

**PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DEL BAGAZO DE FIQUE EN UN BIOPROCESO
CONFIGURADO EN DOS FASES**

**MAYRA FERNANDA RUEDA PELAYO
NATALIA SANABRIA JEREZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DEL BAGAZO DE FIQUE EN UN BIOPROCESO
CONFIGURADO EN DOS FASES**

**MAYRA FERNANDA RUEDA PELAYO
NATALIA SANABRIA JEREZ**

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

**HUMBERTO ESCALANTE HERNANDEZ
Ingeniero Químico Ph.D.**

Co-director (a)

**LILIANA DEL PILAR CASTRO MOLANO
Estudiante de doctorado de Ing. Química
Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

AGRADECIMIENTOS

Al director Humberto Escalante Hernández PhD por su dirección, confianza y apoyo.

A la codirectora Ingeniera Liliana del Pilar Castro Molano por su guía, colaboración, paciencia e incondicional apoyo.

A las doctoras Carolina Guzmán y Claudia Ortiz por su colaboración.

Al bacteriólogo Alex Orlando Velásquez por su colaboración.

Al grupo de investigación del laboratorio de Biotecnología por su apoyo, colaboración, ánimo y amistad.

A los Técnicos del Laboratorio de Procesos Escuela de Ingeniería Química, “Eduardo y Wilson” por su apoyo y colaboración.

A nuestros compañeros de la Universidad que de una u otra forma se vincularon con la realización de este trabajo, por el apoyo incondicional y la amistad brindada desde el inicio de la vida universitaria.

DEDICATORIA

A Dios.

A mi papá por su constante amor, confianza e incondicional apoyo durante toda mi vida y a mi mamá, por ser el motor que me impulsa a alcanzar mis sueños y ser mejor persona cada día.

A ellos, quienes llenan mi vida de alegría y esperanza en un futuro mejor.

Mayra Fernanda Rueda Pelayo

Dedico este proyecto y toda mi carrera universitaria a Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento. A mis papás Aurelio y Leticia, ya que gracias a su cariño, y apoyo familiar he cumplido con mis logros, son a ellos a quienes les debo todo y por los que seguiré trabajando día a día y a mi familia por el apoyo incondicional recibido.

Natalia Sanabria Jerez

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	14
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	19
2.1 Digestión Anaerobia	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Sustrato	21
3.2 Inóculo	22
3.3 Desarrollo Experimental del Bioproceso.....	23
3.3.1 Digestión Anaerobia en Dos Fases	23
3.3.2 Digestión Anaerobia Convencional	25
3.4 Métodos Analíticos	25
3.5 Análisis Estadístico de Datos	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Reactor Acidogénico	26
4.2 Reactor Metanogénico.....	29
4.3 Análisis del Diseño de Experimentos	31
4.4 Configuración Dos Fases Versus Proceso Convencional.	32
5. CONCLUSIONES	35
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7. ANEXOS	41

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales reacciones químicas que ocurren en la digestión anaerobia.	20
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del bagazo de fique	21
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas, AH y AME para los inóculos empleados.....	22
Tabla 4. Condiciones de operación de los ensayos en dos fases.....	24
Tabla 5. Actividad hidrolítica	26
Tabla 6. Calidad del biogás	34
Tabla 7. Variables y niveles del diseño de experimentos	44
Tabla 8. Diseño de experimentos conjunto 1	44
Tabla 9. Diseño de experimentos conjunto 2	45
Tabla 10. Concentración de ART para E1-E2.....	50
Tabla 11. Volumen de metano	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Concentración de Ácidos grasos volátiles en la Fase A	27
Figura 2. Parámetros de control en RA. a) pH, b) Relación AGV/ALC.	28
Figura 3. Volumen acumulado de metano en el reactor metanogénico	29
Figura 4. Parámetros de control en RM. a) pH, b) Relación AGV/ALC.....	30
Figura 5. Producción de volumen de metano acumulado	33
Figura 6. Distribución de medias para los rendimientos de E1, E5 y E9.....	34
Figura 7. Curva estándar de glucosa	47

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Protocolo de toma de muestra de bagazo de fique	41
Anexo 2. Protocolo de toma de muestra de inóculos.....	42
Anexo 3. Diseño de experimentos	44
Anexo 4. Métodos analíticos	46
Anexo 5. Cálculo de la Actividad Hidrolítica.....	50
Anexo 6. Normalización de la producción de volumen de metano.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo

AGV	= Ácidos Grasos Volátiles.
AH	= Actividad Hidrolítica.
AME	= Actividad Metanogénica Específica.
ART	= Azúcares Reductores Totales.
BF	= Bagazo de Fique.
DNS	= Ácido Dinitrosalicílico.
DQO	= Demanda Química de Oxígeno.
EC	= Estiércol de Cerdo.
LR	= Reactor Acidogénico.
RC	= Reactor Convencional.
RM	= Reactor Metanogénico.
ST	= Sólidos Totales.
STV	= Sólidos Totales Volátiles.
SSV	= Sólidos Suspendidos Volátiles.
SV	= Sólidos Volátiles.

RESUMEN

TITULO: PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DEL BAGAZO DE FIQUE EN UN BIOPROCESO CONFIGURADO EN DOS FASES*

AUTORES: RUEDA PELAYO MAYRA FERNANDA**
SANABRIA JEREZ NATALIA**

PALABRAS CLAVES: Bagazo de fique, dos fases, residuo lignocelulósico, digestión anaerobia, biogás.

