quad \text{Ec. VI.11}$$

$$\sum_{j=1}^p l_j < 1 \quad \text{Ec. VI.12}$$

$$x'_1 + x'_2 + \dots + x'_q = 1 \quad \text{Ec. VI.13}$$

Los pseudocomponentes, en efecto, cambian la escala del área de datos restringida, de manera que la cantidad mínima permisible (el límite inferior) de cada componente sea cero y el máximo sea 1. Esto hace que un diseño restringido en pseudocomponentes sea igual a un diseño no restringido en proporciones. (Minitab, 2007). En donde el rango de cada factor variará entre 0 y 1. De esta manera si el análisis es realizado en pseudocomponentes, permitirá que los coeficientes del modelo sean interpretados como efecto de los factores de mezcla, aun cuando el simplex sea mostrado en las unidades originales (Lundstedt et al., 1998).

3. 1. 3. Selección del modelo adecuado

Tal como se indicó anteriormente, cada variable de respuesta será ajustada a los distintos modelos disponibles para el diseño de mezclas elegido. Posteriormente, la selección del modelo más adecuado será llevada a cabo teniendo en cuenta los siguiente parámetros característicos (Abdullah y Chin, 2010; StatPoint Technologies, 2010; Venkateswara Rao y Baral, 2011).

- Error estándar de la regresión (S), medido en unidades de la variable de respuesta: estima la desviación estándar del término de error en el modelo. Permite controlar la distribución de los datos y se utiliza como una medida del ajuste del modelo en la regresión y en el análisis ANOVA. Como regla general, a menor valor de S mayor respuesta del modelo.
- Coeficiente de determinación (R^2), es un valor que refleja la relación entre el modelo y una o más variables de predicción, y es capaz de medir la bondad del ajuste del modelo a los datos.
- R^2 (ajustado) es un coeficiente de determinación (R^2) modificado que ha sido ajustado por el número de términos del modelo. Mientras mayor sea R^2 (ajustado), mejor se ajustará el modelo a los datos experimentales. Es útil para comparar modelos con diferentes cantidades de términos. Este ajuste es importante porque R^2 siempre aumentará para cualquier modelo cuando se agregue un nuevo término, y por lo tanto parecerá tener un mejor ajuste. En cambio, el valor de R^2 ajustado aumentará sólo si el nuevo término mejora el modelo, pero disminuirá si no lo hace (Minitab, 2007).
- R^2 (pronosticado) es otro parámetro estadístico que refleja con cuánta efectividad predecirá el modelo los datos futuros. De manera general, mientras más grande sea R^2 (pronosticado) mejor ajustará el modelo a los datos (Minitab, 2007).
- PRESS (suma de cuadrados de los errores de predicción) es un parámetro estadístico que evalúa la capacidad predictora del modelo y es utilizado para calcular R^2 (pronosticado). En general, a menor valor de PRESS, mejor será la capacidad predictora del modelo. El valor de PRESS se calcula como la suma de los cuadrados del error de predicción, en forma similar a como se calcula la suma de los cuadrados de error (SSE). Las diferencias con SSE es que el parámetro PRESS se obtiene a partir de los valores pronosticados $\hat{Y}_i$. Este valor pronosticado se obtiene mediante un procedimiento que implica en primer lugar la eliminación de la i -ésima observación del conjunto de datos. Con las n observaciones restante se estima la ecuación de

regresión, la cual se utiliza para obtener el valor pronosticado para la i -ésima observación Y_i (Abdullah y Chin, 2010; Minitab, 2007; Venkateswara Rao y Baral, 2011).

En función de estos parámetros el modelo que presente los valores más bajos de S y PRESS y el valor más alto de R^2 (pronosticado) corresponderá al modelo que mejor ajusta los datos.

3. 1. 4. Significancia de los coeficientes del modelo

Muchas veces el interés del problema se centra en probar la significancia de los coeficientes de regresión individuales, ya que el modelo podría ser más eficaz si se incluyen variables adicionales o si se elimina alguna de ellas. El agregado de una variable al modelo de regresión incrementa por un lado la suma de cuadrados de la regresión ($SS_{\text{regresión}}$), pero disminuirá la suma de cuadrados del error (SSE). Se debe decidir por lo tanto, si el incremento de la $SS_{\text{regresión}}$ es suficiente como para garantizar el uso de la variable adicional, ya que agregar una variable no importante para el modelo incrementará el cuadrado medio del error, reduciendo la utilidad del modelo (Montgomery, 2004).

Para analizar la significancia de los coeficientes de regresión, necesarios para comprender el patrón de las interacciones mutuas entre las variables, se analizan los estadísticos p -valor y t -valor. Cuanto menor sea la magnitud de p -valor y mayor la magnitud de t -valor, más importante será el coeficiente y debe ser mantenido; de otra manera se puede rechazar dicho término (Sen y Swaminathan, 2004; Venkateswara Rao y Baral, 2011).

3. 1. 5. Análisis de la adecuación del modelo

Un modelo de regresión probablemente produzca resultados pobres o equivocados a menos que sea un ajuste adecuado (Montgomery, 2004). Con la finalidad de chequear la adecuación del modelo seleccionado, es necesario contar con toda la información de la falta de ajuste, información que está contenida en los residuos del modelo (Liu et al., 2004; Sen y Swaminathan, 2004). El residuo corresponde a la diferencia entre el valor observado y el valor predicho por la regresión (Venkateswara Rao y Baral, 2011); si el modelo es adecuado, la distribución de los residuos no deben presentar patrones observables. Una forma de verificarlo es mediante la gráfica de residuos. En este trabajo se utilizarán los siguientes gráficos, generados por el programa Minitab, a fin de verificar que los errores están normalmente distribuidos, que son independientes de los demás y que la varianza del error es homogénea (Liu et al., 2004). En el gráfico de la **probabilidad normal de residuos**, los puntos deben formar una línea recta, si los residuos están normalmente distribuidos. Si los puntos en la gráfica salen de la línea recta, el supuesto de normalidad puede ser inválido. El gráfico de **residuos versus valores ajustados** deberá mostrar un patrón aleatorio de residuos a ambos lados del cero. Si un punto se encuentra lejos de la mayoría de los puntos, puede ser un valor atípico. La presencia de un valor atípico puede introducir distorsión en el análisis de la varianza, y por lo tanto la localización de un valor atípico requerirá un análisis más detallado de dicho valor. Una gráfica de **residuos versus orden** en el que se

colectaron los datos (1 2 3 4... n) puede proveer un recurso para inspeccionar visualmente los residuos y determinar si son independientes entre sí, o en otras palabras que no están correlacionados. Finalmente el **histograma de residuos**, provee una herramienta exploratoria que muestra las características generales de los datos, incluyendo valores atípicos o valores inusuales en los datos. La presencia de largas colas en la gráfica podrían indicar sesgo en los datos (Minitab, 2007; Montgomery, 2004).

3. 1. 6. Optimización

Cuando el análisis del problema implica analizar varias respuestas a la vez, la optimización implicará encontrar un conjunto de condiciones de operación que optimice todas las respuestas o que al menos las mantenga en los rangos deseados. Para realizar esta operación de optimización conjunta, en primer lugar será necesario encontrar el modelo de superficie de respuesta adecuado para cada una de las variables.

La técnica de optimización consiste en convertir cada respuesta y_i en una función con condición de deseabilidad individual (d_i) que varía en el rango (0,1), donde si la respuesta está en su meta u objetivo, entonces $d_i = 1$, mientras que si la respuesta está fuera de la región de aceptabilidad, entonces $d_i = 0$. En una optimización múltiple con m respuestas, la deseabilidad global se calcula como una deseabilidad conjunta (Ec. VI.14).

$$D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m} \quad \text{Ec. VI.14}$$

3.2. Caracterización de los sustratos y del inóculo

La Tabla VI.1 resume las características físico-químicas iniciales de los sustratos utilizados para esta experiencia (PC, FORSU y SL) y de los lodos de depuradora utilizados como inóculo. Los valores que se muestran corresponden al valor promedio de las repeticiones $\pm$ la desviación estándar. Las letras junto a los valores, indican si presentan o no diferencias significativas al 95% de confiabilidad para un determinado parámetro.

De todos los sustratos, los FORSU son los de mayor contenido en ST ($22,5 \pm 1,4\%$), y mayor contenido en materia orgánica, expresado tanto en unidades de DQO (181.033 ± 4.830 mg/L) como en unidades de SV ($19,33 \pm 0,59\%$), mientras que el SL por el contrario, corresponde al sustrato que presenta el menor contenido en ST ($1,1 \pm 0,0\%$) y en materia orgánica ($0,93 \pm 0,01\%$ SV y $12.687 \pm 552,1$ mg/L DQO). Estos resultados se diferencian de los observado en el Capítulo V, donde el SL utilizado presentó una concentración de materia orgánica mucho mayor que la de este capítulo, lo que denota la heterogeneidad del mismo; el inóculo, por su parte, presenta un contenido de materia orgánica en términos de DQO estadísticamente similar al SL.

Tanto el SL como los FORSU corresponden a los sustratos más ácidos con valores de 6,26 y 4,3 de pH respectivamente y por lo tanto presentan alcalinidad muy baja o nula. Por otro lado, el PC presenta una mayor AT ($8.019,9 \pm 721,8$ mg/L) y un mayor contenido tanto de nitrógeno total ($4.775,0 \pm 247,5$ mg/L) como de nitrógeno amoniacal ($2.947,6 \pm 39,7$ mg/L) en comparación con el resto de los sustratos. En general estas mismas diferencias entre sustratos fueron observadas en el capítulo previo.

Tabla VI.1: Características Físico-químicas de los sustratos y del inóculo

Parámetro	Inóculo	Sustratos		
	Lodos de Depuradora	PC	SL	FORSU
%ST	$6,1 \pm 0,1^b$	$6,7 \pm 0,1^b$	$1,1 \pm 0,0^a$	$22,5 \pm 1,4^c$
%SV (b.h.)	$3,48 \pm 0,14^b$	$5,58 \pm 0,13^c$	$0,93 \pm 0,01^a$	$19,33 \pm 0,59^d$
DQO (mg/L)	10.735 ± 102^a	$99.879 \pm 1,078^b$	$12.687 \pm 552,1^a$	181.033 ± 4.830^c
pH	7,67	6,79	6,26	4,32
AT (mg CaCO ₃ /L)	$3.091,4 \pm 210,1^b$	$8.019,9 \pm 721,8^c$	$409,3 \pm 7,9^a$	0^a
RA	$0,1 \pm 0,0^a$	$4,3 \pm 0,0^c$	$1,7 \pm 0,5^b$	0^a
N _{Total} (mg/l)	$1.250 \pm 141,4^a$	$4.775,0 \pm 247,5^c$	$445,0 \pm 77,8^a$	$3.350 \pm 636,4^b$
NH ₄ ⁺ (mg/L)	$635,4 \pm 72,7^c$	$2.947,6 \pm 39,7^d$	$7,95 \pm 1,5^a$	$134,8 \pm 7,2^b$
NH ₃ (mg/L)	$32,7 \pm 3,7^c$	$20,9 \pm 0,3^b$	0^a	0^a
DQO/N _{total}	$8,6 \pm 1,0^a$	$21,0 \pm 1,3^{ab}$	$28,8 \pm 3,8^b$	$54,9 \pm 9,0^c$

La relación DQO/N que se observa en la Tabla VI.1 para cada uno de los sustratos, muestra que todos se encuentran por fuera del rango 30/1 – 40/1 necesario para mantener un régimen estable (Carneiro,

2005; Durruty et al., 2012; Riquelme, 2009) y evitar problemas relacionados con el desbalance de nutrientes que fue explicado en el *Capítulo II – Sección 3.5*.

3.3. Selección del diseño de mezcla

Para analizar la cinética del proceso de co-digestión se utilizó un diseño de mezcla con restricciones en los niveles altos y bajos para cada componente (sustratos), tal como se ha indicado, la utilizaron de tres tipos de sustratos, define un diseño con 3 componentes ($q=3$), donde x_1 hará referencia al PC, x_2 al SL y x_3 al FORSU. Para la selección de las restricciones se tuvo en cuenta, que el PC será el sustrato base, al cual se le adicionará los co-sustratos, por lo tanto, se establecen los límite mínimo y máximo para el PC de 60% y 80% en volumen, teniendo en cuenta experiencias previas encontradas en la bibliografía. Carlos et al., (2013) y Córdoba et al., (2013) quienes analizaron la co-digestion del SL con estiércoles de tambo y PC respectivamente, encontraron que concentraciones mayores de un 20% producían reducción en la producción de metano, en función de esta información, se establece 80% de PC como límite máximo. Por otro lado, Kim et al., (2003) y Shin et al., (2008) quienes utilizaron la FORSU como sustrato para la co-digestión con lodos de depuradora y con PC respectivamente encontraron que la máxima producción se obtiene cuando se alcanza el límite 40% en FORSU, a partir de esto se establece como límite inferior el 60% de PC. En función de estas referencias, se establecieron además concentraciones máximas para SL y FORSU de 20% y 40% respectivamente. La Tabla VI.2 resume los valores de los límites mínimos y máximos establecidos para cada uno de los sustratos, teniendo en cuenta, por un lado que la suma de sustratos satisfaga la condición de sumar 100% en todas las mezclas, pero que además cumplan con la condición de poseer una relación DQO/N_{total} dentro del rango 30/1 – 40/1.

Tabla VI.2: Límites en la concentración de los sustratos para el ensayo de co-digestión

Componente	Límite mínimo %vol.	Límite máximo %vol.
PC	60	80
SL	0	20
FORSU	20	40

El diseño seleccionado para la experiencia corresponde al diseño tipo simplex centroid con tres componentes ($q=3$) los cuales definen un diseño con $2^3 - 1 = 7$ tratamientos. La Tabla VI.3 muestra la concentración de cada componente en las diferentes mezclas, tanto en porcentaje en volumen como en pseudocomponentes.

Tabla VI.3: Concentración de los componentes de acuerdo al diseño de mezcla seleccionado

Tratamiento	%Volumen			Pseudocomponentes		
	% PC	% SL	% FORSU	% PC	% SL	% FORSU
T1	66,67	6,67	26,67	33,3	33,3	33,3
T2	60	10	30	0	50	50
T3	70	10	20	50	50	0
T4	60	0	40	0	0	100
T5	70	0	30	50	0	50
T6	60	20	20	0	100	0
T7	80	0	20	100	0	0

El resultado del espacio factorial de todas las mezclas posibles es reducido a un subespacio del simplex original como consecuencia de las restricciones establecidas. La Figura VI.5 muestra la ubicación de los puntos en el simplex con los correspondientes porcentajes en volumen equivalente a los que se muestran en la Tabla VI.3. Cada corrida se realiza por duplicado a fin de determinar el error experimental. Todos los puntos representan una combinación factible de los tres componentes. Los vértices representan puntos en donde uno de los componentes es establecido como su valor máximo, mientras que los otros se mantienen en sus valores mínimos.

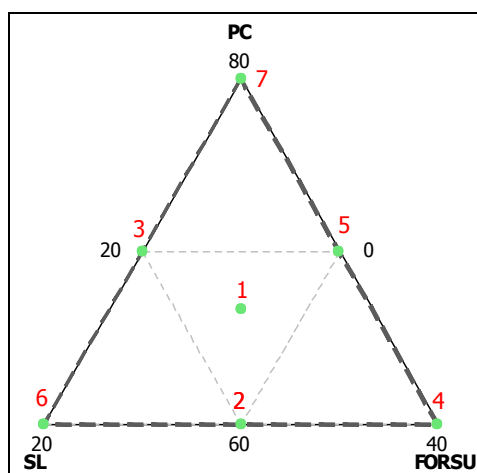


Figura VI.5: Ubicación de los puntos experimentales en el simplex

El diseño de mezcla propuesto (simplex centroe), permitirá que cada variable analizada pueda ser ajustada a tres modelos, el modelo lineal, el cuadrático y el cúbico específico.

3.4. Diseño experimental y acondicionamiento de los reactores

El equipo utilizado para realizar la experiencia es el mismo que el indicado en el *Capítulo III. Sección 1*, el cual consiste en la utilización de biorreactores de tipo batch de 1 L de capacidad mantenidos en condiciones mesofílicas ($35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

El proceso de preparación del sistema de co-digestión se llevó a cabo en etapas. En primer lugar se prepararon las mezclas de los sustratos, luego se procedió a medir los parámetros físico-químicos de interés, para finalmente ajustar los parámetros tales como pH y ST a los valores adecuados para asegurar un régimen de funcionamiento estable del proceso.

La Tabla VI.4 detalla las características iniciales de las mezclas de sustratos antes de incorporar el inóculo. Se observa en todos los casos, que el valor de pH es ligeramente ácido, variando entre 5,76 y 6,19, y que todos los tratamientos presentan valores de la RA de entre 7,32 – 14,16, los cuales resultan elevados en comparación con los sugeridos para un proceso estable (0,3-0,4). Más aun, los valores de ST se encuentran en el límite de lo que se considera una digestión de tipo húmeda (5 a 10%), además de observarse elevados valores de DQO. Estas características en conjunto podían causar la sobrecarga del sistema, aumentando la concentración de los AGV a valores donde se inhiba el proceso y/o se reduzca el pH del sistema a valores donde ya no pueda recuperarse.

Tabla VI.4: Características físico-químicas de las mezclas de sustratos sin inóculo

Reactor	PC/SL/RSU	Características Físico-químicas de las mezclas de sustratos			
		pH	RA	DQO (mg/L)	ST (%)
T1	(66,6; 6,6; 26,6)	5,91	11,98±11,93	94.921±1.640	9,64±0,55
T2	(60; 10; 30)	6,19	7,46±2,50	94.760±1.725	9,91±0,59
T3	(70; 10; 20)	6,11	7,54±0,42	95.123±1.143	9,50±0,45
T4	(60; 0; 40)	5,76	14,16±0,06	98.028±1.240	10,13±0,74
T5	(70; 0; 30)	5,95	8,66±0,07	105.113±6.500	10,99±0,60
T6	(60; 20; 20)	5,96	7,32±0,25	81.259 ±1.382	8,19±0,44
T7	(80; 0; 20)	5,95	7,55±0,21	95.244±1.467	9,09±0,46

A fin de asegurar que los resultados estén influenciados sólo por las proporciones de cada uno de los sustratos y evitar problemas de sobrecarga orgánica, una vez cargados los biorreactores con las mezclas de sustratos en las proporciones indicadas en la Tabla VI.3, se ajustó el contenido de sólidos totales por medio de la adición de agua hasta alcanzar un valor cercano a 5% lo que asegurará el funcionamiento del proceso en condiciones húmedas (mismas condiciones en las que se trabajó en las experiencias realizadas en el Capítulo IV y V). Posteriormente se controló que el valor de pH esté cercano a la neutralidad, adicionando la cantidad necesaria de bicarbonato de sodio. Un procedimiento similar fue llevado a cabo por Capela et al., (2008), quienes añadieron agua en los reactores para disminuir el contenido en ST, micro-macro nutrientes y bicarbonato de sodio y potasio para compensar la alcalinidad del sistema.

Finalmente, después del acondicionamiento de las mezclas, se agregó el inóculo en una relación (en unidades de SV) de 3 partes de sustrato por cada parte de inóculo. Para la selección de la RSI a utilizar en esta experiencia se consideraron los resultados obtenidos en el Capítulo V, donde si bien la mayor

producción de metano fue alcanzada por la RSI 1:1, para la selección de la RSI 3:1, se tuvo en cuenta en primer lugar, que la mayor parte del reactor sea ocupado con la mezclas de sustrato y no de inóculo, y por otro lado, que los reactores que utilizaron como sustrato PC y FORSU no presentaron problemas de acidificación ni inhibición, solamente el SL presento problemas por acumulación de AGV en dicha RSI, sin embargo, en esta experiencia este sustrato se encontrará en bajas proporciones (20% en volumen). Por último, se consideró además, que los reactores que utilizaron una RSI de 3:1 presentaron un aumento mayor en la capacidad buffer al finalizar el proceso y en la remoción de materia orgánica. La caracterización físico-química final de cada tratamiento se muestra en la Tabla VI.5. El volumen final de biomasa (sustratos + agua + inóculo) fue de 670 mL.

Tabla VI.5: Caracterización físico-química de los tratamientos

Reactor	PC/SL/RSU	Características Físico-químicas					
		% SV	DQO	pH	AT	RA	DQO/N _{total}
T1	(66,6; 6,6; 26,6)	3,58 ± 0,16	35.199 ± 560	7,09	4.676 ± 256	2,22	32,9
T2	(60; 10; 30)	3,54 ± 0,16	33.818 ± 566	7,02	4.416 ± 330	2,46	34,6
T3	(70; 10; 20)	3,60 ± 0,15	36.322 ± 142	7,19	5.342 ± 19	1,88	30,3
T4	(60; 0; 40)	3,60 ± 0,16	35.035 ± 3.061	7,26	4.580 ± 58	1,71	38,0
T5	(70; 0; 30)	3,61 ± 0,16	34.554 ± 1.213	7,11	5.039 ± 6	1,67	33,7
T6	(60; 20; 20)	3,55 ± 0,15	35.426 ± 556	7,36	4.869 ± 22	1,55	31,1
T7	(80; 0; 20)	3,58 ± 0,15	38.002 ± 542	7,33	4.742 ± 7	1,82	29,5

De la Tabla VI.5 se observa que el contenido en SV se mantuvo entre 3,54 y 3,61 no presentando diferencias significativas entre los valores al 95% de confiabilidad (p -valor=0,9988). En la tabla también se muestran los valores finales de la relación DQO/N_{Total} para cada uno de los tratamientos, solamente el tratamiento T7 con un valor de 29,5 (DQO = 38.002 ± 542 mg/L), se encuentra ligeramente por debajo del límite inferior del rango 30/1-40/1, establecido previamente. El pH se encuentra en torno a la neutralidad (7,02 T2 – 7,36 T6), mientras que los valores de la AT están por encima de 3.000 mg CaCO₃/L, valor sugerido por Molina et al., (2009) y Voß et al., (2009), establecido como necesario para asegurar la estabilidad del proceso y evitar caídas en los valores de pH ocasionados por la formación de los AGV (Gerardi, 2003). El valor de la RA disminuyó notablemente (en promedio la reducción fue de un 78%) con respecto a los valores de las mezclas informado en la Tabla VI.4 (sin inóculo y sin acondicionamiento), revelando la acción sinérgica de la dilución, de la incorporación del inóculo y de la adición de un tampón como es el bicarbonato de sodio.

4. Análisis de los resultados

4.1. Producción de metano y eficiencia del proceso en términos de remoción de materia orgánica

El proceso de DA tuvo una duración aproximada de 70 días. De igual manera que en los capítulos anteriores, la performance del proceso será analizada en función de la producción acumulada de biogás y metano, así como la remoción de materia orgánica en unidades de SV. Dichos valores se muestra en la Figura VI.6. Los tratamientos que producen la mayor cantidad tanto de biogás como de metano corresponden a los reactores T1, T2 y T6 (293,9 mL CH₄/g SV en promedio), no presentándose diferencias significativas entre sus valores al 95% de confiabilidad. En contraste, los reactores con la menor productividad tanto de biogás como de metano corresponden a los reactores T3, T5 y T7 con una producción promedio de metano de 252,9 mL CH₄/g SV. Por su parte, la remoción de la materia orgánica expresada en unidades de SV varió en el rango 51,7 (T7) - 62,8% (T4), aunque a excepción del tratamiento T7 todos los demás no presentan diferencias significativas entre ellos al 95% de confiabilidad.

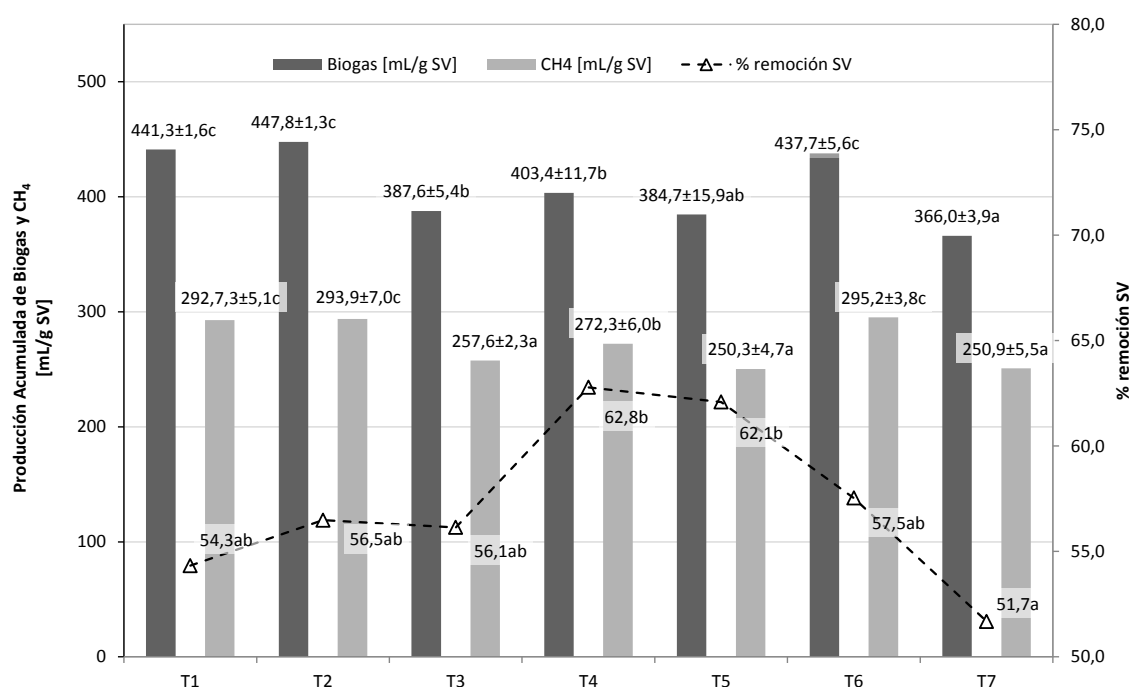


Figura VI.6: Producción acumulada de biogás, metano y remoción de SV en los tratamientos T1 a T7. Para un determinado parámetro, iguales letras indican que no hay diferencias significativas entre sus valores medios al 95% de confiabilidad.

Teniendo en cuenta la producción de metano alcanzada por el PC y la FORSU en la RSI 3:1 del Capítulo V, la cual fue de 241 mL/g SV, y 330 mL/g SV respectivamente, se puede observar que la producción de metano para las mezclas fue mayor que la del PC. En este sentido, la producción final alcanzada por los tratamientos T7 (80, 0, 20) y T4 (60, 0, 40) fue de 4,1% y 12,9% mayor que el obtenido para el PC solo, indicando la influencia de agregado de FORSU sobre las mezclas. Por otro lado, se puede analizar el efecto del SL sobre el proceso comparando la producción de metano de los tratamientos T3 (70, 10, 20)

y T6 (60, 20, 20) con T7 (80, 0, 20), resultando en un aumento de la producción de metano de 2,6% y 17,6% al aumentar la concentración de SL de 0 a 10% y de 0 a 20% respectivamente. En función de estos resultados, se puede verificar que la utilización de los co-sustratos, tanto de SL como de la FORSU, dio como resultado un aumento en la producción de metano.

Del análisis de la Figura VI.6, no se puede observar una relación entre la producción de metano y la remoción de materia orgánica. Sin embargo, si se analizan estos parámetros en función de la concentración de PC en el reactor (Figura VI.7), se verifica una tendencia decreciente tanto en la remoción de materia orgánica como en la producción de metano a medida que aumenta la concentración de PC en el reactor. Esto es el resultado de que los co-sustrato utilizados (SL y FORSU) presentan tanto un elevado contenido de materia orgánica de fácil degradación, como un elevado potencial de producción de metano, tal como se demostró en el *Capítulo V*.

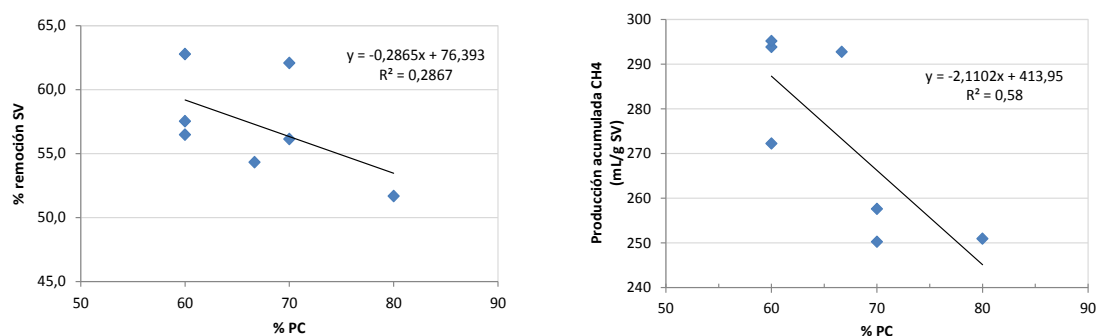


Figura VI.7: Remoción de materia orgánica (% SV) y producción de metano en función del contenido de PC en el reactor

Con el objetivo de verificar cómo evolucionó el proceso, al final del mismo se midieron los valores de pH y alcalinidad (AT, AP y AI), a partir de los cuales se determinó la RA. Los valores de pH y de la RA para los distintos tratamientos se muestran en la Figura VI.8, donde se observa que la RA se mantuvo en el rango recomendado de 0,3-0,4, por lo cual se puede indicar que no se produjo acidificación durante el proceso en ninguna de las mezclas analizadas. Por su parte, los valores de pH al final del proceso se encuentran en torno a la neutralidad, manteniéndose en el rango 7,5-8,0.

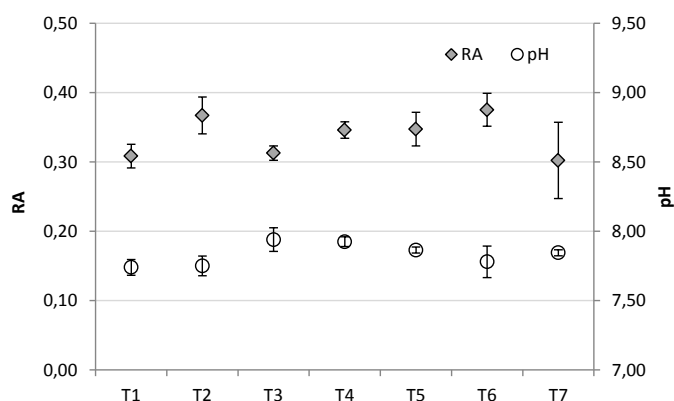


Figura VI.8: RA y pH de los tratamientos al finalizar el proceso anaeróbico

4.2. Estudio cinético: Ajuste de la producción de metano a la Ec de Gompert

En la Figura VI.9, se muestra la producción acumulada de metano (mL/g SV) obtenida experimentalmente para cada tratamiento (puntos) como valor medio para las repeticiones realizadas y el ajuste de los datos a la ecuación de Gompertz (línea llena), junto con el coeficiente de determinación (R^2) para el ajuste, mientras que en la Tabla VI.6 se muestran los parámetros del ajuste. En todos los casos el coeficiente de determinación (R^2) resultó superior a 99%, e indica la bondad del ajuste de los datos experimentales al modelo aplicado.