CONTENIDO:

La industria del beneficio de fique en Colombia genera 15 mil toneladas de residuo (bagazo) por hectárea sembrada, el cual está siendo descartado al ambiente ocasionando problemas de contaminación. La caracterización fisicoquímica y el poder calorífico del bagazo indican que este residuo es idóneo como fuente de carbono para la producción de biogás. Una de las alternativas tecnológicas para la producción de biogas es la de digestión anaerobia convencional (una fase). Sin embargo el alto contenido de lignina (15%) en el bagazo afecta la eficiencia del proceso convencional y se requiere de una configuración específica que permita llevar a cabo en forma separada las fases del proceso. Todos los ensayos se realizaron en biodigestores batch de 500 mL. El RA se alimentó con una carga orgánica de 3,6 g SV de bagazo y 150 mL de Líquido Ruminal (LR). El RM se cargó con la mezcla del contenido total del RA y 150 mL de Estiércol de Cerdo (EC). En el reactor convencional se agregaron 3,6 g SV de bagazo con 300 mL de mezcla LR-EC. De acuerdo a los resultados, se puede afirmar que en RA se alcanzó un 30% de aumento de la AH con respecto convencional. El porcentaje de acidificación en este estudio varió entre 44-68%. En RM se alcanzaron rendimientos entre 1,40 y 1,82 m³/kg SV a 39°C, y entre 1,16 y 1,56 m³/kg SV a 21°C. La producción de metano en RM fue 73% mayor que la del reactor convencional. De los resultados obtenidos se concluye que la realización de la digestión anaerobia del bagazo de fique en fases separadas mejora el rendimiento global del proceso, constituyéndose en una excelente alternativa para el tratamiento de residuos lignocelulósicos.

* *Proyecto de Grado. Modalidad investigación.*

** *Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Codirector: Ing. Liliana del Pilar Castro Molano.*

ABSTRACT

TITLE: BIOGAS PRODUCTION FROM FIQUE'S BAGASSE IN A TWO-PHASE ANAEROBIC DIGESTION*

AUTHORS: RUEDA PELAYO MAYRA FERNANDA**
SANABRIA JEREZ NATALIA**

KEYWORDS: Fique's bagasse, two-phases, lignocellulosic residue, anaerobic digestion, biogas.

CONTENTS:

In Colombia, the natural fiber process production generates 15000 tonnes of waste (bagasse) per seeded hectarea, which are currently discharged without any treatment for avoiding environmental contamination. The bagasse is suitable as a carbon source to biogas production according to its physicochemical characterization and its heating power. One of the alternatives for biogas' production is the conventional anaerobic digestion process (one stage). However, the efficiency of conventional process is affected by the high lignin content (15%) of the bagasse and it requires a specific arrangement that allows performing the stages separation in a two-phase process. In two-phase anaerobic digestion process, the hydrolysis and acidogenic stages were conducted in the Acidogenic Reactor (AR) and stages of acetogenesis and methanogenesis in the Methanogenic Reactor (MR). All tests were carried out in batch digesters of 500 mL. The AR was charged with an organic loading rate 3,6 g VS of bagasse and 150 mL Ruminant Fluid (RF). MR was loaded with the mixture of the total content of AR and 150 mL Pig Manure (PM). The operation of the conventional one-phase configuration was started with an organic loading rate of 3,6 g VS bagasse and 300 mL mixture between RF-PM. It was shown AH yield was increased in 30% using stage separation in comparison with conventional process. Acidification percentage was also increased between values of 44 and 68 %. The yields of methane production were 1,40 and 1,82 m³/kg VS at 39°C, and 1,16 y 1,56 m³/kg VS at 21°C. The methane production increased 73% over the conventional reactor. According with the results, the two-phase arrangement for fique's bagasse anaerobic digestion improves the whole efficiency of the process such as biogas quality, becoming a promising way for lignocellulosic waste treatment.

* *Working Grade. Research mode.*

** *Physicochemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering.
Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Co-director: Ing. Liliana del Pilar Castro Molano.*

1. INTRODUCCIÓN

El fique es una planta que pertenece al género *Furcraea s.p.* y a la familia *Agavaceae*, es tropical y crece en la mayoría de climas. El cultivo de fique llamado también sisal ha sido ampliamente desarrollado a nivel mundial. En países como Bangladesh, India, China, Tailandia, Tanzania y Brasil este cultivo hace parte importante de la economía agroindustrial [16]. Se estima que en Colombia existen 24 mil hectáreas sembradas con plantas de fique, las cuales están distribuidas en los departamentos de Cauca, Nariño, Antioquia, Santander y Boyacá.

El proceso de beneficio de la planta de fique se realiza en tres etapas: a) La preparación o alistamiento, b) La extracción de la fibra: la cual constituye entre el 3 y el 5% del peso de la hoja, siendo la pulpa entre 95 y 97% y c) El procesamiento de la fibra [38]. El proceso del beneficio del fique genera aproximadamente 15 mil toneladas de residuo (bagazo) por hectárea sembrada [16, 38]. Este bagazo está siendo descartado al ambiente ocasionando serios problemas de contaminación de cuerpos de agua superficial y/o subterránea por filtración y lixiviación, además de la atracción de vectores [38, 39].

La caracterización fisicoquímica del bagazo de fique indica que este residuo es lignocelulósico con una adecuada relación carbono/nitrógeno; particularidad que lo hace idóneo como fuente de carbono para la producción de biogás [6, 12].

Una de las alternativas tecnológicas para la producción de metano a partir de residuos orgánicos es la bioconversión anaerobia en procesos convencionales (una fase) [8]. Estos procesos permiten tratar una amplia variedad de sustratos mediante diseños sencillos [42, 47]. En los bioprocesos convencionales de producción de metano la microbiota se somete a condiciones ambientales uniformes [7, 24, 37, 41, 47, 54].

La digestión anaerobia se lleva a cabo utilizando diferentes consorcios microbianos, como es el caso del estiércol de cerdo que se empleó para la degradación de desechos de papa, obteniendo alta eficiencia metanogénica (328m³ de CH₄.) [30]. Asimismo en Suiza se alcanzó una producción del 70% de metano utilizando estiércol de cerdo para degradar residuos producidos de industrias alimentarias [23]. El estiércol de cerdo es un consorcio microbiano que se adapta fácilmente a diferentes sustratos, siendo ésta una característica importante en la selección de un inóculo para la digestión anaerobia de residuos [32]. Por otra parte, el líquido ruminal es un excelente inóculo para sustratos lignocelulósicos, debido a su alta actividad celulolítica y al mezclarse con inóculos metanogénicos aumenta significativamente la producción de biogás [56].