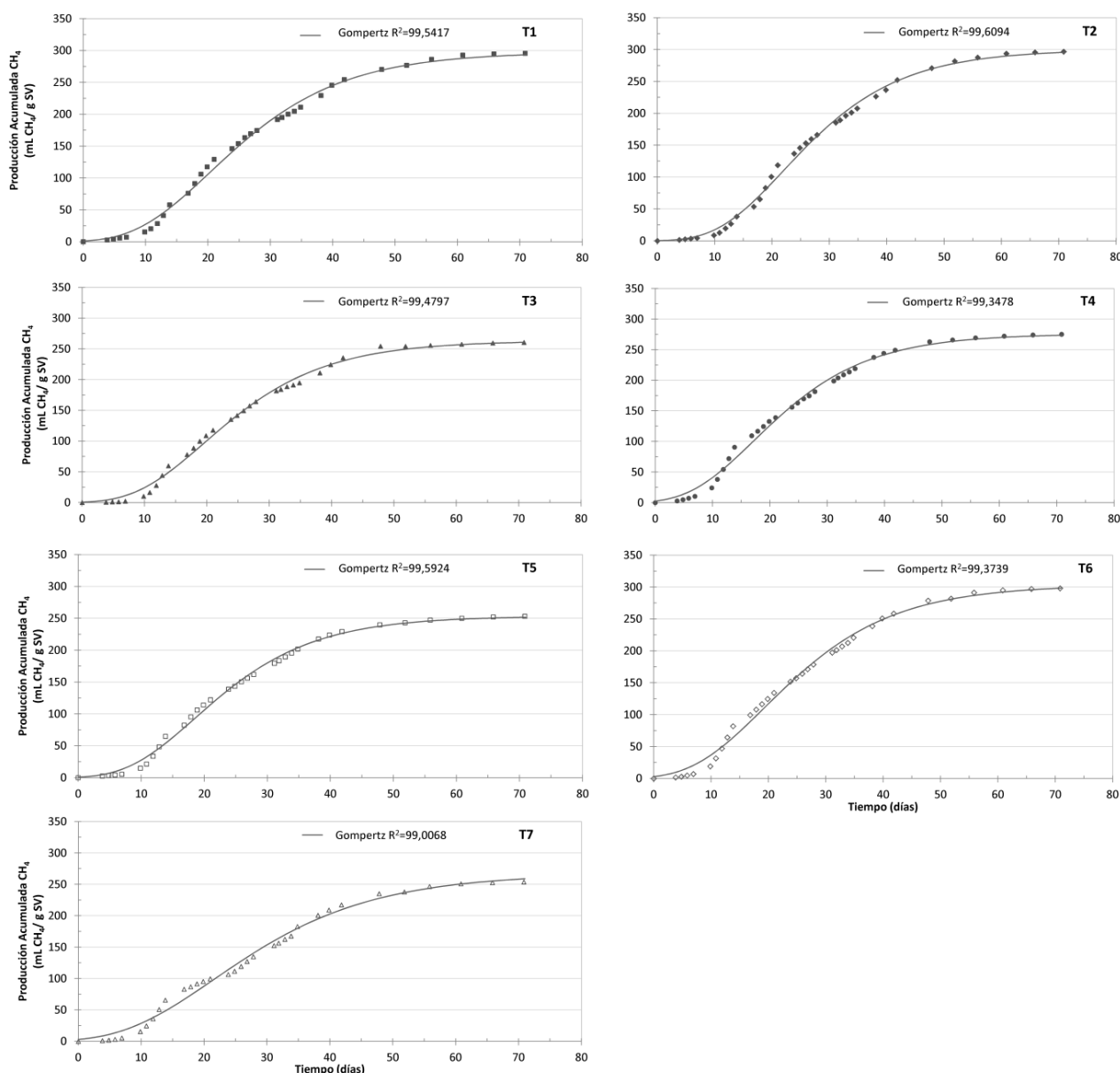


Figura VI.9: Ajuste de la ecuación de Gompertz a los datos experimentales

En general se observa que los valores de P (producción final de metano) obtenidos mediante la ecuación de Gompertz subestiman los valores de producción final obtenidos experimentalmente, sin embargo, la mayor diferencia es del orden de 6,6%, la cual se da en el tratamiento T7 (80, 0, 20), cuyo valor de R^2 es

menor al de los demás y es ligeramente superior al 99%. En los restantes tratamientos el error no supera el 2,8%. El tratamiento T6 (60, 20, 20) es el que presenta el mayor valor de P ($303,4 \pm 9,7$ mL/g SV) y es seguido por los tratamientos T2 (60, 10, 30) y T1 (66,67; 6,67; 26,67), indicando que la mayor producción es alcanzada por aquellos reactores que en su composición tienen tanto SL como FORSU en mayor proporción. En contraste los que presentan un menor valor de P corresponde a los tratamientos T3, T5 y T7, que son aquellos que tienen en su composición 30% y 20% de los co-sustratos (SL y FORSU). Un análisis de la influencia de los co-sustratos sobre la producción de metano fue realizado en la *sección 4.1* de este capítulo.

La velocidad de generación de metano en la fase exponencial (R_m) para los distintos tratamientos puede ser comparada con los valores obtenidos en el *Capítulo V sección 4.5 (Modelado de la producción de metano)*. Para los sustratos en forma individual y para la RSI 3:1, se observó un aumento de la velocidad en el sentido PC, SL, FORSU con valores de 6,20, 8,08 y 9,80 mL/g SV día respectivamente. Se verifica que el reactor que presenta la menor velocidad de producción de metano corresponde al tratamiento T7 (80, 0, 20) con una velocidad de $6,9 \pm 0,5$ mL/g SV día, valor que es esperable teniendo en cuenta que corresponde al reactor con la menor concentración de co-sustratos. Se verifica además, un aumento en las velocidades de producción de metano del 30,4% al aumentar la concentración de la FORSU de 20 (T7) a 40% (T4). El tratamiento T2 (60, 10, 30) presenta el mayor valor de R_m , y corresponde a un valor mayor del que podría esperarse en función de los valores encontrados para las velocidades individuales, pudiendo ser el resultado de una interacción sinérgica entre los distintos sustratos.

El tercer y último parámetro obtenido corresponde a la fase de retardo (λ), el cual brinda información sobre el tiempo transcurrido desde el inicio de la experiencia hasta el inicio de la fase exponencial. De la Tabla VI.6 se observa que la fase de retardo varía entre $6,0 \pm 1,0$ días para el tratamiento T4 y $10,5 \pm 0,8$ días para el tratamiento T2. Estos valores son superiores a los obtenidos para los sustratos individuales, que mostraron valores de la fase de retardo de 5,80, 3,60 y 7,33 días para el PC, la FORSU y el SL respectivamente. En función de los valores individuales y de los obtenidos para los distintos tratamientos de co-digestión, se observa un efecto sinérgico que aumenta los valores de la fase de retardo en mayor medida de lo que se podría esperar a partir de las fracciones individuales. La presencia de un medio más heterogéneo que por un lado favorece una mayor producción de metano como consecuencia de una mayor variedad de nutrientes, por otro, el sistema necesita tiempos de adaptación mayores, aumentando por lo tanto los valores de la fase de retardo. A diferencia de los valores de P y R_m , en donde fue posible encontrar alguna relación entre la adición de los co-sustratos y el valor de dichos parámetros, en el análisis la fase de retardo, no fue posible encontrar una tendencia clara en los datos.

Tabla VI.6: Parámetros de la Ecuación de Gompertz

Reactor	Producción final de metano (mL/g SV añadidos)			Parámetros Cinéticos de Gompertz		
	Experimental	P	% error	R _m (mL/gr SV/día)	λ (días)	R ²
T1	297,5±5,1	297,8±8,2 ^d	1,7%	9,2±0,5 ^{bc}	8,4±0,8 ^c	99,5417
T2	293,9±7,0	300,1±7,9 ^d	2,1%	9,6±0,5 ^c	10,5±0,8 ^d	99,6094
T3	257,6±2,3	263,3±7,2 ^b	2,2%	8,8±0,5 ^b	8,5±0,9 ^c	99,4797
T4	272,3±6,0	276,1±7,9 ^c	1,4%	9,0±0,6 ^{bc}	6,0±1,0 ^a	99,3478
T5	250,3±4,7	253,7±5,9 ^a	1,4%	8,7±0,5 ^b	7,8±0,8 ^{bc}	99,5924
T6	295,2±3,8	303,4±9,7 ^d	2,8%	8,9±0,6 ^b	6,8±1,0 ^{ab}	99,3739
T7	250,9±6,5	267,4±12,4 ^{bc}	6,6%	6,9±0,5 ^a	7,1±1,3 ^{abc}	99,0068

Del análisis preliminar de los parámetros de la ecuación de Gompertz se observa que el tratamiento T6 (60, 20, 20) corresponde al de mayor producción final de metano (P), mientras que el tratamiento T2 (60, 10, 30) maximiza tanto la velocidad de generación de metano (R_m) como la fase de retardo (λ), en contraste el tratamiento T4 con la composición (60, 0, 40) es el reactor que presentó la menor fase de retardo, aunque presenta valores de P y R_m intermedios entre los demás reactores. Por lo tanto, si lo que se busca es optimizar el sistema maximizando las variables P y R_m y minimizando la fase de retardo (λ), es necesario hacer uso de una herramienta tal como la metodología de superficie de respuesta, que permita hacer un análisis más amplio de estos parámetros en toda la zona de estudio de forma que podamos encontrar una composición que permita satisfacer todas las condiciones impuestas.

4.3. Estudio cinético: Análisis de los parámetros de Gompertz mediante la metodología de superficie de respuesta

Las variables que se obtienen del ajuste de la ecuación de Gompertz (P, R_m y λ) definen parámetros propios del proceso de DA tales como el tiempo necesario para la adaptación de las bacterias al nuevo ambiente o fase de retardo (λ), la máxima velocidad de crecimiento de las bacterias en el medio específico (R_m) así como la producción final de metano (P) de cada mezcla en particular. El poder analizar estas variables a través de la metodología de superficie de respuesta permitirá investigar la influencia de cada una de los sustratos individuales sobre los parámetros del proceso, identificando además, si se presentan efectos sinérgicos o antagónicos que aumenten o disminuyan los valores de los parámetros cinéticos más de lo que se debería esperarse en función de las fracciones individuales.

4.3.1. Selección del modelo más adecuado

Las variables de respuesta (P, R_m, y λ) fueron ajustadas a los modelos lineal, cuadrático y cúbico específico, disponibles de acuerdo al diseño de mezclas seleccionado (simplex centroide). En la Tabla VI.7, se muestran los valores del error estándar de la regresión (S), y los coeficientes de determinación, R², R² (ajustada) y R² (pronosticado), así como la suma de cuadrados estimados (PRESS) para cada uno

de los modelos, los cuales son utilizados para determinar aquel que mejor ajuste a los datos experimentales. Tal como se indicó en la sección 3. 1. 3. del presente capítulo, el modelo que presente los menores valores de S y PRESS y el valor más alto de R^2 (pronosticado) será el que represente el mejor ajuste. En base a este análisis, el modelo cúbico específico resulta el más adecuado para ajustar a los parámetros P y λ , mientras que el modelo cuadrático lo es en relación a la variable R_m . De acuerdo con Olivato et al., (2013) un valor de R^2 mayor a 0,7 indica un buen ajuste a los valores experimentales. Tal como se observa de la Tabla VI.7, todos los valores de R^2 se encuentran por encima del 90%, y la capacidad predictora del modelo - que se puede analizar a través del valor de R^2 (pronosticado)- presenta valores de 64,40% para λ , 74,63% para R_m y 91,19% para P, lo que indica que los modelos seleccionados son adecuados para realizar predicciones para otras composiciones que se encuentren dentro del simplex, pero que no hayan sido realizadas experimentalmente. El valor de R^2 (pronosticado) para λ no es tan elevado como para las demás variables analizadas, sin embargo, teniendo en cuenta los demás parámetros estadísticos, se considera que el modelo es apropiado para el análisis.

Tabla VI.7: Resumen estadístico de los modelos aplicados para ajustar los parámetros de la ecuación de Gompertz (P, R_m y λ)

Modelo	Error estándar de la regresión S	Regresión R^2	Ajuste de la regresión R^2 (ajustado)	Regresión estimada R^2 (pronosticado)*	Suma de Cuadrados estimada PRESS*
P					
Lineal	13,88	56,70	48,83	38,82	2995,97
Cuadrático	11,85	77,05	62,71	47,51	2570,33
Cúbico específico	3,93	97,80	95,91	91,19	431,39
R_m					
Lineal	0,53	69,04	63,42	41,61	5,72
Cuadrático	0,29	92,93	88,51	74,63	2,49
Cúbico específico	0,31	93,20	87,36	72,78	2,67
λ					
Lineal	1,57	4,04	0,00	0,00	47,38
Cuadrático	0,76	83,71	73,52	54,15	13,01
Cúbico específico	0,60	91,11	83,49	64,44	10,09

* Valores estimados mediante Minitab 15.

4. 3. 2. Análisis de regresión para P, R_m y λ

La función polinomial que representa a la superficie de respuesta y que relaciona el valor de las variables P, R_m y λ con las diferentes proporciones de los sustratos de la mezcla, tendrá coeficientes que analizan la influencia de los componentes puros (β_i), de la combinación de las mezclas de dos componentes (β_{ij}) y del efecto más complejo que se analiza a través de la interacción entre los tres componentes (β_{ijk}). El signo de cada coeficiente brindará información sobre su influencia en la variable de análisis, pudiendo presentar un efecto sinérgico si el signo es positivo, o antagónico si el signo es

negativo. La significancia de cada coeficiente será determinada mediante los estadísticos t-valor y el p-valor, siendo más significativo a mayor magnitud de t-valor y a menor p-valor (Yetilmezsoy et al., 2009). En la Tabla VI.8 se muestran los coeficientes de los modelos para los tres parámetros analizados, y se incluye además, el coeficiente de regresión, el coeficiente de regresión ajustado y el p-valor del modelo⁷. Del análisis de este último parámetro se puede corroborar que los modelos seleccionados son adecuados para ajustar a los datos experimentales (Liu et al., 2004; Sen y Swaminathan, 2004; Yetilmezsoy et al., 2009).

Tabla VI.8: Coeficientes de regresión para los modelos cúbico específico (P, λ) y cuadrático (Rm)

Término	P (mL/g SV)				Rm (mL/g SV día)				λ (días)			
	Coef	ES coef	t-valor	p-valor	Coef	ES coef	t-valor	p-valor	Coef	ES coef	t-valor	p-valor
β_1	267,6	2,776	*	*	6,87	0,2073	*	*	7,16	0,4245	*	*
β_2	303,4	2,776	*	*	8,87	0,2073	*	*	6,75	0,4245	*	*
β_3	276,1	2,776	*	*	9,06	0,2073	*	*	5,98	0,4245	*	*
β_{12}	-88,3	13,597	-6,5	0,000	3,52	0,953	3,69	0,006	6,23	2,0795	3	0,020
β_{13}	-72,5	13,597	-5,33	0,001	2,91	0,953	3,05	0,016	4,97	2,0795	2,39	0,048
β_{23}	41,1	13,597	3,02	0,019	2,42	0,953	2,54	0,035	16,53	2,0795	7,95	0,000
β_{123}	776,8	95,664	8,12	0,000					-35,32	14,6303	-2,41	0,046
	$R^2 = 97,7977\%$; R^2 (ajustado) = 95,9101 % p-valor = 0,0000				$R^2 = 92,9269\%$; R^2 (ajustado) = 88,5062% p-valor = 0,0002				$R^2 = 91,1098\%$; R^2 (ajustado) = 83,4896% p-valor = 0,0022			

*Los coeficientes están expresados en pseudocomponentes
1: PC, 2: SL, 3: FORSU

Del análisis de los valores obtenidos para β_i se verifica que tanto el SL como la FORSU son los sustratos que ejercen la mayor influencia sobre la producción de metano (P) con 303,4 y 276,1 mL/g SV en comparación con el PC (267,6 mL/g SV). Estos valores pueden ser comparados con los valores obtenidos para P en los sustratos individuales del *Capítulo V sección 4.5*. El valor individual de P para PC fue de 253,7 mL/g SV comparable al valor de esta experiencia, mientras que el valor obtenido para FORSU fue de 342 mL/g SV, ligeramente superior al estimado por este modelo. Por su parte para el SL y la RSI 3:1 se había corroboró inhibición del proceso y por lo tanto el valor obtenido de P no es útil para realizar ninguna comparación, sin embargo, se puede calcular un valor teniendo en cuenta la reducción en el valor de P que se alcanzó para los otros dos sustratos al aumentar la RSI de 1:1 a 3:1, la cual fue en promedio de $35,5 \pm 1,8\%$, tomando en consideración esta reducción y la producción de SL para la RSI 1:1, el valor estimado de P para el SL sería de 293,2 mL/g SV, comparable al obtenido por el modelo cúbico específico para P. Los valores de los coeficientes individuales para Rm fueron de 6,87 mL/g SV día para el PC, de 8,87 mL/g SV día para el SL y de 9,06 mL/g SV día para la FORSU, los que se encuentran en el orden de los obtenidos para los sustratos individuales del *Capítulo V*, cuyos valores fueron de 6,20, 8,08

⁷ Las tablas de ANOVA para cada uno de los modelos se muestran en el *Anexo Sección 2.4*

y 9,80 mL/g SV día para el PC, SL y FORSU respectivamente. Por su parte el valor de la fase de retardo (λ), obtenido para la co-digestión de 7,16, 6,75 y 5,98 días superan los valores obtenidos en forma individual, los cuales fueron de 5,80, 7,33, y 3,62 para el PC, el SL y la FORSU respectivamente.