El bagazo de fique contiene concentraciones de lignina del orden del 15% [8]. La lignina presente en el sustrato afecta la eficiencia en la conversión anaerobia del residuo para biorreactores de una fase; debido a que dificulta el fenómeno de transferencia de masa por parte de los microorganismos a la materia orgánica, y puede hacer que la hidrólisis se convierta en la etapa limitante del bioproceso [10, 25, 53, 57, 58]. La degradación anaerobia del bagazo de fique, para la producción de metano, requiere la configuración específica de un bioproceso que involucre en primer término la selección de un consorcio microbiano con capacidad para degradar residuos lignocelulósicos, y en segundo lugar llevar a cabo en forma separada las fases hidrolítica-acidogénica y metanogénica.

Para separar las fases de la digestión anaerobia es necesario determinar las condiciones de operación de cada una de ellas, con el objeto de evitar sobrecargas y acumulación de material tóxico en el reactor, permitiendo mejorar la estabilidad del proceso y por ende su rendimiento [11, 50]. De igual manera las digestiones anaeróbicas en dos fases favorecen los fenómenos de transferencia de masa, reducen la escasez de alimento y redistribuyen tanto las enzimas como los microorganismos en el biorreactor [37, 41, 43, 58].

Diferentes sustratos han sido tratados en configuración de dos fases, por ejemplo los residuos de frutas y vegetales que al utilizar como inóculo un lodo activo residual se obtiene un rendimiento de $0,37 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ [13]. Así mismo se ha demostrado que la separación de fases en la degradabilidad anaerobia de materiales lignocelulósicos consigue un 95% de conversión de sólidos volátiles a metano [7]. Lo anterior se corrobora con estudios donde se utilizó como sustrato estiércol de ganado y se concluyó que las etapas hidrolítica y acidogénica de la digestión anaerobia son las que controlan el proceso [41]. En el caso del tratamiento anaerobio de la melaza generada en ingenios azucareros se utilizó una agitación de 200 rpm en la fase hidrolítica-acidogénica y 30 rpm en la fase metanogénica, consiguiendo una eficiencia del 78% con respecto al proceso convencional [28].

Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue evaluar la producción de biogás a partir de bagazo de fique, en un bioproceso en dos fases, utilizando un consorcio microbiano compuesto de líquido ruminal y estiércol de cerdo.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Digestión Anaerobia

La bioproducción de metano se lleva a cabo mediante el proceso de digestión anaerobia, donde la materia orgánica es degradada por un consorcio de microorganismos en ausencia de oxígeno [12]. La digestión anaerobia se realiza en cuatro etapas simultáneas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

En la fase hidrolítica-acidogénica ocurre la despolimerización, solubilización y conversión de la materia orgánica en un lixiviado (efluente) rico en ácidos grasos volátiles [32]. Estas reacciones son llevadas a cabo por bacterias anaerobias facultativas cuyos géneros más frecuentes son los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además de los géneros: *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium*, *Acetovibrio*, *Bacteroides* [4, 32]. Durante esta fase, las condiciones favorables para el crecimiento de los consorcios microbianos son tiempos de operación entre dos y quince días, pH en un intervalo de 5 a 6,5, elevadas cargas orgánicas y mayores velocidades de agitación [11, 13, 15, 50].

En la fase metanogénica el efluente acidificado se convierte por acción de las bacterias acetogénicas (*Clostridium*, *Acetobacterium*, *Butyribacterium*) en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono; finalmente las bacterias metanogénicas (*Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanosaeta*) que se caracterizan por tener un metabolismo lento producen metano, a condiciones de pH en un intervalo entre 7 y 8,5 [43, 44, 58]. Las principales reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el proceso de digestión anaerobia se presentan en la Tabla 1 [52], en donde se observa que algunas reacciones no ocurren de forma espontánea pero se ven favorecidas por la simbiosis entre los microorganismos.

Tabla 1. Principales reacciones químicas que ocurren en la digestión anaerobia.

Reacción	Ecuación	ΔG° [kJ]
Fermentación de Glucosa a acetato	$\text{Glucosa} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}^+ + 4\text{H}_2$	-207
Fermentación de la Glucosa a Butirato	$\text{Glucosa} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-135
Fermentación del Butirato a Acetato e H_2	$\text{Butirato} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	+48,2
Fermentación del Propionato a Acetato	$\text{Propionato} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	+76,2
Acetogénesis a partir del H_2 y CO_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-105
Metanogénesis a partir del CO_2 y H_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-136
Metanogénesis a partir del Acetato	$\text{Acetato} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-31

La selección de un inóculo apropiado para la degradación metabólica de un sustrato hacia metano depende principalmente de su actividad hidrolítica y metanogénica [40, 52].

La Actividad Hidrolítica (AH) indica la habilidad inherente de una población microbiana para degradar fuentes de carbono (celulosa, almidón, etc.); se cuantifica como la velocidad específica de consumo de sustrato [19, 52]. De acuerdo con la literatura los consorcios microbianos con mayor AH son líquidos ruminales y lodos activos anaerobios con valores de 0,07 y 0,26 mg/mL, respectivamente [26, 40].

La Actividad Metanogénica Específica (AME) es la capacidad de la biomasa microbiana para transformar la materia orgánica en metano; se expresa como la masa de sustrato, en términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO) que es convertida a metano, por unidad de biomasa y por unidad de tiempo (gDQO- CH_4 /g Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)* día) [12]. Dentro de los inóculos con alta AME se encuentran el estiércol de cerdo (0,04 gDQO- CH_4 /gSSV día) y los lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (0,19 gDQO- CH_4 /gSSV día) [14, 17].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sustrato

El Bagazo de Fique (BF) se empleó como sustrato para el proceso de digestión anaerobia y se recolectó de una planta de beneficio localizada en el municipio de Mogotes, Santander. El protocolo de toma de muestra de BF se presenta en el Anexo 1. Las muestras de BF se conservaron refrigeradas en recipientes herméticos, y fueron trasladadas a las instalaciones del laboratorio de la Escuela de Ingeniería Química de la UIS, para su posterior evaluación de pH, concentración de Sólidos Totales (ST), concentración de Sólidos Volátiles (SV), alcalinidad (ALC), concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV), relación carbono/nitrógeno (C/N), celulosa, hemicelulosa y lignina. Los análisis fisicoquímicos realizados al BF fueron de acuerdo con los procedimientos establecidos por Van Soest y los *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* [3, 49]. En la tabla 2 se presentan las características fisicoquímicas del BF.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del bagazo de fique

Parámetro	Unidades	Resultado
pH		4
ST	mg/L	19,5
SV	mg/L	16,3
C/N		63
ALC	mgCaCO ₃ /L	3.300
AGV	mg/L	10.800
Celulosa	%	41,81
Hemicelulosa	%	22,17
Lignina	%	15,56
Poder calorífico	kcal/kg	3298

De acuerdo con la tabla 2, la cantidad de materia orgánica, relación C/N, concentración de AGV presentes en el BF indica que este residuo es potencialmente apropiado para el arranque de un proceso anaerobio. Además, el poder calorífico del BF, propio de los residuos lignocelulósicos, lo convierte en una materia prima atractiva para ser aprovechada energéticamente.

3.2 Inóculo

Como inóculo para el proceso de bioproducción de metano a partir del BF se utilizó un consorcio compuesto por Líquido Ruminal (LR) y Estiercol de Cerdo (EC). El LR se obtuvo de panzas bovinas y fue recolectado en el frigorífico “El Vijagual”, Rionegro – Santander. El EC fue recolectado de los pozos sépticos de la porcícola “Portoferrayo” ubicada en el municipio de La Mesa de los Santos, Santander. El protocolo de toma de muestra de inóculos se describe en el Anexo 2. En la tabla 3 se muestran las propiedades fisicoquímicas, AH y AME para cada uno de los inóculos empleados en este estudio. En esta tabla se aprecia que los consorcios microbianos compensan la acidez del BF por sus altos valores de pH.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas, AH y AME para los inóculos empleados

Parámetro	LR	EC	LR-EC	Unidades
pH	7	8	8	--
AGV	9.360	2.520	7.200	mg/L
ALC	4.100	1.700	3.100	mg CaCO ₃ /L
ST	17.470	105.940	43.770	mg/L
SSV	4.000	37.900	21.880	mg/L
STV	7.910	51.660	23.640	mg/L
AH	0,095	0,084	0,071	mg/mL día
AME	0,026	0,146	0,144	g DQO/g SSV día

3.3 Desarrollo Experimental del Bioproceso

Los ensayos de Digestión Anaerobia del BF se realizaron en configuración dos fases y se incluyó un experimento control en proceso convencional de una fase.

3.3.1 Digestión Anaerobia en Dos Fases

Se evaluó la influencia de las variables agitación y temperatura para la configuración de fases separadas, con base en dos diseños de experimentos 2^2 (Anexo 3).

Las etapas de hidrólisis y acidogénesis (Fase A) se realizaron en el Reactor Acidogénico (RA) y las etapas de acetogénesis y metanogénesis (Fase B) en el Reactor Metanogénico (RM).

3.3.1.1 Reactor Acidogénico

Los ensayos se realizaron en biodigestores de 500 mL con un volumen de operación de 172 mL y operados modo batch, a un tiempo de operación de 9 días. Inicialmente se agregó una carga orgánica de 3,6 g SV de BF húmedo, junto a 150 mL de LR como inóculo. El LR se seleccionó por tener alta AH.

Como parámetros de control se consideraron el pH y la relación AGV/ALC; y como variables respuesta: la AH, expresada como la variación de la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo, y la variación de la concentración de AGV durante el período de digestión.

Las condiciones de operación (agitación-temperatura) se muestran en la tabla 4. La velocidad de agitación se controló con el equipo Agitador Orbital, marca “*Orbit Shaker Lab Line*” graduado en 180 ± 20 rpm y la temperatura por medio de una incubadora a 39 ± 2 °C.

3.3.1.2 Reactor Metanogénico

El arranque de los biodigestores metanogénicos inició con la mezcla del contenido total del reactor acidogénico y EC (inóculo con alta AME). Se utilizaron biorreactores de 500 mL con un volumen de operación de 322 mL, operados en modo batch durante 12 días.

Al igual que en los biodigestores acidogénicos, los parámetros de control son pH y la relación AGV/ALC, mientras que la variable respuesta es el rendimiento de la producción de metano expresado en m³/kg SV adicionado. La calidad del biogás obtenido se cuantificó con un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls*.

Las condiciones de operación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de operación de los ensayos en dos fases

Experimento	Reactor	Agitación [rpm]	Temperatura [°C]
E1	RA	180	39
	RM	0	39
E2	RA	180	39
	RM	0	21
E3	RA	0	39
	RM	0	39
E4	RA	0	39
	RM	0	21
E5	RA	180	21
	RM	0	39
E6	RA	180	21
	RM	0	21
E7	RA	0	21
	RM	0	39
E8	RA	0	21
	RM	0	21

Los experimentos E1-E2 presentan las mismas condiciones de operación durante la Fase A, por esta razón se muestran los resultados de este par de experimentos como uno solo. De igual forma ocurre para los experimentos E3-E4, E5-E6, E7-E8. En la Fase B, cada experimento se reporta por separado porque las condiciones de operación son diferentes para cada uno de los ensayos.

3.3.2 Digestión Anaerobia Convencional

Se realizó el experimento control (E9) en biorreactores de 500 mL con un volumen de operación de 322 mL. Se agregaron 3,6 g SV de BF húmedo y como inóculo se emplearon 300 mL de mezcla LR-EC en proporción 1:1 (relación establecida por experimentación previa). El tiempo de operación fue 21 días y se incubó a una temperatura de $39\pm 2^{\circ}\text{C}$, sin agitación.

3.4 Métodos Analíticos

La concentración de ART, fue determinada según el método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS) [19], la concentración de AGV se cuantificó de acuerdo al procedimiento de titulación descrito por Anderson y Yang (1992) [49] y el volumen de metano se determinó por medio del método de desplazamiento alcalino diariamente [2, 11]. Los protocolos de procedimiento se presentan en el Anexo 4 para cada uno de los métodos.