El análisis de las mezclas binarias para P evidencia efectos tanto de tipo sinérgicos ($\beta_{23} = 41,1 \text{ mL/g SV}$) como antagónicos ($\beta_{12} = -88,3$, $\beta_{13} = -72,5 \text{ mL/g SV}$), siendo todos significativos para el modelo ($p < 0,05$) (Tabla VI.8). El análisis de estos coeficientes, sugiere que las mezclas binarias de PC con SL o con FORSU, disminuirán la producción de metano con respecto a la obtenida teniendo en cuenta la los sustratos individuales. Desde el punto de vista operativo, esto podría ser el resultado de un cierto grado de acidificación o de formación de AGV, lo que generaría una reducción en la producción de metano por un cierto grado de inhibición del proceso. Además de los coeficientes binarios, también se debe analizar en este caso el coeficiente ternario que tiene en cuenta la interacción entre los tres sustratos β_{123} y cuyo valor es de 776,8 mL/g SV ($p\text{-value} = 0,0000$), lo cual indica que, la producción de metano de las mezclas de los tres sustratos será mayor que la obtenida para los fracciones individuales como resultado de un efecto sinérgico de gran importancia, este aumento podría estar relacionado con una mayor disponibilidad de nutrientes para las bacterias lo cual resulta en una mayor producción de metano que la de los sustratos individuales. De acuerdo con Pagés-Díaz et al., (2014) la heterogeneidad en los sustratos será capaz de proveer los nutrientes y elementos trazas que las bacterias necesitan, dando como resultado que diferentes tipos de microorganismos crezcan dentro del reactor estimulando el proceso, lo que se verifica en los efectos sinérgicos observados.

Del análisis de las mezclas binarias para R_m , se observa que cualquiera de ellas presenta efectos sinérgicos sobre el modelo, $\beta_{12} = 3,52$, $\beta_{13} = 2,91$ y $\beta_{23} = 2,42 \text{ mL/g SV día}$, todos significativos ($p < 0,05$), aunque el coeficiente de mayor importancia corresponde al coeficiente β_{12} que analiza la interacción entre el PC y el SL esto es, la mezcla generará metano a una velocidad mayor que la de los sustratos individuales como resultado de los efectos sinérgicos. Estos resultados sugieren que la utilización de una mezcla de los tres sustratos seleccionados representa una alternativa adecuada ya que permitirá aumentar no sólo la producción de metano, sino también su velocidad de generación, lo que se explica en la acción específica que ejercen sustratos de fácil biodegradabilidad y de alto contenido orgánico como la FORSU y el SL.

Con respecto a la fase de retardo, se identificaron todos efectos sinérgicos para los coeficientes binarios, donde el más significativo corresponde a la interacción entre el SL y la FORSU ($\beta_{23} = 16,53 \text{ días}$), esto dará como resultado que las mezclas binarias presentaran fases de retardo mayores que la esperada por la de los sustratos individuales. Solamente el coeficiente ternario $\beta_{123} = -35,32$ presenta un efecto antagónico sobre la fase de retardo del sistema, aunque es menos significativo que los demás coeficientes como se observa de su $p\text{-valor}$ (0,046). Esto podría ser el resultado de que al haber en el sistema una gran heterogeneidad de residuos, las bacterias necesitaran tiempos de adaptación superiores para comenzar a utilizar todos los sustratos disponibles en el sistema.

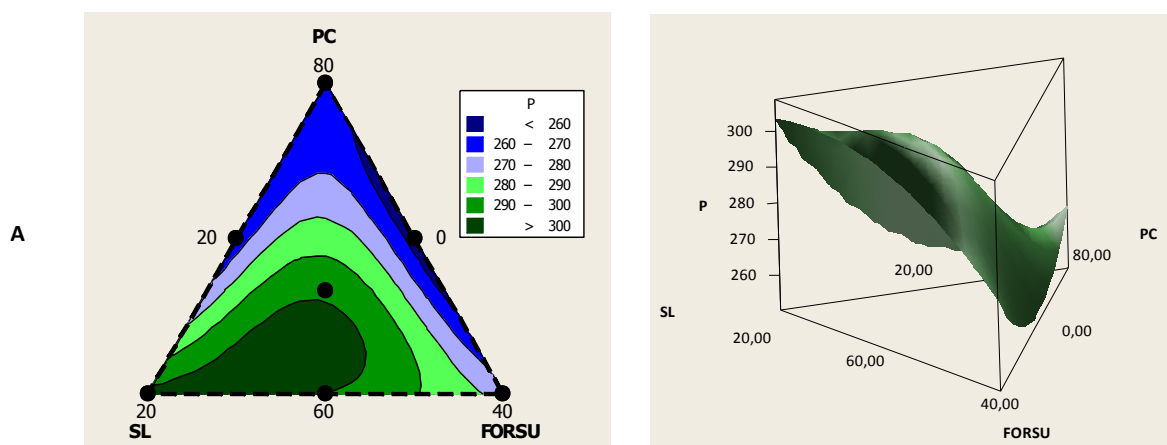
Las gráficas de superficie de respuesta proveen una representación del modelo como una función de cualquiera de los componentes (sustratos), en donde la altura de la superficie representa el valor predicho de la variable (Pagés-Díaz et al., 2014). La representación de la superficie de respuesta así como de la gráfica de contorno como una función de las proporciones de las mezclas se muestra en la Figura VI.10 para los tres parámetros analizados, junto con las ecuaciones polinomiales que describen dichas superficies y cuyos coeficientes fueron analizados previamente (Tabla VI.8).

Del análisis de los gráficos se observa que tanto la producción final de metano (P) como la velocidad de producción de metano (Rm) aumentan hacia el vértice donde se encuentra la mayor proporción de SL y FORSU, es decir, donde la concentración de FORSU es del 30 al 40% y el SL se encuentra presente en valores de aproximadamente 10-20%. Lo cual evidencia el hecho de que estos co-sustratos presentan una elevada carga orgánica y un mayor potencial de producción de metano que el PC. Por su parte el valor de Rm aumenta al disminuir la fracción de PC en las mezclas, lo que demuestra que la utilización de los co-sustratos aumenta no solo la producción final de metano, sino también la velocidad de generación. El gráfico de la fase de retardo, muestra que la heterogeneidad de los sustratos redundan en mayores tiempos de adaptación, tal como se evidencia de la gráfica de superficie para este parámetro. Resultados similares fueron encontrados por Callaghan et al., (1999) quien estudió la producción de metano de purines de vacunos en co-digestión con diferentes tipos de residuos orgánicos indicando que la producción específica de metano se ve favorecida por la utilización de residuos de frutas y vegetales de más fácil degradación. Por su parte, Kavacik y Topaloglu, (2010) quienes analizaron la co-digestión de SL y los efluentes de los tambos, encontraron que este proceso permite degradar eficientemente un residuo como el SL que si bien es portador de un alto contenido de materia de fácil biodegradación presenta el inconveniente de tender a la acidificación.

De los resultados encontrados en este estudio en particular, se pudo verificar la funcionalidad tanto del SL como del FORSU como co-sustratos para mejorar la producción de metano del PC utilizando un diseño de mezcla que resultó adecuado para atenuar la característica desfavorable del SL como son la fácil acidificación y rápida producción de AGV, así como la posibilidad de compensar la carencia de nutrientes del PC, aumentando su relación DQO/N. Permitiendo de esta manera producir metano en mayor cantidad y a una mayor velocidad, además de poder tratar anaeróbicamente sustratos que de otra manera sería de difícil tratamiento y producirían la inestabilidad del proceso.

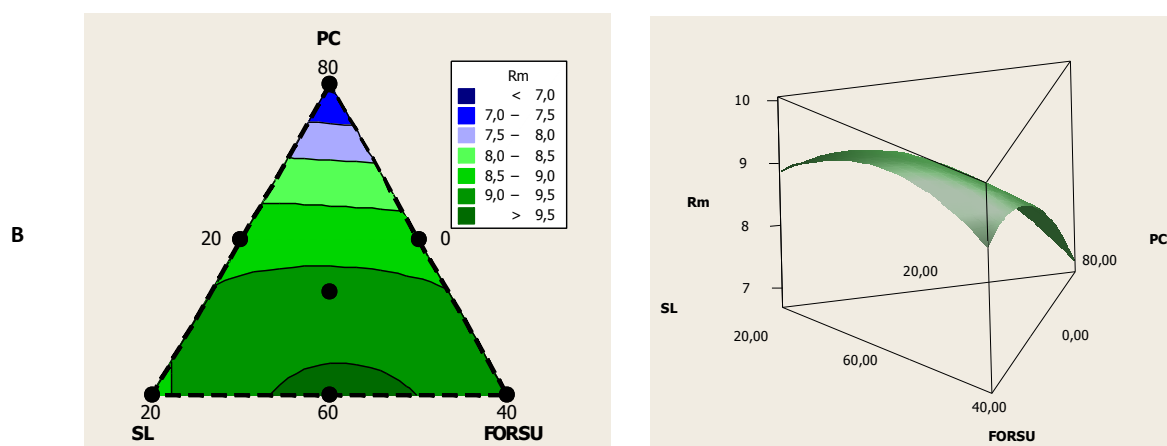
$$P(\text{mL/g SV}) = 267,6x_1 + 30,4x_2 + 276,4x_3 - 88,3x_1x_2 - 72,5x_1x_3 + 41,1x_2x_3 + 776,8x_1x_2x_3$$

Ec. VI.15



$$R_m(\text{mL/g SV día}) = 6,87x_1 + 8,87x_2 + 9,06x_3 + 3,52x_1x_2 + 2,91x_1x_3 + 2,42x_2x_3$$

Ec. VI.16



$$\lambda(\text{días}) = 7,16x_1 + 6,75x_2 + 5,98x_3 + 6,23x_1x_2 + 4,97x_1x_3 + 16,53x_2x_3 - 35,32x_1x_2x_3$$

Ec. VI.17

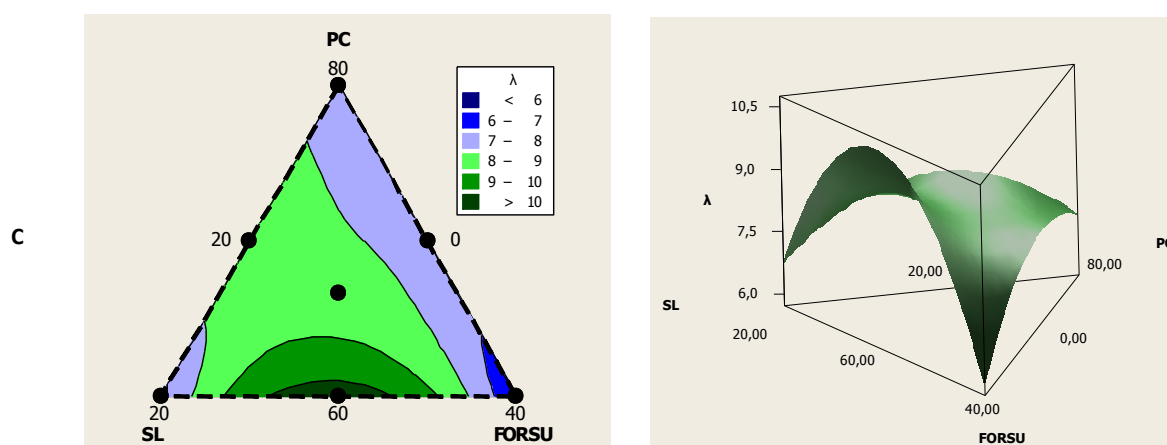
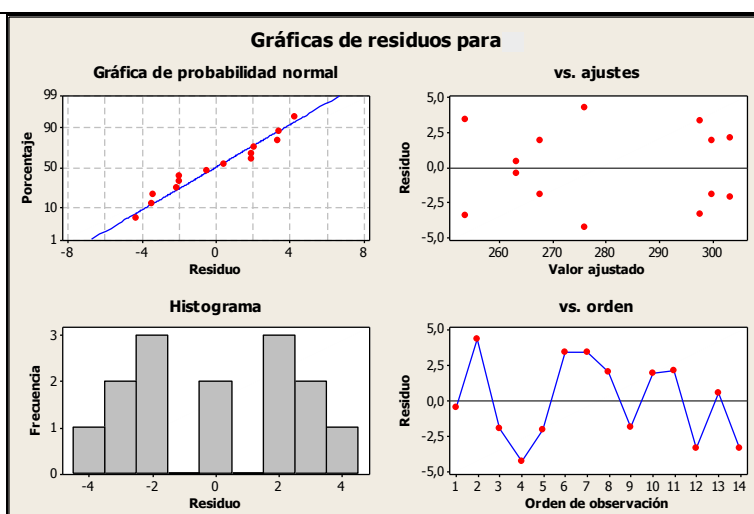


Figura VI.10: Superficie de contorno (izquierda) y superficie de respuesta (derecha) de las variables P , R_m y λ
1: PC, 2: SL, 3: FORSU

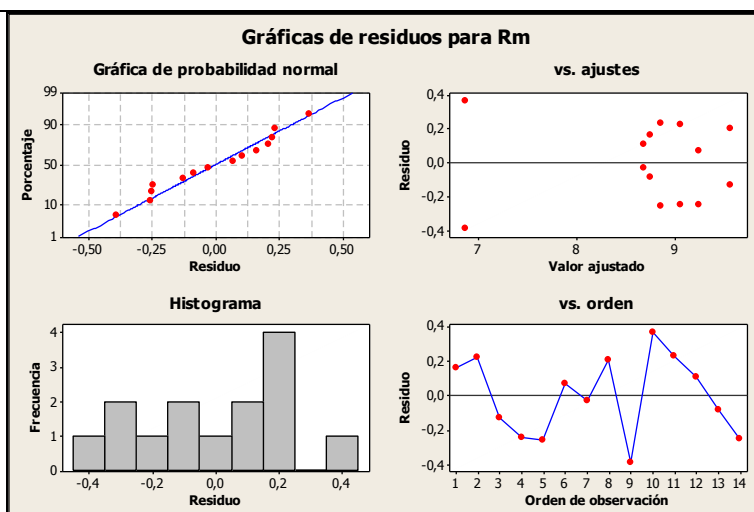
4. 3. 3. Análisis de los errores del modelo

Tal como fue indicado en la *sección 3. 1. 5.* de este capítulo, es necesario analizar los residuos del modelo para chequear la adecuación del mismo, ya que un modelo de regresión probablemente produzca resultados pobres o equivocados a menos que sea un ajuste adecuado (Montgomery, 2004). Si el modelo es adecuado, la distribución de los residuos no debe presentar patrones observables lo cual se analizará mediante las gráficas de **probabilidad normal de residuos**, la gráfica de **residuos versus valores ajustados**, la gráfica de **residuos versus orden** y el **histograma de residuos**. En la Figura VI.11, se muestran los gráficos de los errores de los residuos para cada uno de los ajustes realizados obtenidos mediante el programa minitab 15.