Las muestras para el análisis de la concentración ART se tomaron diariamente y para AGV cada tres días.

3.5 Análisis Estadístico de Datos

El diseño de experimentos de la digestión anaerobia de BF en fases separadas y convencional, se analizó con el software *StatGraphics Centurion XV, StatPoint Inc., Virginia, EE.UU.* La prueba de Fisher se utilizó para comprobar las diferencias estadísticamente significativas de los rendimientos de la producción de metano [20].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Reactor Acidogénico

En la tabla 5 se encuentran los valores correspondientes a la AH, (el Anexo 5 presenta un ejemplo del cálculo de la AH para este estudio), se observa que los valores de AH para el reactor de la Fase A, se incrementaron en un 30 %, con respecto al proceso convencional (una fase).

Tabla 5. Actividad hidrolítica

Experimento	[mg ART/mL día]
E1;E2	1,63
E3;E4	1,48
E5;E6	1,80
E7;E8	1,48
E9	1,40

Dado que la etapa Hidrolítica es la limitante del proceso de Digestión Anaerobia [44], el haber conseguido un incremento de aproximadamente un 30%, en la digestión del BF con LR, indica que la separación de las fases es favorable para que los diferentes consorcios microbianos no sean inhibidos en sus metabolismos; resultado similar al reportado por otros autores [10, 11, 55].

Debido a que los experimentos E3; E4 y E7; E8, realizados a temperatura de 39°C y 21°C respectivamente, presentan valores de AH iguales, se puede inferir que los consorcios microbianos encargados de la etapa hidrolítica no son sensibles a cambios de temperatura [34, 35, 45].

Por otra parte los experimentos E1; E2, E5; E6, los cuales se realizaron a diferente temperatura y agitación, presentan la mayor AH; lo cual implica que la agitación

favorece el rápido crecimiento y metabolismo de la población microbiana hidrolítica [5, 11].

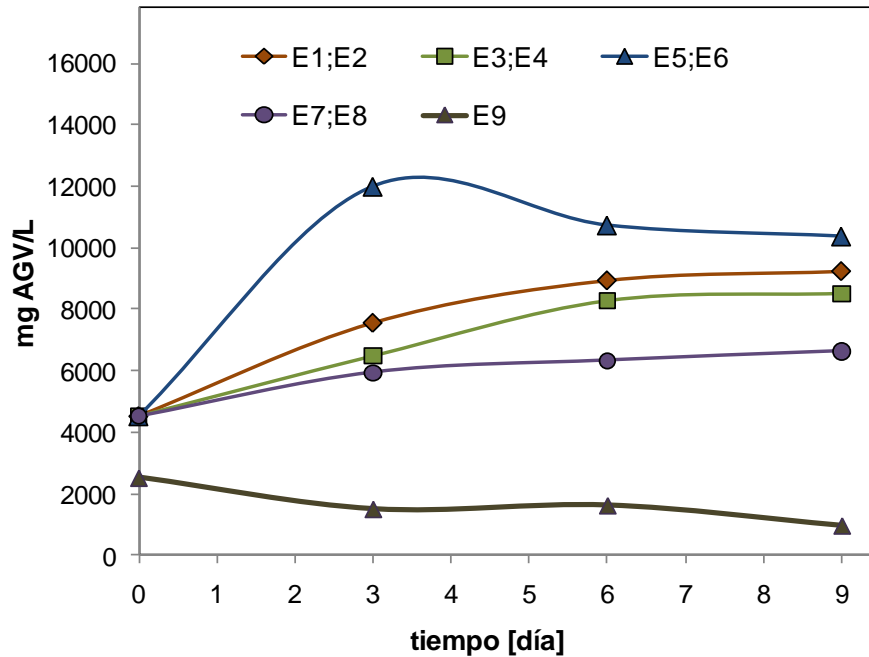


Figura 1. Concentración de Ácidos grasos volátiles en la Fase A

La AH de los ensayos realizados, se correlaciona con la variación de los AGV, (Figura 1). La concentración de AGV para la configuración de dos fases se mantuvo en un intervalo entre 4.000-12.000 mg AGV/L. El porcentaje de acidificación es un indicador del grado de conversión de la materia soluble a AGV [10]. En este estudio el porcentaje de acidificación varió entre 44-68%. Los experimentos realizados con agitación presentaron los valores de concentración de AGV más elevados; demostrando la incidencia de esta variable en el proceso de digestión anaerobia. Los valores de AGV obtenidos durante este trabajo, para la degradación de BF con LR, presentan similitud con los valores reportados al hidrolizar residuos de aceite de girasol y fracciones orgánicas urbanas con inóculos anaerobios de tratamiento de aguas residuales de cervecería y vino respectivamente [5, 10].

En cuanto al proceso convencional, la concentración de AGV se mantuvo estable (900-1.600 mg AGV/L) durante el tiempo de fermentación, debido al consumo por parte de los microorganismos metanogénicos [6], corroborando que la mezcla LR-EC presenta una mayor actividad metanogénica que el LR (Tabla 3).

Este comportamiento indica un buen desarrollo de la Fase A durante el bioproceso en dos fases y para el proceso convencional; similar a los reportados por otros investigadores [36, 48].

Estabilidad del reactor acidogénico. Fase A

La estabilidad de RA se evaluó con las variables control: pH (Figura 2a) y la relación de AGV/ALC (Figura 2b).