A: Gráfico de residuos para P



B: Gráfico de residuos para Rm



C: Gráfico de residuos para λ

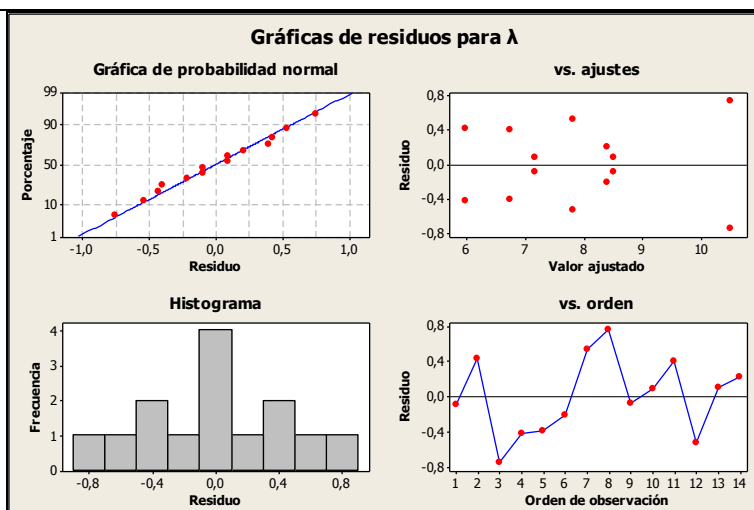


Figura VI.11: Gráfica de los residuos para la variable P, Rm y λ

En todos los casos los puntos de los errores se distribuyen lo suficientemente cerca de línea en la gráfica de probabilidad normal, no observándose ningún sesgo en los datos, asegurando la distribución normal de los datos. Del histograma de residuos no se observa ninguna tendencia de los errores ni ningún punto atípico como una barra separada de los demás puntos. Además, los datos se distribuyen en todos los casos aleatoriamente alrededor del cero, en gráfica de residuos en función de los valores ajustados y en gráfico de residuos en función del orden de los datos lo que significa que la varianza de los errores es constante y que no existe correlación de los datos. En función de estos resultados, se puede concluir que los modelos seleccionados, esto es el modelo cúbico específico para (P y λ) y el cuadrático para Rm ajustan correctamente los datos experimentales.

4.4. Estudio cinético: Optimización

Los diseños de mezclas son utilizados como un método eficiente para obtener valores de predicción o para optimizar una variable de respuesta, esto implica la selección de una combinación de componentes que maximice y/o minimice una o más parámetros respuesta (Pagés-Díaz et al., 2014). En función de las gráficas de superficie de respuesta obtenidas para cada una de las variables que se muestran en la Figura VI.10, se puede deducir que cada una producirá un óptimo en diferentes combinaciones de sustrato, y por lo tanto se decide llevar a cabo una optimización conjunta, utilizando la metodología de deseabilidad compuesta, teniendo en cuenta que el impacto de cada una de las variables sobre la respuesta de optimización es la misma, es decir, todas son consideradas como igualmente importantes.

Para la realización de la optimización se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI. En primer lugar se seleccionaron los valores límites (mínimos y máximos) que definirán un rango de valores de la respuesta, a partir de los cuales se determinaran los valores de deseabilidad de la optimización. Statgraphics utiliza como límites los valores mínimos y máximos observados experimentalmente para cada variable respuesta, los cuales se muestran en la Tabla VI.9.

Tabla VI.9: Límites máximos y mínimos utilizados para realizar la optimización de P, Rm y λ

Variable Respuesta	Mínimo (observado)	Máximo (observado)
P (mL CH ₄ /g SV)	250,293	305,464
Rm (mL CH ₄ /g SV día)	6,48289	9,77604
Fase de retardo λ (días)	5,55613	11,2514

El procedimiento de optimización generará una composición de mezcla óptima, para el cual las variables darán una respuesta con una deseabilidad máxima. La Figura VI.12, muestra la variación de la deseabilidad en todo el simplex. El mayor valor se encuentra en el vértice donde la concentración de SL es de 20%. Al alejarse de este vértice la deseabilidad disminuirá, mientras que la menor deseabilidad se encuentra en el vértice cuya composición corresponde a 80% PC, 0% SL y 20% FORSU, esto es corresponde al vértice donde la utilización de los co-sustratos es mínima.

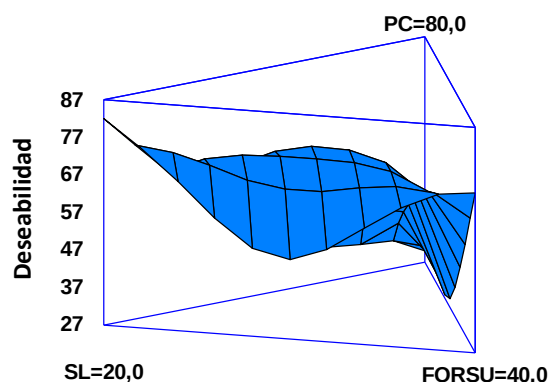


Figura VI.12: Grafica de deseabilidad para la optimización

La composición óptima que maximiza la deseabilidad corresponde al vértice del simplex donde la composición es de 60% PC, 20% SL y 20% FORSU. Los valores de la variable de respuesta para esta composición se muestran en la Tabla VI.10 más la desviación estándar al 95% de confiabilidad que define los límites máximos y mínimos de cada parámetro. La deseabilidad compuesta para esta optimización resultó 0,81952.

Tabla VI.10: Valores de las variables para la composición óptima

Variable Respuesta	Predicción*	Límite Inferior	Límite Superior
P (mL CH ₄ /gr SV)	303,353	296,79	309,916
Rm (mL CH ₄ /gr SV día)	8,86774	8,38965	9,34583
Fase De retardo λ (días)	6,75063	5,74692	7,75434

*Deseabilidad = 0,81952

Mediante el procedimiento de optimización lo que se obtuvo fue una composición de sustratos que optimizó las tres variables analizadas (P, Rm y λ). Tomando los valores límites y máximos obtenidos para cada uno de los parámetros de la (Tabla VI.10) se realizará una gráfica de contorno superpuesta, con el objetivo de obtener una zona de optimización más que solo un punto óptimo. La Figura VI.13, muestra la región blanca que queda definida por los puntos A (61,2; 18,7; 20,1), el punto B (61,7; 17,5; 20,8) y C (60,1; 18,6; 21,3) con deseabilidades de 0,772, 0,745 y 0,780 respectivamente, menores que la obtenida para la concentración optimizada, pero que asegura una respuesta adecuada al 95% de confiabilidad.

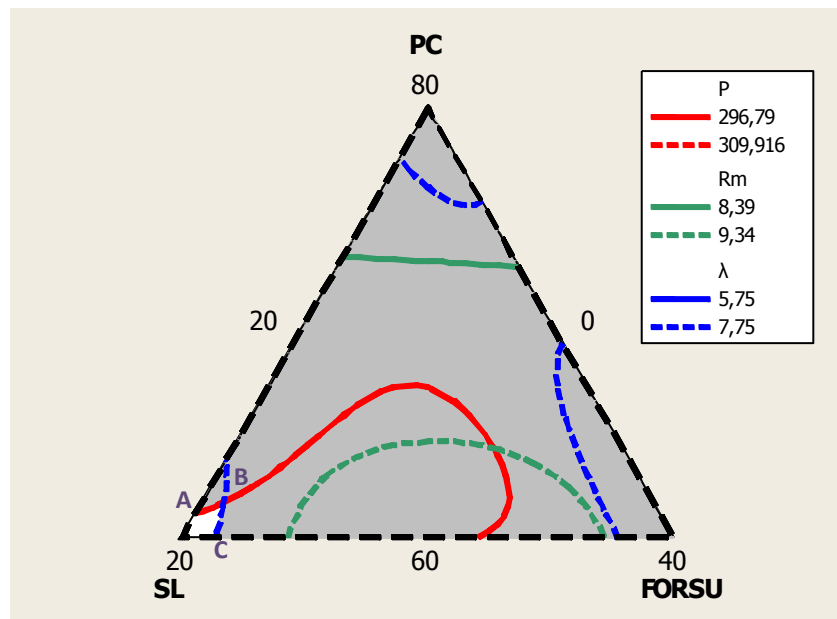


Figura VI.13: Grafica de contorno superpuesta para los límites de las variables respuesta

5. Conclusiones

En este capítulo se estudió el proceso de co-digestión anaeróbica del PC utilizando dos co-sustratos SL y FORSU en los rangos (60, 80); (0, 20); (20; 40) respectivamente. El proceso fue llevado a cabo en biodigestores de tipo batch bajo régimen mesofílico observándose:

- Dentro de los rangos estudiados, la utilización de una mayor concentración de los co-sustratos que son portadores de elevada carga orgánica y de fácil biodegradabilidad permitió generar una mayor cantidad de metano y remover mayor porcentaje de materia orgánica.
- La ecuación de Gompertz demostró ser un modelo adecuado para analizar la producción acumulada de metano en el proceso de co-digestión bajo diferentes concentraciones de co-sustratos.
- Del análisis de los parámetros de la ecuación de Gompertz se observó
 - La utilización de co-sustratos en la DA de PC, favorece una mayor producción de metano como consecuencia de la presencia de una mayor variedad de nutrientes, aunque requiere tiempo de adaptación al sistema mayores que si se encontraran con un sistema más homogéneo. Como tendencia general pudo observarse que a mayor concentración de co-sustrato, los parámetros cinéticos de la ecuación de Gompertz esto son P y Rm fueron más altos, mientras que no pudo observarse una tendencia clara en los valores de la fase de retardo en función de la adición de los diferentes sustratos.
- De los resultados encontrados en este estudio en particular, se pudo verificar la funcionalidad tanto del SL como del FORSU como co-sustratos para mejorar la producción de metano de PC utilizando un diseño estadístico de tipo mezcla, a fin de establecer composiciones de sustratos que resulte adecuado para atenuar la característica desfavorable del SL como son la fácil acidificación y rápida producción de AGV, como la posibilidad de compensar la carencia de nutrientes del PC, balanceando la relación DQO/N. Permitiendo de esta manera producir metano en mayor cantidad y a una mayor velocidad, además de poder tratar sustratos que de otra manera sería de difícil tratamiento y llevarían el proceso a un fracaso.
- La cinética del proceso de co-digestión fue analizada mediante un diseño de experimento de tipo simplex centroide de tipo restringido y en donde se analizó mediante la metodología de análisis de superficie la influencia de cada sustrato sobre los parámetros de la ecuación de Gompertz. Los resultados mostraron que:
 - la utilización de los co- sustratos mejoró la producción final de metano (P) con respecto a las fracciones individuales, como resultado de la observación de efectos sinérgicos, lo que se explica a través de la heterogeneidad en los sustratos que provee los nutrientes que las bacterias necesitan, estimulando el proceso.

- El valor de la velocidad de generación de metano (R_m) pudo ajustarse a un modelo cuadrático, donde las interacciones entre los sustratos mostraron ser sinérgicas, por lo tanto la mezcla de los sustratos analizados presentarían velocidades de producción de metano mayores a las esperadas a través de las fracciones individuales.
 - La fase de retardo (λ) fue ajustada a un modelo cúbico específico, en donde la existencia en el sistema de sustratos de diferentes características resulta en tiempos de adaptación mayores en comparación a los sustratos individuales.
- El método estadístico empleado corresponde a una herramienta valiosa para el análisis de problemas de tipo biológico donde la utilización de sustratos de diferentes características puede generar interacciones sinérgicas o antagónicas que de otra manera serían de difícil identificación. Permite además, predecir la respuesta de una variable bajo otras condiciones de proceso con un grupo acotado de experimentos, además de optimizar el mismo.
- Esta metodología permitió encontrando una composición de sustratos que optimizó todos los parámetros estudiados. Además, la gráfica de contorno superpuesta fue una herramienta útil para encontrar una zona de composición óptima y no sólo una composición puntual.
- En función de los resultados observados, donde la optimización del proceso sugiere que la zona correspondiente a uno de los vértices del simplex optimiza todos los parámetros cinéticos, deberían realizarse otros estudios tendientes a verificar si una zona menos restringida, que implique la utilización de una mayor proporción de co-sustratos permite mejorar aún más los parámetros analizados.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Considerando los objetivos que fueron planteados al comienzo de la presente tesis, y teniendo en cuenta el los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la misma, a continuación se detallan las principales conclusiones encontradas:

En una primera etapa, donde se identificó y analizó la utilización de un inóculo como un factor de gran influencia sobre la productividad de metano en condiciones mesofílicas se observó que:

- La utilización de un inóculo en el proceso anaeróbico, aumenta no sólo la producción de biogás, sino también su contenidos de metano.
- No todos los inóculos interactúan con el sustrato de igual manera, sino que algunos son mejores promotores del proceso lo que se verifica en la velocidad de generación de metano y en el consumo de productos intermedios de reacción, estos son los ácidos grasos volátiles (AGV).
- Los lodos de depuradora y el PC digerido, demostraron mejor capacidad que el rumen para actuar como inóculos en la DA del PC. Ambos lograron una mayor remoción de materia orgánica (cerca del 50% en términos de VS y DQO) y la más alta productividad de metano, alcanzando un valor de 250 mL CH₄/g VS.
- Del análisis de la concentración de los AGV, se pudo determinar que la etapa metanogénica fue el paso limitante de la velocidad global de proceso, verificado por el rápido crecimiento en su concentración tanto como por la mayor permanencia de estas concentraciones en el digestor a lo largo del tiempo de proceso.

En una etapa posteriormente, se profundizó en el estudio de la influencia de la concentración de inóculo sobre purín de cerdo (PC), suero de leche (SL) y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbano (FORSU) como sustratos, encontrando que:

- a mayor concentración de inóculo en el reactor, mejor es la evolución del proceso, entendiéndose como tal una mayor producción de metano (y biogás) y una mayor velocidad de generación del mismo, lo cual es el resultado del agregado al sistema de una mayor carga de bacteria metanogénicas.
- El tipo de sustrato utilizado determina la evolución del proceso, tanto como la producción final de metano, siendo la FORSU el sustrato que mostró la mayor capacidad de producción de metano entre todos los residuos estudiados, tendencia que se mantiene para las diferentes relaciones sustrato/inóculo (RSI) estudiadas.
- La evolución de la concentración de los AGV durante el proceso demostró depender fuertemente del sustrato; mientras que el para PC la concentración disminuyó desde el inicio del proceso para todas las RSI estudiadas, en FORSU y en SL se evidenciaron incrementos durante la primera semana siendo este aumento mayor con la disminución de la concentración de inóculo en el reactor. Esto es el resultado de que la utilización de una mayor cantidad de

inóculo, implica la adición al reactor de una mayor concentración de bacterias metanogénicas, que son capaces de consumir más rápidamente los AGV formados, de lo contrario, tienen a acumularse, y si este aumento es sustancial puede inhibirse el proceso, tal como se evidenció para el SL con las más altas RSI (3:1 y 6:1).

Del análisis de la cinética del proceso de producción de metano se determinó que:

- El modelo cinético de Gompertz, ajustó mejor los datos experimentales, que el modelo de primer orden, principalmente a bajas concentraciones de inóculo, donde la fase de retardo del proceso aumenta, y por lo tanto el modelo de primer orden comienza a fallar, debido a que no es capaz de predecir esta etapa del crecimiento microbiano.
- Para todos los sustratos se observó que las velocidades de producción de metano aumentan al aumentar la concentración de inóculo en el sistema, aunque este aumento depende del sustrato y de las características de degradabilidad del mismo.

En términos generales es fundamental asegurar un proceso de DA que alcance un régimen de producción de metano permanente y estable y en un corto periodo de tiempo para lo cual es indispensable:

- Conocer la composición físico-química de cada sustrato en términos de materia orgánica (SV, DQO), nutrientes (nitrógeno total, nitrógeno amoniacal), pH y alcalinidad.
- Identificar los inóculos más adecuados para los sustratos a tratar por DA.
- Determinar la mejor relación sustrato/inóculo que optimice la producción de metano.

En la última etapa de la tesis se estudió la DA simultánea de tres sustratos previamente analizados, esto es PC, SL y la FORSU, y su influencia sobre la producción de metano, encontrando que:

- dentro de los rangos estudiados, la utilización de una mayor concentración de co-sustrato portador de elevada carga orgánica de fácil biodegradabilidad produjo una mayor cantidad de metano en comparación con la producción a partir de la DA individual de PC; aumentando la remoción de materia orgánica.
- Los diferentes tratamientos realizados fueron analizados mediante el modelo de Gompertz encontrando, que la mayor variedad de nutrientes favorece una mayor producción de metano, como consecuencia de que las bacterias presentes en el sistema tendrán una mayor variedad de sustratos para alimentarse, aunque esta mayor variedad de nutrientes influye negativamente sobre los tiempos de adaptación de las bacterias (fase de retardo) requiriéndose tiempos mayores, que si se encontraran con un sistema más homogéneo.
- La cinética del proceso de co-digestión fue analizada mediante la metodología de análisis de superficie de respuesta, lo que permitió encontrar que la composición (60% PC, 20% SL, 20%

FORSU) optimiza la cinética del proceso. Además, permitió identificando la influencia de cada sustrato sobre los parámetros cinéticos, y las interacciones entre los sustratos que afectan a dichos parámetros.