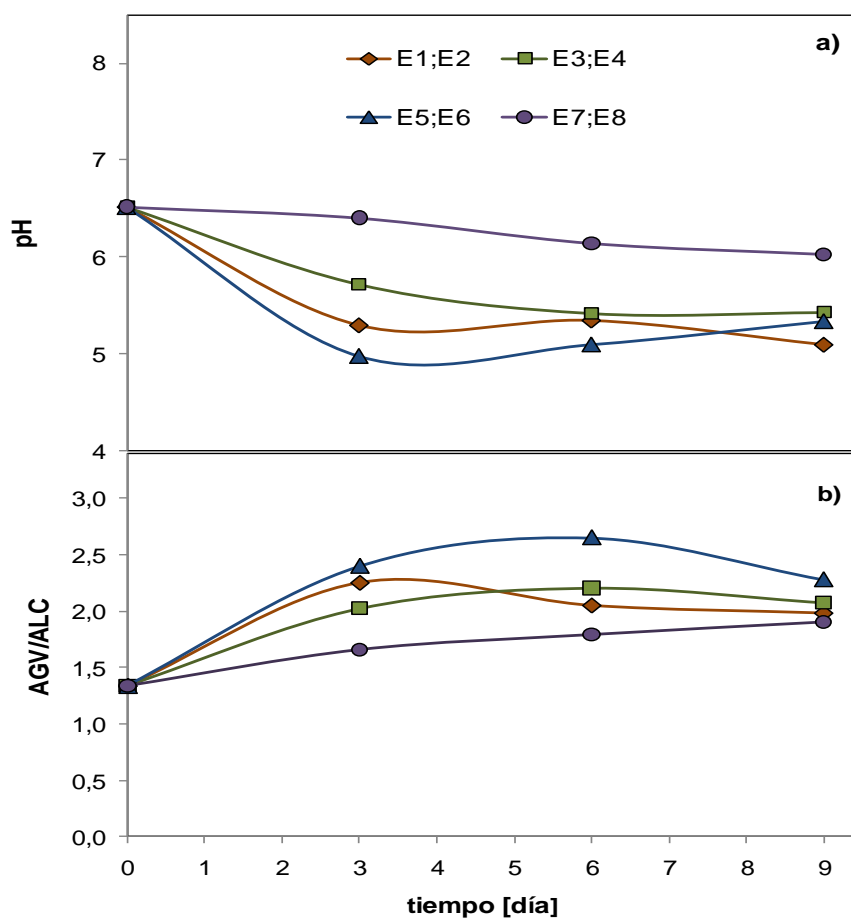


Figura 2. Parámetros de control en RA. a) pH, b) Relación AGV/ALC.

Durante esta fase, los valores de pH se redujeron debido al inicio de la producción de AGV y se mantuvieron en un rango entre 5 y 6,5, el cual es un intervalo adecuado para esta fase, porque inhibe a los microorganismos metanogénicos y favorece el metabolismo microbiano del consorcio acidogénico [10, 18, 45, 46, 50].

La relación AGV/ALC se mantuvo en un rango de 1,3-2,7 y el incremento de la relación es concordante con el decrecimiento del pH. Lo anterior, se correlaciona con los porcentajes de acidificación obtenidos, indicando que el proceso es considerado operante para la Fase A de la digestión anaerobia con separación de fases.

4.2 Reactor Metanogénico

En la Figura 3 se presentan los volúmenes de metano acumulado para los experimentos realizados en dos fases.

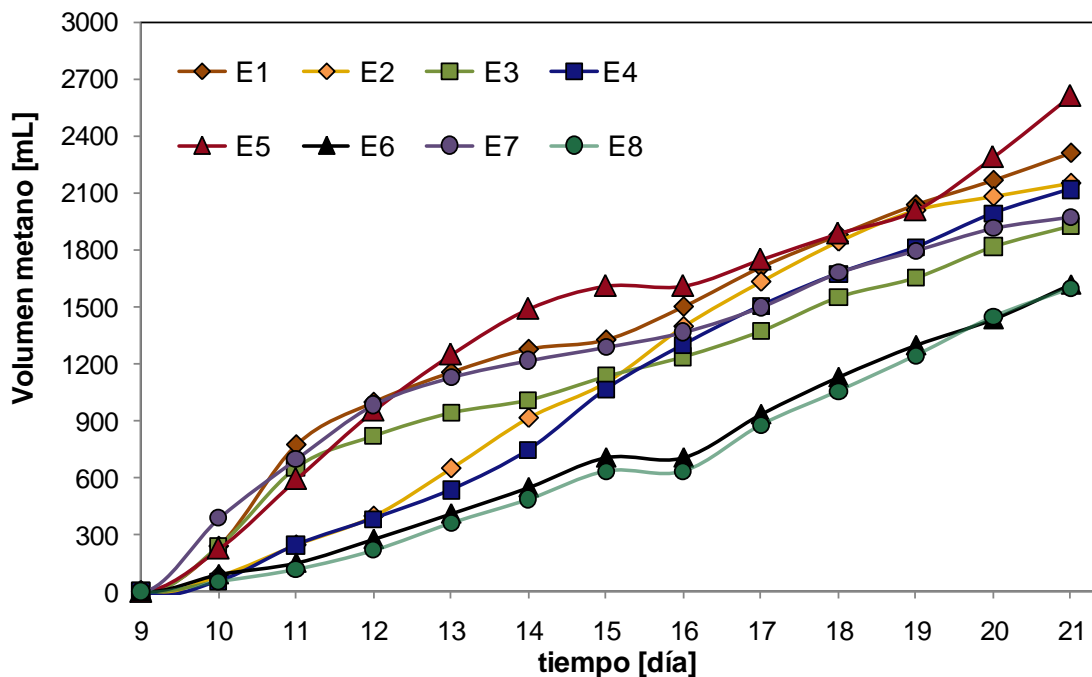


Figura 3. Volumen acumulado de metano en el reactor metanogénico

La producción de metano fue significativa a partir del arranque del RM (noveno día de operación). La mayor producción de metano fue para los experimentos E5 y E1 realizados a una temperatura de 39°C en la Fase B, alcanzando rendimientos de 1,82 y 1,67 m³/kg SV respectivamente. En cuanto a los ensayos realizados a temperatura ambiente (21°C) en la Fase B; se obtuvieron rendimientos de 1,20 y 1,16 m³/kg SV.

De los resultados anteriores se puede inferir que el consorcio microbiano de la Fase B, manifiesta gran sensibilidad a los cambios de temperatura y realiza su función con mejores rendimientos a 39°C; resultado que coincide con los reportados en la literatura [21, 22, 31, 45]. Esto se debe a que a altas temperaturas los sustratos son más solubles en el medio y por consiguiente los microorganismos presentan mayor afinidad hacia estos sustratos [13, 36].

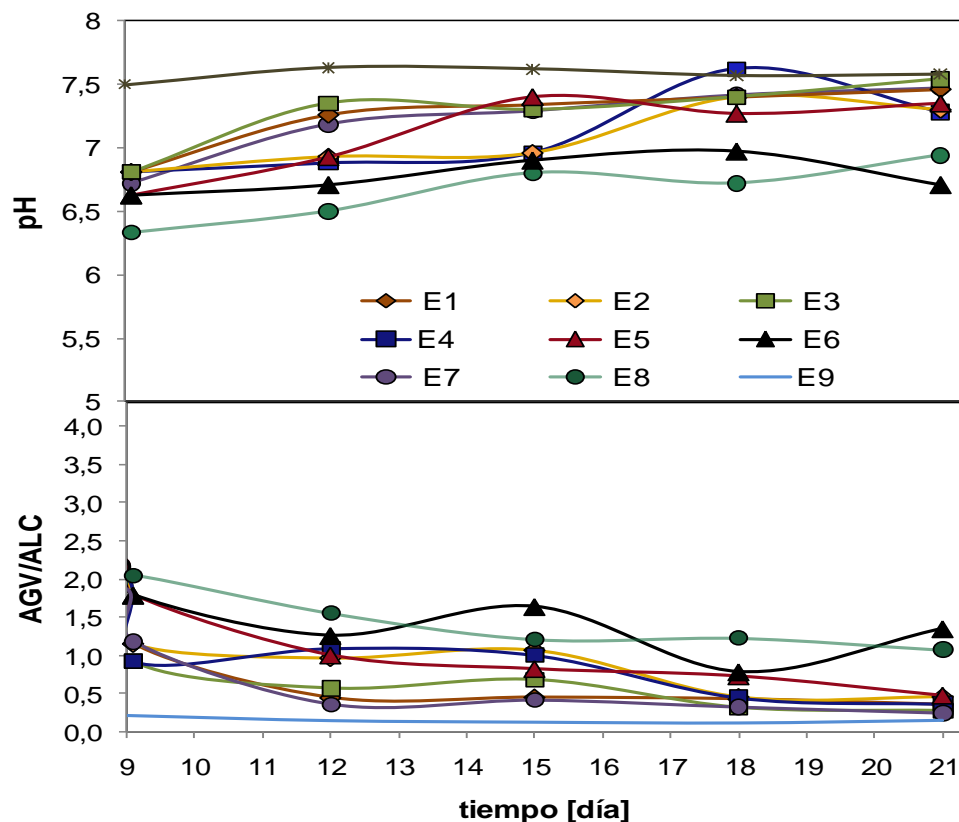


Figura 4. Parámetros de control en RM. a) pH, b) Relación AGV/ALC

Estabilidad del reactor metanogénico. Fase B

La estabilidad de RM se evaluó con la variable control: pH (Figura 4a) y la relación de AGV/ALC (Figura 4b).

Para la configuración de dos fases, en el primer día de operación de la Fase B, el pH aumentó para todos los ensayos a valores entre 6,3 y 6,8, debido a la capacidad buffer del inóculo metanogénico (EC) y durante el tiempo restante de digestión el pH se mantuvo en un rango 6,5 y 7,5; alcanzando las condiciones favorables para el consorcio metanogénico [9, 10, 50, 55].

La relación AGV/ALC disminuyó como consecuencia del aumento de pH, y se mantuvo en un intervalo entre 0,5 y 1,5. De acuerdo con la literatura estos valores podrían causar inhibición y acidificación en el reactor disminuyendo los rendimientos de la producción de metano [15, 46, 48]. Sin embargo, durante este estudio la estabilidad del biorreactor y los rendimientos de la producción de biogás a partir del BF no se ven afectados por inhibiciones o acidificaciones, demostrando que el RM presenta una excelente capacidad buffer.

Los resultados obtenidos, en RA y RM, demuestran que efectivamente se logró la separación de las fases A y B.

En cuanto al proceso convencional, la relación AGV/ALC se conservó en un intervalo de 0,1-0,4, el cual es un rango adecuado para este tipo de sistemas y el proceso es considerado operante sin riesgo de acidificación e inhibición [10, 13, 46].

4.3 Análisis del Diseño de Experimentos

De acuerdo al análisis estadístico de los efectos principales de las variables temperatura y agitación sobre los rendimientos de producción de metano para los ensayos realizados a 39°C en la Fase B (E1, E3, E5 y E7), la temperatura, no es una variable influyente en la Fase A sobre el rendimiento, estos resultados

conducen con los obtenidos para la AH en RA. A diferencia de la variable agitación que al presentar un valor $-p$ de 0,0144 menor a 0,05, tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento con un 95% de nivel de confianza. Esto se puede explicar porque la agitación favorece los fenómenos de transferencia de masa, permitiendo que los microorganismos tengan más accesibilidad al sustrato y lo puedan degradar mejor [1, 29, 51].

4.4 Configuración Dos Fases Versus Proceso Convencional.

Para realizar la comparación de la digestión anaerobia del BF en dos fases y convencional, se normalizó la producción de metano de acuerdo a lo establecido por Demirer & Chen 2005 [11]. La normalización es necesaria debido a la diferencia de los tiempos de operación 12 y 21 días en el RM de la configuración de dos fases y el reactor convencional respectivamente, obteniendo así una relación de los tiempos de operación de 0,57. La producción de metano en RM debe ser mayor del 57% que la del reactor convencional para afirmar que el proceso de digestión anaerobia en dos fases del BF es mejor que el proceso convencional.

Por lo anterior, en la Figura 5, se muestra la producción de volumen de metano normalizada para los experimentos realizados a 39°C en la Fase B (el Anexo 6 presenta un ejemplo del cálculo de la producción de metano normalizada).