- El método estadístico empleado constituye una herramienta valiosa para el análisis de problemas de tipo biológico donde la utilización de sustratos de diferentes características puede generar interacciones sinérgicas o antagónicas que de otra manera serían de difícil identificación. Permite además, predecir la respuesta de una variable bajo otras condiciones de proceso con un grupo acotado de experimentos, además de optimizar el mismo.

De los resultados encontrados en este estudio en particular, se pudo verificar la funcionalidad tanto del SL como del FORSU como co-sustratos para mejorar la producción de metano de PC. Sin embargo, dada la tendencia de estos sustratos a la acidificación, es necesario establecer las concentraciones de co-sustrato que el sustrato base (PC), podrá soportar sin sobrecargar el proceso.

CONSIDERACIONES A FUTURO

En cuanto a los trabajos a realizar en el futuro, debería incluir la sistematización de parámetros de control de proceso y la estandarización de protocolos para la generación de bioenergía a partir de la DA. Para poder implementar dicho protocolo, será necesario disponer de una base de dato que informe sobre características físico-químicas de sustratos e inóculos, pero que a la vez brinde información sobre el potencial de producción de biogás (metano).

El trabajo realizado durante esta tesis podrá servir como un inicio para la elaboración de dicha base de datos. En principio, el SL utilizado como co-sustrato, presenta varios problemas para su utilización en el proceso anaeróbico, como por ejemplo la elevada acidez; pero, en base a sus características químicas, podría pensarse su utilización como co-sustrato de un residuo que presente problemas de elevada alcalinidad como por ejemplo los estiércoles de gallina.

Otro de los puntos a analizar podría incluir el análisis del acondicionamiento de los sustratos, verificando si dicho pretratamiento puede influir sobre el proceso. En este sentido, el acondicionamiento podría modificar algún parámetro que a posteriori beneficiaría el proceso anaeróbico, como por ejemplo, disponer de un PC previamente digerido, con una alcalinidad más elevada que el PC fresco, podría disminuir las necesidades de adición de agentes buffer externos.

Otro de los puntos sobre los que se debería avanzar sería hacia el desarrollo de inóculos de diseño, que sean capaces de proveer la carga bacteriana específica que permita amortiguar deficiencias particulares en cada sustrato. A su vez, estos inóculo deberían desarrollarse con el objetivo de acelerar la etapa de degradación, sobre todo en residuos cuya hidrólisis sea la etapa limitante del proceso, pero que a su vez, presente un aporte de bacterias metanogénicas adecuada para que la etapa metanogénica no se encuentre limitada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, N., Chin, N.L., 2010. Simplex-centroid mixture formulation for optimised composting of kitchen waste. *Bioresour. Technol.* 101, 8205-8210. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.068
- Adak, A., Mazumder, D., Bandyopadhyay, P., 2011. Simulation of a Process Design Model for Anaerobic Digestion of Municipal Solid Wastes. *Int. J. Civ. Environ. Eng.* 3, 177-182.
- Aguilar, S., 2014. La promoción de energías renovables en Argentina : el caso Genren. *PUENTES - Análisis y Not. sobre Comer. y Desarro. Sosten.* 15, 1-7.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I., 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 559-565. doi:10.1007/BF00218466
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 560-564. doi:10.1007/BF00242955
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, a J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59, 927-34. doi:10.2166/wst.2009.040
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K., 1993. A Mathematical Model for Dynamic Simulation of Anaerobic Digestion of Complex Substrates: Focusing on Ammonia Inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 159-166. doi:10.1002/bit.260420203
- Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 117-129. doi:10.1007/s11157-004-2502-3
- APHA, 1999. *APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington, DC. American Public Health Association.
- Appels, L., Baeyens, J., Degréve, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755-781. doi:10.1016/j.pecs.2008.06.002
- Arsova, L., 2010. *Anaerobic digestion of food waste: Current status, problems and an alternative product*. Columbia University.
- Atandi, E., Rahman, S., 2012. Prospect of anaerobic co-digestion of dairy manure: a review. *Environ. Technol. Rev.* 1, 127-135. doi:http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2012.698654
- Azaizeh, H., 2010. Co-digestion Of Olive Mill Wastewater and Swine Manure Using Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor for Biogas Production. *J. Water Resour. Prot.* 02, 314-321. doi:10.4236/jwarp.2010.24036
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V, Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., 2002. Anaerobic

- Digestion Model No 1 (ADM1). Water Sci. Technol. 45, 65-73.
- Beuvink, J.M.W., Kogutt, J., 1993. Modeling Gas Production Kinetics of Grass Silages Incubated with Buffered Ruminant Fluid. J. Anim. Sci. 71, 1041-1046.
- Bien, J.J., Malina, G., Wolny, L., 2004. Enhancing Anaerobic Fermentation of Sewage Sludge for Increasing Biogas Generation. J. Environ. Sci. Heal. Part A 39, 939-949. doi:10.1081/ESE-120028404
- Björnsson, L., Murto, M., Jantsch, T.G., Mattiasson, B., 2001. Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. Water Res. 35, 2833-40.
- Boe, K., 2006. Online monitoring and control of the biogas process.
- Bolzonella, D., Innocenti, L., Pavan, P., Traverso, P., Cecchi, F., 2003. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: focusing on the start-up phase. Bioresour. Technol. 86, 123-129.
- Bruni, E., Jensen, A.P., Angelidaki, I., 2010. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. Bioresour. Technol. 101, 8713-7. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.108
- Buchanan, R.. L., Whiting, R.. C., Damert, W.. C., 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiol. 14, 313-326. doi:10.1006/fmic.1997.0125
- Budiyo, Widiyasa, I.N., Johari, S., Sunarso, 2009. Influence of inoculum content on performance of anaerobic reactors for treating cattle manure using rumen fluid inoculum. Int. J. Eng. Technol. 1, 109-116.
- Burke, D.A., 2001. Dairy Waste Anaerobic Digestion Handbook (Options for Recovering Beneficial Products From Dairy Manure). Environmental Energy Company.
- Cadavid-Rodriguez, L.S., Horan, N.J., 2012. Methane production and hydrolysis kinetic in anaerobic degradation of wastewater screenings, en: World Congress on Water, Climate and Energy. pp. 1-9.
- Callaghan, F.J., Wase, D. a J., Thayanithy, K., Forster, C.F., 1999. Co-digestion of waste organic solids: Batch studies. Bioresour. Technol. 67, 117-122. doi:10.1016/S0960-8524(98)00108-4
- Campos, E., Palatsi, J., Flotats, X., 1999. Co-digestion of pig slurry and organic waste from food industry, en: II INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION OF SOLID WASTE. Barcelona, pp. 192-195.
- Campos Pozuelo, A.E., 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Universidad de Lleida.
- Capela, I., Rodrigues, a., Silva, F., Nadais, H., Arroja, L., 2008. Impact of industrial sludge and cattle

- manure on anaerobic digestion of the OFMSW under mesophilic conditions. *Biomass and Bioenergy* 32, 245-251. doi:10.1016/j.biombioe.2007.09.004
- Capittini, A., Santalla, E., 2011. Efluentes de la Industria Láctea: amenaza u oportunidad?, en: II Congreso Internacional de Ambiente y Energías Renovables. Córdoba, Argentina, pp. 345-354.
- Carlos, R., Luis, R.J., Noelia, M., Josefa, F., 2013. Anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid dairy manure : Batch tests, en: 15th international conference of the Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture. pp. 2-5.
- Carneiro, T.F., 2005. Digestión anaerobia termofílica seca de residuos sólidos urbanos: estudio de las variables del proceso en el arranque y estabilización del bio-reactor. Universidad de Cádiz.
- Carrillo, L., 2003. Microbiología Agrícola. Salta - Argentina.
- Cendales Ladino, E.D., 2011. Producción de biogás mediante la codigestión anaeróbica de la mezcla de residuos cítricos y estiércol bovino para su utilización como fuente de energía renovable. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, D.C., Colombia.
- Ceron, A., Pérez Vidal, A., Lozada, P.T., 2005. Importancia del pH y la Alcalinidad en el Tratamiento Anaeróbico de las Aguas Residuales del Proceso de Extracción de Almidon de Yuca. *Sci. Tech.* 243-248.
- Chatzipaschali, A. a., Stamatis, A.G., 2012. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies* 5, 3492-3525. doi:10.3390/en5093492
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044-64. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057
- Cheng, X., Zhong, C., 2014. Effects of Feed to Inoculum Ratio, Co-digestion, and Pretreatment on Biogas Production from Anaerobic Digestion of Cotton Stalk. *Energy & Fuels* 28, 3157-3166.
- Chum, H., Faaij, A., Moreira, J., Berndes, G., Dhamija, P., Dong, H., Gabrielle, B., Eng, A.G., Lucht, W., Mapako, M., Cerutti, O.M., McIntyre, T., Minowa, T., Pingoud, K., 2011. Bioenergy. In: IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. doi:10.5860/CHOICE.49-6309
- Chynoweth, D.P., Turick, C.E., Owens, J.M., Jerger, D.E., Peck, M.W., 1993. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 5, 95-111.
- Chynoweth, D.P., Wilkie, A.C., Owens, J.M., 1999. Anaerobic processing of piggery waste: a review. *Asian-Australasian Assoc. Anim. Soc.* 12, 607-628.
- Collins, A.R., Murphy, J., Bainbridge, D., 2011. Optimal Loading Rates and Economic Analyses for Anaerobic Digestion of Poultry Waste. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 50, 1037-1044.
- Comino, E., Riggio, V.A., Rosso, M., 2012. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry

- and cheese whey. *Bioresour. Technol.* 114, 46-53. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.090
- Córdoba, V., Colavolpe, M.B., Fernández, M., Santalla, E., Albertó, E., 2015. Potential of methane production from spent sawdust used in the production of *Gymnopilus pampeanus*.
- Córdoba, V., Fernández, M., Santalla, E., 2013. Ensayo batch de co-digestión anaeróbica en purines de cerdo, en: III Congreso Internacional de Ambiente y Energías Renovables. pp. 484-494.
- Coronado, M., Segadães, a. M., Andrés, a., 2014. Combining mixture design of experiments with phase diagrams in the evaluation of structural ceramics containing foundry by-products. *Appl. Clay Sci.* 101, 390-400. doi:10.1016/j.clay.2014.05.021
- Costa, R.D., Tavares, C.R.G., Cossich, E.S., 2007. Stabilization of swine wastes by anaerobic digestion. *Environ. Technol.* 28, 1145-51. doi:10.1080/09593332808618875
- Cruz Teran, J., Paez, R., Belen Pirola, M., Schmidt, E., 2008. Características generales sobre el uso del Suero de queso en la Provincia de Santa Fe, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Cuetos, M.J., Morán, a, Otero, M., Gómez, X., 2009. Anaerobic co-digestion of poultry blood with OFMSW: FTIR and TG-DTG study of process stabilization. *Environ. Technol.* 30, 571-82. doi:10.1080/09593330902835730
- Donoso-Bravo, a, Retamal, C., Carballa, M., Ruiz-Filippi, G., Chamy, R., 2009. Influence of temperature on the hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis in mesophilic anaerobic digestion: parameter identification and modeling application. *Water Sci. Technol.* 60, 9-17. doi:10.2166/wst.2009.316
- Donoso-bravo, A., Mailier, J., Martin, C., Rodríguez, J., Aceves-lara, A., Vande Wouwer, A., 2011. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review. *Water Res.* 5, 5347-5364. doi:10.1016/j.watres.2011.08.059
- Drosg, B., 2013. Process monitoring in biogas plants. IEA Bioenergy.
- Durruty, I., Zaritzky, N.E., González, J.F., 2012. Kinetic studies on the anaerobic degradation of soluble and particulate matter in potato wastewater. *Biosyst. Eng.* 111, 195-205. doi:10.1016/j.biosystemseng.2011.11.012
- El-Fadel, M., Saikaly, P., Ghanimeh, S., 2013. Startup and Stability of Thermophilic Anaerobic Digestion of OFMSW. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 130301143435008. doi:10.1080/10643389.2012.694333
- Ergüder, T.H., Tezel, U., Güven, E., Demirer, G.N., 2001. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Manag.* 21, 643-50.
- Eriksson, L., Johansson, E., Wikström, C., 1998. Mixture design - Design generation, PLS analysis, and model usage. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 43, 1-24. doi:10.1016/S0169-7439(98)00126-9
- Esposito, G., Frunzo, L., Giordano, A., Liotta, F., Panico, A., Pirozzi, F., 2012. Anaerobic co-digestion of organic wastes. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 11, 325-341. doi:10.1007/s11157-012-9277-8
- Esposito, G., Frunzo, L., Panico, A., Pirozzi, F., 2012. Enhanced bio-methane production from co-

- digestion of different organic wastes. *Environ. Technol.* 33, 2733-40.
- FAO - Departamento Forestal Dendroenergía, 2009. Análisis del balance de energía derivada de la biomasa en Argentina - WISDOM Argentina -.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2009. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Roma, Italia.
- Feng, L., Li, Y., Chen, C., Liu, X., Xiao, X., Zhang, R., He, Y., Liu, G., 2013. Biochemical Methane Potential (BMP) of Vinegar Residue and the Influence of Feed to Inoculum Ratios on Biogas Production. *Bioresource* 8, 2487-2498.
- Flotats Ripoll, X., Bonmatí Blasi, A., Campos Pozuelo, E., Antúnez, M., 1999. ensayos en discontinuo de codigestion anaerobica termofilica de purines de cerdo y lodos residuales. Efecto del Amonio. *Inf. Tecnológica* 10, 79-85.
- Forster-Carneiro, T., Pérez, M., Romero, L.I., 2008. Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresour. Technol.* 99, 6994-7002. doi:10.1016/j.biortech.2008.01.018
- Forster-Carneiro, T., Pérez, M., Romero, L.I., Sales, D., 2007. Dry-thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: focusing on the inoculum sources. *Bioresour. Technol.* 98, 3195-203. doi:10.1016/j.biortech.2006.07.008
- Gadhamshetty, V., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., Johnson, D.C., 2010. Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 479-490. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.11.007
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I., Mavris, V., 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renew. Energy* 32, 2147-2160. doi:10.1016/j.renene.2006.11.015
- Gerardi, M.H., 2003. The microbiology of anaerobic digesters. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Ghaly, A.E., 1996. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two- stage reactor. *Bioresour. Technol.* 58, 61-72.
- Gilkinson, S., Frost, P., 2013. Performance Summary for Anaerobic Digestion of Dairy Cow Slurry and Grass Silage At Afbi, Hillsbough Phase 3.
- Gontupil, J., 2013. Anaerobic Co-digestion of Swine Manure and Agricultural Residues for Biogas Production. North Carolina State University.
- González, M., 2013. Utilización actual del suero de quesería [WWW Document]. INTI -Lácteos. URL https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/2suero_argentina.pdf (accedido 11.11.15).
- González-Fernández, C., García-Encina, P.A., 2005. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic

- digestion of swine slurry. *Biomass and Bioenergy* 33, 105-109.
- Griffin, M.E., McMahon, K.D., Mackie, R.I., Raskin, L., 1998. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 342-55. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980205)57:3<342::AID-BIT11>3.0.CO;2-I
- Gunaseelan, N., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy* 13, 83-114.
- Gunaseelan, V.N., 2007. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. *Bioresour. Technol.* 98, 1270-1277. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.014
- Gunaseelan, V.N., 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 26, 389-399. doi:10.1016/j.biombioe.2003.08.006
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Res.* 33, 1805-1810.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic Digestion of Swine Manure: Inhibition By Ammonia. *Water Res.* 32, 5-12. doi:10.1016/S0043-1354(97)00201-7
- Hansen, T.L., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., Marca, E., Jansen, J.L.C., Mosbaek, H., Christensen, T.H., 2004. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Manag.* 24, 393-400. doi:10.1016/j.wasman.2003.09.009
- Hegde, G., Pullammanappallil, P., 2007. Comparison of thermophilic and mesophilic one-stage, batch, high-solids anaerobic digestion. *Environ. Technol.* 28, 361-9. doi:10.1080/09593332808618797
- Hill, D.T., 1983. Simplified Monod Kinetics of Methane Fermentation of Animal Wastes. *Agric. Wastes* 5, 1-16.
- Hill, D.T., 1982. A Comprehensive Dynamic Model for Animal Waste Methanogenesis. *Am. Soc. Agric. Eng.* 1374-1380.
- Hook, S.E., Wright, A.D.G., McBride, B.W., 2010. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* 2010, 50-60. doi:10.1155/2010/945785
- Hoornweg, D., Bhada-Tata, P., 2012. What a waste: a global review of solid waste management, World Bank, Washington DC.
- Hu, Z., Yu, H., 2006. Anaerobic digestion of cattail by rumen cultures. *Waste Manag.* 26, 1222-1228. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2005.08.003
- Hublin, A., Zelic, B., 2013. Modelling of the whey and cow manure co-digestion process. *Waste Manag. Res. J. Int. Solid Wastes Public Clean. Assoc. ISWA* 31, 353-60. doi:10.1177/0734242X12455088
- Jackowiak, D., Frigon, J.C., Ribeiro, T., Pauss, A., Guiot, S., 2011. Enhancing solubilisation and methane production kinetic of switchgrass by microwave pretreatment. *Bioresour. Technol.* 102, 3535-

3540. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.069
- Jantsch, T.G., Mattiasson, B., 2003. A simple spectrophotometric method based on pH - indicators for monitoring partial and total alkalinity in anaerobic processes. *Environ. Technol.* 24, 1061-1067. doi:http://dx.doi.org/10.1080/09593330309385646
- Jenkins, S., Morgan, J., Sawyer, C., 1983. Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Water Pollut. Control Fed.* 55, 448-453.
- Jenkins, S.R., Morgan, J.M., Zhang, X., 1991. Measuring the Usable Carbonate Alkalinity of Operating Anaerobic Digesters. *J. Water Pollut. Control Fed.* 63, 28-34.
- Kafle, G.K., Kim, S.H., 2013. Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production : Batch and continuous operation. *Appl. Energy* 103, 61-72. doi:10.1016/j.apenergy.2012.10.018
- Kangle, K.M., Kore, S. V, Kore, V.S., Kulkarni, G.S., 2012. Recent Trends in Anaerobic Codigestion: A Review. *Univers. J. Environ. Res. Technol.* 2, 210-219.
- Kavacik, B., Topaloglu, B., 2010. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass and Bioenergy* 34, 1321-1329. doi:10.1016/j.biombioe.2010.04.006
- Kayhanian, M., 1994. Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 59, 349-352. doi:10.1002/jctb.280590406
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L., 2011. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Manag.* 31, 1737-1744. doi:10.1016/j.wasman.2011.03.021
- Khanal, S.K., 2008. *Anaerobic biotechnology for bioenergy production principles and applications*. John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Kigozi, R., Aboyade, A., Muzenda, E., 2014. Biogas Production Using the Organic Fraction of Municipal Solid Waste as Feedstock. *J. Res. en Chem. Metall. Civ. Eng.* 1.
- Kim, H., Han, S., Shin, H., 2003. The optimisation of food waste addition as a co- substrate in anaerobic digestion of sewage sludge. *Waste Manag.* doi:10.1177/0734242X0302100604
- Kolář, L., Klimeš, F., Gergel, J., Kužel, S., Kobes, M., Ledvina, R., Šindelářová, M., 2005. Methods to evaluate substrate degradability in anaerobic digestion and biogas production. *Plant Soil Environ.* 51, 173-178.
- Kougiyas, P.G., Fotidis, I.A., Zaganas, I.D., Kotsopoulos, T.A., Martzopoulos, G.G., 2013. Zeolite and swine inoculum effect on poultry manure biomethanation. *Int. Agrophysics* 27, 169-173. doi:10.2478/v10247-012-0082-y
- Kougiyas, P.G., Kotsopoulos, T.A., Martzopoulos, G.G., 2010. Anaerobic co-digestion of pig waste with olive mill wastewater under various mixing conditions. *Fresenius Environ. Bull.* 19, 1682-1686.
- Kuehl, R., 2001. *Diseño de Experimentos Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*,

Segunda Ed. ed.

- Kuglarz, M., Mrowiec, B., 2009. Co-digestion of municipal biowaste and sewage sludge for biogas production, en: Plaza, E., Levlin, E. (Eds.), Proceedings of a Polish-Swedish Ukrainian seminar; Research and application of new technologies in wastewater treatment and municipal solid waste disposal in Ukraine, Sweden and Poland. Stockholm, Sweden, pp. 177-184.
- Kwak, D., Kim, M., Kim, J., Oh, Y., Noh, S., So, B., Al, E.T., 2013. Evaluation of Methane Yield on Mesophilic-Dry Anaerobic Digestion of Piggery Manure Mixed with Chaff for Agricultural Area. *Adv. Chem. Eng. Sci.* 3, 227-235.
- Labatut, R. a., Angenent, L.T., Scott, N.R., 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresour. Technol.* 102, 2255-2264. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.035
- Lahav, O., Morgan, B., 2004. Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries - a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 1331-1341. doi:10.1002/jctb.1143
- Lal, K., 2007. Experiments with mixtures, en: Jaggi, S., Varghese, C., Sharma, V.K., Batra, P.K. (Eds.), Statistical Methods for Agricultural Research. New Delhi-India.
- Lay, J.-J., Li, Y.-Y., Noike, T., 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Res.* 31, 1518-1524. doi:10.1016/S0043-1354(96)00413-7
- Lay, J.-J., Li, Y.-Y., Noike, T., 1996. Effect of Moisture Content and Chemical Nature on Methane Fermentation Characteristics of Municipal Solid Wastes. *J. Environ. Eng. Div.* 552, 101-108. doi:10.2208/jscej.1996.552_101
- Lebrator, J., Rodríguez, J.L.P., Maqueda, C., Morillo, E., 1990. Cheese factory wastewater treatment by anaerobic semicontinuous digestion 3, 193-199.
- Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J.M., Junqua, G., Steyer, J.P., 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochem.* 45, 431-440. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.018
- Li, C., 2012. Using anaerobic co-digestion with addition of municipal organic wastes and pre-treatment to enhance biogas production from wastewater treatment plant sludge.
- Li, R., Chen, S., Li, X., 2009. Anaerobic Co-digestion of Kitchen Waste and Cattle Manure for Methane Production. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* 31, 1848-1856. doi:10.1080/15567030802606038
- Lidholm, O., Ossiansson, E., 2008. Modeling Anaerobic Digestion -Validation and calibration of the Siegrist model with uncertainty and sensitivity analysis. Lund University.
- Lin, Y., Wang, D., Liang, J., Li, G., 2012. Mesophilic anaerobic co-digestion of pulp and paper sludge and food waste for methane production in a fed-batch basis. *Environ. Technol.* 33, 2627-33.

- Liu, G., Zhang, R., El-Mashad, H.M., Dong, R., 2009. Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. *Bioresour. Technol.* 100, 5103-8. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.081
- Liu, H., Lan, Y., Cheng, Y., 2004. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. *Process Biochem.* 39, 1953-1961. doi:10.1016/j.procbio.2003.09.018
- Llabrés-Luengo, P., Mata-Alvarez, J., 1987. Kinetic study of the anaerobic digestion of straw-pig manure mixtures. *Biomass* 14, 129-142. doi:10.1016/0144-4565(87)90015-1
- Lopes, W.S., Leite, V.D., Prasad, S., 2004. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 94, 261-6. doi:10.1016/j.biortech.2004.01.006
- Lozano, C.J.S., Mendoza, M.V., de Arango, M.C., Monroy, E.F.C., 2009. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. *Waste Manag.* 29, 704-11. doi:10.1016/j.wasman.2008.06.021
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., Bergman, R., 1998. Experimental design and optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42, 3-40. doi:10.1016/S0169-7439(98)00065-3
- Makádi, M., Tomócsik, A., Orosz, V., 2012. Digestate: A New Nutrient Source – Review, *Biogas-In Tech*.
- Maldonado Arce, O.D., 1996. Diseño de experimentos con mezclas. Universidad de Sonora.
- Marchaim, U., 1992. Biogas processes for sustainable development. *FAO Agricultural Services Bulletins*, Roma, Italy.
- Marín, J.C., Pozo, L., Colina, G., Rincón, N., Behling, E., Díaz, A., Fernández, N., 2007. Optimización de un método para la determinación simultánea de H₂ y CH₄ por cromatografía gas-sólido en biorreactores anaeróbicos. *Multiciencias* 7, 266-275.
- Massé, D.I., Croteau, F., Patni, N.K., Masse, L., 2003. Methane emissions from dairy cow and swine manure slurries stored at 10 ° C and 15 ° C. *Can. Biosyst. Eng.* 45, 1-6.
- Masse, D.I., Droste, R.L., 2000. Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water Pollut. Control Fed.* 34, 3087-3106.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes . An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour. Technol.* 74, 3-16. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7
- Mateescu, C., Constantinescu, I., 2011. Comparative analysis of inoculum biomass for biogas potential in the anaerobic digestion. *Sci. Bull.* 73, 99-104.
- Minitab, I., 2007. Minitab 15, Manual de Usuario.
- Miron, Y., Zeeman, G., Van Lier, J.B., Lettinga, G., 2000. The role of sludge retention time in the

- hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Res.* 34, 1705-1713. doi:10.1016/S0043-1354(99)00280-8
- Molina, F., Ruiz-Filippi, G., Garcia, C., Lema, J.M., Roca, E., 2009. Pilot-Scale Validation of a New Sensor for On-Line Analysis of Volatile Fatty Acids and Alkalinity in Anaerobic Wastewater Treatment Plants. *Environ. Eng. Sci.* 26, 641-649. doi:10.1089/ees.2007.0308
- Moller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy* 26, 485-495. doi:10.1016/j.biombioe.2003.08.008
- Monnet, F., 2003. *An Introduction to Anaerobic Digestion of Organic Wastes.*
- Montgomery, D., 2004. *Diseño y Análisis de Experimentos, Segunda Ed.* ed. Mexico.
- Mu, Y., Wang, G., Yu, H.-Q., 2006. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour. Technol.* 97, 1302-7. doi:10.1016/j.biortech.2005.05.014
- Mu, Y., Yu, H.-Q., Wang, G., 2007. A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Res.* 41, 1152-60. doi:10.1016/j.watres.2006.11.047
- Najafpour, G.D., 2007. *Biochemical Engineering and Biotechnology, Elsevier's. ed. (Professor of Chemical Engineering Technology, Noshirvani Institute of Mazandaran, University of of Mazandaran Babol, Iran).*
- National Greenhouse Gas Inventories Programme, 2006. *IPCC. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories.* Japan.
- Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2009. Co-digestion of cow manure, food waste and intermittent input of fat. *Bioresour. Technol.* 100, 1957-1962. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.030
- Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2004. Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. *Process Biochem.* 39, 2019-2024. doi:10.1016/j.procbio.2003.10.002
- Nielfa, a., Cano, R., Fdz-Polanco, M., 2015. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnol. Reports* 5, 14-21. doi:10.1016/j.btre.2014.10.005
- O'Sullivan, C. a., Burrell, P.C., Clarke, W.P., Blackall, L.L., 2006. Comparison of cellulose solubilisation rates in rumen and landfill leachate inoculated reactors. *Bioresour. Technol.* 97, 2356-2363. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.021
- Olivato, J.B., Nobrega, M.M., Müller, C.M.O., Shirai, M. a., Yamashita, F., Grossmann, M.V.E., 2013. Mixture design applied for the study of the tartaric acid effect on starch/polyester films. *Carbohydr. Polym.* 92, 1705-1710. doi:10.1016/j.carbpol.2012.11.024
- Organización Meteorológica Mundial (OMM), 2015. *Estado de los gases de efecto invernadero en la atmósfera según las observaciones mundiales realizadas en 2014.*

- Pagés-Díaz, J., Pereda-Reyes, I., Taherzadeh, M.J., Sárvári-Horváth, I., Lundin, M., 2014. Anaerobic co-digestion of solid slaughterhouse wastes with agro-residues: Synergistic and antagonistic interactions determined in batch digestion assays. *Chem. Eng. J.* 245, 89-98. doi:10.1016/j.cej.2014.02.008
- Pandey, P.K., Ndegwa, P.M., Soupir, M.L., Alldredge, J.R., Pitts, M.J., 2011. Efficacies of inocula on the startup of anaerobic reactors treating dairy manure under stirred and unstirred conditions. *Biomass and Bioenergy* 35, 2705-2720. doi:10.1016/j.biombioe.2011.03.017
- Panichnumsin, P., Nopharatana, A., Ahring, B., Chaiprasert, P., 2006. Anaerobic Co-digestion of Cassava Pulp and Pig Manure : Effects of Waste Ratio and Inoculum-substrate Ratio, en: *The 2nd Joint International Conference on "Sustainable Energy and Environment (SEE 2006)*. pp. 1-6.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Crit. Rev. Environ. Control* 21, 411-490. doi:10.1080/10643389109388424
- Raghuathan, C., Velan, M., Velmurugan, B., Ramanujam, R.A., 2008. Studies on batch kinetics of anaerobic digestion of solid waste (sinews) from gelatin industry. *J. Environ. Res. Dev.* 3, 456-463.
- Raposo, F., Banks, C.J., Siegert, I., Heaven, S., Borja, R., 2006. Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochem.* 41, 1444-1450. doi:10.1016/j.procbio.2006.01.012
- Raposo, F., Borja, R., Martín, M.A., Martín, A., Rubia, M.A. De, Rincón, B., 2009. Influence of inoculum – substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode : Process stability and kinetic evaluation. *Chem. Eng. J.* 149, 70-77. doi:10.1016/j.cej.2008.10.001
- Ripley, L.E.E., Boyle, W.C.C., Converse, J.C.C., 1986. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. *J. - Water Pollut. Control Fed.;* (United States) 58, 406-411.
- Riquelme, J., 2009. Problemas de Estimación/Observación en Procesos de Biodigestión Anaerobia. *Congr. Ingelectra* 1-8.
- Rodríguez, J.F., 2010. Optimización de la digestión anaerobia seca de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU) en reactores en fases de temperatura. Universidad de Cadiz.
- Rodríguez, L., 2011. Methane potential of sewage sludge to increase biogas production. TRITA LWR Degree Project 11:22.
- Rubio-Loza, L. a, Noyola, a, 2010. Two-phase (acidogenic-methanogenic) anaerobic thermophilic/mesophilic digestion system for producing Class A biosolids from municipal sludge. *Bioresour. Technol.* 101, 576-85. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.066
- Ruiz-Espinoza, J.E., Méndez-Contreras, J.M., Alvarado-Lassman, A., Martínez-Delgadillo, S. a, 2012. Effect of low temperature thermal pre-treatment on the solubilization of organic matter, pathogen inactivation and mesophilic anaerobic digestion of poultry sludge. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 47, 1795-802. doi:10.1080/10934529.2012.689237

- Sakar, S., Yetilmezsoy, K., Kocak, E., 2009. Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment – a literature review. *Waste Manag. Res.* 27, 3-18. doi:10.1177/0734242X07079060
- Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., Martín, A., 2001. Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. *Process Biochem.* 37, 483-489. doi:0032-9592/01/\$
- Santalla, E., Córdoba, V., Crozza, D., 2008. Evaluación, diagnóstico y propuestas de acción para la mejora de las problemáticas ambientales y mitigación de gases de efecto invernadero.
- Sawatdeenarunat, C., Surendra, K.C., Takara, D., Oechsner, H., Kumar, S., 2015. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 178, 178-186.
- Schnürer, A., Jarvis, Å., 2010. *Microbiological Handbook for Biogas Plants*. Avfall Sverige Development, Sweden.
- Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 2014. *Inventario de Gases de Efecto Invernadero de la República Argentina – Año 2012 - Volumen 4 - Sector Residuos*.
- Sen, R., Swaminathan, T., 2004. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochem. Eng. J.* 21, 141-148. doi:10.1016/j.bej.2004.06.006
- Shao-Pin, Y., 1999. Analysis of volatile fatty acids in wastewater collected from a pig farm by a solid phase microextraction method. *Chemosphere* 38, 823-834.
- Shin, J., Han, S., Eom, K., Sung, S., Park, S., Kim, H., 2008. Predicting Methane Production Potential of Anaerobic Co-digestion of Swine Manure and Food Waste. *Environ. Eng. Resour.* 13, 93-97.
- Shuler, M., Kargi, F., 1992. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2^a ed. ed. U.S.A.
- Siegert, I., Banks, C., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* 40, 3412-3418. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.025
- Smith, P., M. Bustamante, Ahammad, H., Clark, H., Dong, H., Elsiddig, E.A., Haberl, H., Harper, R., House, J., Jafari, M., Masera, O., C. Mbow, N. H. Ravindranath, C. W. Rice, C. Robledo Abad, A. Romanovskaya, F. Sperling, and F.T., 2014. *Agriculture, Forestry and Other Land Use (AFOLU)*. *Clim. Chang. 2014 Mitig. Clim. Chang. Contrib. Work. Gr. III to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.* [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, 811-922. doi:10.1016/j.phrs.2011.03.002
- StatPoint Technologies, I., 2010. *STATGRAPHICS® Centurion XVI User Manual*.
- Sutaryo, 2012. *Optimisation and inhibition of anaerobic digestion of livestock manure*. Aarhus University.
- Swinnen, I. a M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, a. H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of

- the microbial lag phase: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 137-59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006
- Swinnen, I. a M., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., 2006. Modelling the work to be done by *Escherichia coli* to adapt to sudden temperature upshifts. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 507-513. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01896.x
- Tosun, I., Gönüllü, M.T., Günay, A., 2004. Anaerobic Digestion and Methane Generation Potential of Rose Residue in Batch Reactors. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 39, 915-925. doi:10.1081/ESE-120028402
- Triolo, J.M., Ward, A.J., Pedersen, L., Sommer, S.G., 2013. Characteristics of animal slurry as a key biomass for biogas production in Denmark, en: *Biomass Now – Sustainable Growth and Use*. InTech, pp. 307-326. doi:http://dx.doi.org/10.5772/54424
- USEPA, 2006. Biosolids Technology Fact Sheet Multi-Stage Anaerobic Digestion.
- USEPA Agencia de Protección, Ambiental de EEUU por Eastern Research Group, I. y P.C.G., 2009. Resource Assessment for Livestock and Agro-Industrial Wastes - Argentina.
- Varnero Moreno, M.T., 2011. Manual de Biogas. Santiago de Chile.
- Vavilin, V. a, Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manag.* 28, 939-51. doi:10.1016/j.wasman.2007.03.028
- Veeken, A., Hamelers, B., 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresour. Technol.* 69, 249-254.
- Venkateswara Rao, P., Baral, S.S., 2011. Experimental design of mixture for the anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Chem. Eng. J.* 172, 977-986. doi:10.1016/j.cej.2011.07.010
- Voß, E., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K.-H., 2009. FOS / TAC – Deduction , Methods , Application and Significance, en: *Internationale Wissenschafts konferenz Biogas Science 2009 – «science meets practice»*. pp. 4-12.
- Wakadikar, K., Sil, A., Kumar, S., Kumar, R., Mudhoo, A., 2012. Influence of Sewage Sludge and Leachate on Biochemical Methane Potential of Waste Biomass. *Bioremediation Biodegrad.* 1-6. doi:10.4172/2155-6199.S8-002
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* 99, 7928-40. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.044
- Weiland, P., 2010. Biogas production: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849-860. doi:10.1007/s00253-009-2246-7
- Wu, X., Yao, W., Zhu, J., Miller, C., 2010. Biogas and CH₄ productivity by co-digesting swine manure with three crop residues as an external carbon source. *Bioresour. Technol.* 101, 4042-4047.

- doi:10.1016/j.biortech.2010.01.052
- Yates, G.T., Smotzer, T., 2007. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *J. Theor. Biol.* 244, 511-7. doi:10.1016/j.jtbi.2006.08.017
- Yenigün, O., Demirel, B., 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochem.* 48, 901-911. doi:10.1016/j.procbio.2013.04.012
- Yetilmezsoy, K., Demirel, S., Vanderbei, R.J., 2009. Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box – Behnken experimental design. *J. Hazard. Mater.* 171, 551-562. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.06.035
- Yilmaz, V., 2007. Enhancing the Performance of Anaerobic Digestion of Dairy Manure through Phase-Separation. MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY.
- Yilmazel, Y.D., Demirer, G.N., 2011. Removal and recovery of nutrients as struvite from anaerobic digestion residues of poultry manure. *Environ. Technol.* 32, 783-794. doi:10.1080/09593330.2010.512925
- Yue, Z., Wang, J., Liu, X., Yu, H., 2012. Comparison of rumen microorganism and digester sludge dominated anaerobic digestion processes for aquatic plants. *Renew. Energy* 46, 255-258. doi:10.1016/j.renene.2012.03.030
- Yusof, T.T.R.T., Man, H.C., Rahman, N.A.A., Hafid, H.S., Roslina, T., Aini, N., Rahman, A., 2014. Optimization of Methane Gas Production From Co-digestion of Food waste and Poultry Manure Using Artificial Neural Network and Response Surface Methodology. *J. Agric. Sci.* 6, 27-37. doi:10.5539/jas.v6n7p27
- Zeikus, J.G., 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 514-541.
- Zhou, H., Li, H., Wang, F., 2012. Anaerobic digestion of different organic wastes for biogas production and its operational control performed by the modified ADM1. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 47, 84-92. doi:10.1080/10934529.2012.629585
- Zhou, H., Löffler, D., Kranert, M., 2011. Model-based predictions of anaerobic digestion of agricultural substrates for biogas production. *Bioresour. Technol.* 102, 10819-10828. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.014
- Zhou, Zhang, Z., Nakamoto, T., Li, Y., Yang, Y., Utsumi, M., Sugiura, N., 2011. Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. *Biomass and Bioenergy* 35, 3251-3256. doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.002
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.

ANEXO

1. Anexo Capítulo V

1. 1. Tabla de ANOVA análisis de la composición del biogas

Análisis de la varianza para el % de metano

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Efectos Principales					
A:Sustrato	0,067273	2	0,0336365	13,39	0,0020
B:S/I	0,220012	2	0,110006	43,80	0,0000
Interacciones					
AB	0,0778587	4	0,0194647	7,75	0,0055
Residuos	0,0226045	9	0,00251161		
TOTAL (Corregido)	0,387749	17			

Influencia del sustrato

Método LSD (95% confiabilidad)

Sustrato	Cantidad	LS Mean	LS Sigma	Grupo homogéneo
SL	6	0,595	0,0204598	X
PC	6	0,603	0,0204598	X
FORSU	6	0,7285	0,0204598	X

Contrastes	Sig.	Diferencias	+/- Límites
FORSU - PC	*	0,1255	0,0654545
FORSU - SL	*	0,1335	0,0654545
PC - SL		0,008	0,0654545

* denota diferencias significativas.

Influencia de la relación S/I

Método LSD (95% confiabilidad)

Sustrato	Cantidad	LS Mean	LS Sigma	Grupo homogéneo
6	6	0,524167	0,0204598	X
3	6	0,612333	0,0204598	X
1	6	0,79	0,0204598	X

Contrastes	Sig.	Diferencias	+/- Límites
1 - 3	*	0,177667	0,0654545
1 - 6	*	0,265833	0,0654545
3 - 6	*	0,0881667	0,0654545

* denota diferencias significativas.

1. 2. Tablas de ANOVA Análisis de metano y biogás

1. 2. 1. Análisis de ANOVA para la producción acumulada de biogás

Análisis de la varianza para Biogas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Efectos Principales					
A:Sustrato	106970,	2	53485,2	58,42	0,0000

B:S/I	140603,	2	70301,5	76,79	0,0000
Interacciones					
AB	26272,9	4	6568,22	7,17	0,0070
Residuos	8239,36	9	915,484		
TOTAL (Corregido)	282086,	17			

Todos los F-ratio se basan en el error cuadrado medio residual.

Influencia del sustrato

Método LSD (95% confiabilidad)

Sustrato	Cantidad	LS Mean	LS Sigma	Grupo homogéneo
SL	6	338,333	12,3524	X
PC	6	471,2	12,3524	X
FORSU	6	520,967	12,3524	X

Contrastes	Sig.	Diferencias	+/- Límites
FORSU - PC	*	49,7667	39,5174
FORSU - SL	*	182,633	39,5174
PC - SL	*	132,867	39,5174

* denota diferencias significativas.

Influencia de la relación S/I

Multiple Range Tests for Biogas by S/I

Método LSD (95% confiabilidad)

SRSI	Cantidad	LS Mean	LS Sigma	Grupo homogéneo
3	6	376,583	12,3524	X
6	6	385,533	12,3524	X
1	6	568,383	12,3524	X

Contrastes	Sig.	Diferencias	+/- Límites
1 - 3	*	191,8	39,5174
1 - 6	*	182,85	39,5174
3 - 6		-8,95	39,5174

* denota diferencias significativas.

1. 2. 2. Análisis de ANOVA para la producción acumulada de Metano

Análisis de la varianza para CH₄

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Efectos Principales					
A:Sustrato	74285,1	2	37142,6	211,28	0,0000
B:S/I	199074,	2	99536,8	566,19	0,0000
Interacciones					
AB	30254,8	4	7563,71	43,02	0,0000
Residuos	1582,2	9	175,8		
TOTAL (Corregido)	305196,	17			

Todos los F-ratio se basan en el error cuadrado medio residual.

Influencia del sustrato

Método LSD (95% confiabilidad)

Sustrato	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
----------	-------	---------	----------	--------------------

SL	6	227,45	5,41295	X
PC	6	284,933	5,41295	X
FORSU	6	383,05	5,41295	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
FORSU - PC	*	98,1167	17,317
FORSU - SL	*	155,6	17,317
PC - SL	*	57,4833	17,317

* denota diferencias significativas.

Influencia de la relación S/I

Método LSD (95% confiabilidad)

S/I	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
6	6	211,817	5,41295	X
3	6	237,133	5,41295	X
1	6	446,483	5,41295	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
1 - 3	*	209,35	17,317
1 - 6	*	234,667	17,317
3 - 6	*	25,3167	17,317

* denota diferencias significativas.

2. Anexo Capítulo VI

2. 1. ANOVA para la producción de biogás (ml/gr SV)

Análisis de la varianza para la producción de biogás

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Entre los grupos	12594,1	6	2099,02	31,36	0,0001
Dentro de los grupos	468,557	7	66,9367		
Total (Corregido)	13062,7	13			

Método LSD (95% confiabilidad)

Col_1	Cantidad	Valor medio	Grupo homogéneo
R7	2	365,99	X
R5	2	384,715	XX
R3	2	387,58	X
R4	2	403,375	X
R6	2	437,725	X
R1	2	441,265	X
R2	2	447,795	X

2. 2. ANOVA para la producción de Metano (ml/gr SV)

Análisis de la varianza para CH₄

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Entre los grupos	5118,52	6	853,087	30,76	0,0001
Dentro de los grupos	194,146	7	27,7352		
Total (Corregido)	5312,67	13			

Método LSD (95% confiabilidad)

Col_1	Cantidad	Valor medio	Grupo homogéneo
R5	2	250,255	X

R7	2	250,935	X
R3	2	257,605	X
R4	2	272,265	X
R1	2	292,75	X
R2	2	293,87	X
R6	2	295,19	X

2. 3. Análisis de ANOVA para los parámetros de Gompertz

2. 3. 1. Parámetro P

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Entre los grupos	4789,28	6	798,213	51,81	0,0000
Dentro de los grupos	107,848	7	15,4069		
Total (Corregido)	4897,13	13			

Método LSD (95% confiabilidad)

Col_1	Cantidad	Valor medio	Grupo homogéneo
5	2	253,736	X
3	2	263,412	X
7	2	267,642	XX
4	2	276,072	X
1	2	297,819	X
2	2	299,981	X
6	2	303,353	X

2. 3. 2. Parámetro Rm

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Entre los grupos	9,1306	6	1,52177	15,98	0,0009
Dentro de los grupos	0,666619	7	0,0952313		
Total (Corregido)	9,79722	13			

Método LSD (95% confiabilidad)

Col_1	Cantidad	Valor medio	Grupo homogéneo
7	2	6,8622	X
5	2	8,73341	X
3	2	8,79001	X
6	2	8,85775	X
4	2	9,04913	XX
1	2	9,15972	XX
2	2	9,60781	X

2. 3. 3. Parámetro λ

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Entre los grupos	25,8507	6	4,30844	11,96	0,0022
Dentro de los grupos	2,52243	7	0,360347		
Total (Corregido)	28,3731	13			

Método LSD (95% confiabilidad)

Col_1	Cantidad	Valor medio	Grupo homogéneo
4	2	5,98425	X
6	2	6,75063	XX
7	2	7,1586	XXX

5	2	7,81461	XX
1	2	8,40372	X
3	2	8,5121	X
2	2	10,4987	X

2. 4. ANOVA para la superficie de respuesta

2. 4. 1. P

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo Cúbico Específico	4789,28	6	798,213	51,81	0,0000
Error Total	107,848	7	15,4069		
Total (Corregido)	4897,13	13			

R-squared = 97,7977 percent

R² (adjustado for GL.) = 95,9101 percent

Error Estandar = 3,92516

Error medio absoluto = 2,51157

Durbin-Watson= 2,262 (P=0,6792)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,238251

2. 4. 2. Rm

ANOVA for Rm [mL CH4/gr SV día]

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo Cuadrático	9,10425	5	1,82085	21,02	0,0002
Error Total	0,692968	8	0,0866209		
Total (Corregido)	9,79722	13			

R² = 92,9269 percent

R² (adjustado for GL.) = 88,5062 percent

Error Estandar. = 0,294314

Error medio absoluto = 0,197248

Durbin-Watson = 1,88743 (P=0,4210)

Lag 1 residual autocorrelation = 0,0102391

2. 4. 3. Λ

ANOVA for Fase Lag [días]

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo Cúbico Específico	25,8507	6	4,30844	11,96	0,0022
Error Total	2,52243	7	0,360347		
Total (Corregido)	28,3731	13			

R² = 91,1098 percent

R² (adjustado for GL.) = 83,4896 percent

Error Estandar = 0,600289

Error medio absoluto = 0,359253

Durbin-Watson= 2,48064 (P=0,8059)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,306364

TRABAJO PRESENTADO

Revistas Internacionales

The Effect of Different Inoculums on Anaerobic Digestion of Swine Wastewater. (Córdoba V., Fernandez M., Santalla E.). Journal of Environmental Chemical Engineering. Vol 4, Issue 1, Marzo 2016, Pages 115-122, ISSN 2213-3437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.11.003>.

Revistas Nacionales

Influencia del inóculo en la digestión anaeróbica de purín de cerdo. (Córdoba V., Fernández M., Santalla E.). Energías Renovables y Medio Ambiente (ERMA). Salta: INENCO. 2015 vol. 34. p29 - 37. ISSN: 0328-932X.

Congresos

XXXVIII REUNIÓN DE TRABAJO DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE ENERGÍAS RENOVABLES Y MEDIO AMBIENTE (ASADES) – San Rafael, Mendoza. Optimización de la co-digestión anaeróbica de purines de cerdo utilizando diseño de mezclas. (V. Córdoba, M. Fernandez, E. Santalla) Vol. 3, pp. 08.21-06.31, 2015. Impreso en la Argentina. ISBN 978-987-29873-0-5. Noviembre/2015

XXXVII REUNIÓN DE TRABAJO DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE ENERGÍAS RENOVABLES Y MEDIO AMBIENTE (ASADES) – Oberá, Misiones. Influencia del inóculo en la digestión anaeróbica de purín de cerdo. (V. Córdoba, M. Fernandez, E. Santalla) Vol. 2, pp. 06.29-06.38, 2014. Impreso en la Argentina. ISBN 978-987-29873-0-5. Noviembre/2014

VIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICOLOGÍA – Medellín, Colombia. Utilización de los desechos de la producción del hongo comestible *Gymnopilus Pampeanus* como sustrato para obtener biogás. (M. Colavolpe, V. Córdoba, M. Fernández, E. Santalla, E. Albertó). Libro de resúmenes, pp 195. ISSN: 0304-3584. Octubre/2014

III CONGRESO INTERNACIONAL DE AMBIENTE Y ENERGÍAS RENOVABLES - Villa María, Córdoba. "Ensayo batch de co-digestión anaeróbica de purines de cerdo". (V. Córdoba, M. Fernandez, E. Santalla) ISBN 978-987-1930-11-1. Págs 484-494. Noviembre/2013.