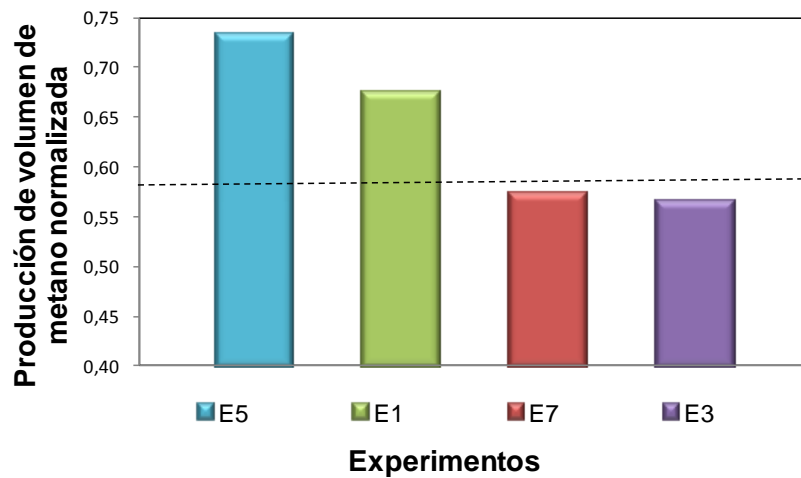


Figura 5. Producción de volumen de metano acumulado

En la Figura 5 se observa que los ensayos E7 y E3 están por debajo de la relación, esto indica que no es ventajosa la configuración en dos fases sobre el proceso convencional para estas condiciones de operación. Contrario a lo que ocurre para los experimentos E5 y E1 donde prevalece el sistema de separación de fases sobre el convencional. Lo que demuestra que la separación de fases con las condiciones de operación de los experimentos E5 y E1 mejora el funcionamiento del bioproceso.

Lo anterior se corrobora con la distribución de medias y medianas (Figura 6), donde existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los experimentos (E1, E5 y E9) a un nivel de confianza del 95%, con un valor $-p$ de 0,016.

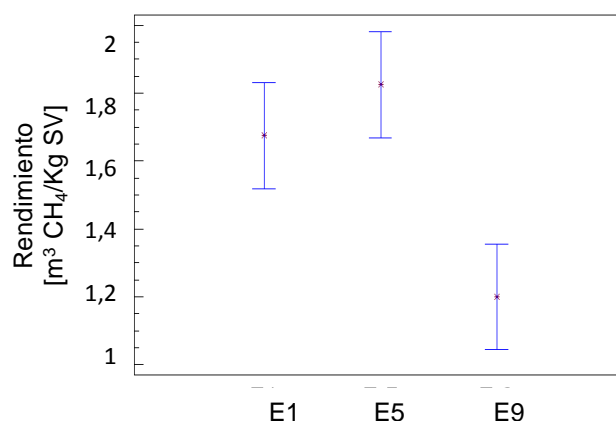


Figura 6. Distribución de medias para los rendimientos de E1, E5 y E9.

Estos resultados demuestran que la configuración en dos fases con condiciones 180 rpm-21°C en la Fase A y 0 rpm-39°C en la Fase B, aumenta el rendimiento del proceso de bioconversión anaerobia del BF en un 73% con respecto al sistema convencional.

La calidad del biogás obtenido para cada una de las configuraciones se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Calidad del biogás

Configuración	Composición	Unidad	Cantidad
Dos fases	CH ₄	%	63
	CO ₂	%	25
	Otros gases	%	12
Convencional	CH ₄	%	56
	CO ₂	%	30
	Otros gases	%	14

La composición porcentual del biogás producido a partir del BF, para cada una de las configuraciones presenta un alto contenido de metano el cual puede ser aprovechado como energía eléctrica y/o calorífica [13, 27, 44].

5. CONCLUSIONES

El consorcio microbiano presente en el LR, contiene una alta AH, y baja AME, características que lo hicieron competente para llevar a cabo la fase hidrolítica-acidogénica del proceso. Asimismo, para la fase metanogénica, la mezcla LR-EC fue un inóculo adecuado para la degradación de sustratos de tipo vegetal como el BF debido a la sinergia entre los consorcios microbianos, la alta AME de la mezcla, superando las carencias metanogénicas del LR.

Una proporción de aumento de hasta el 30% en la actividad hidrolítica respecto al sistema convencional, demostró una eficiente separación de fases con el uso de LR como inóculo en la fase hidrolítica-acidogénica.

Las condiciones adecuadas para el proceso en dos fases se presentaron con una agitación de 180 rpm para la fase hidrolítica-acidogénica, sin influencia de la temperatura, mientras que para la fase metanogénica existe una fuerte dependencia hacia valores de temperaturas mayores (39°C).

En este estudio se demostró que la separación de fases para la producción de biogás a partir del bagazo de fique mejora el rendimiento global del proceso y la calidad del biogás, por lo tanto puede ser una alternativa para el tratamiento de residuos lignocelulósicos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÁLVAREZ J., OTERO L., LEMA J., A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. 2010, *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 1153–1158.
2. ÁLVAREZ, J., ARMSTRONG, E., GÓMEZ, M., SOTO, M., Anerobic treatment of low-strength municipal wastewater by a two-stage pilot plant under psychrophilic conditions. 99, 2008, *Bioresource Technology*, pp. 7051-7062.
3. APHA, American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 1998, *Water and wastewater*, Vol. 18 (20), pp. 25-32.
4. ARCOS L., OSSA F., DÍAZ T., Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. 2004, *Corpoica*, Vol. 5 (1).
5. ARGELIER S., DELGENES J.-Ph., MOLETTA R., Design of acidogenic reactors for the anaerobic treatment of the organic fraction of solid food waste.. 1998 , *Bioprocess Engineering*, Vol. 18 , pp. 309-315.
6. BARRERA A. P., VILLAREAL S. M., CASTRO M. L., ORTIZ C., ESCALANTE H. H. Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso de beneficio del fique2009., *Ion*, Vol. 22. no 1.
7. BOUALLAGUI H., TOUHAMI Y., BEN CHEIKH R., HAMDI M., Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. 2005, *Process Biochemistry* , Vol. 40, pp. 989–995.
8. CASTRO L., ESCALANTE H., QUINTERO M., ORTIZ C., GUZMÁN C., Producción de Biogás a partir del bagazo de fique generado durante el beneficio de fique. Cuarto Simposio de química aplicada SIQUIA. [Cuarto Simposio de química aplicada SIQUIA]. 2009. ISBN 978-958-8593-12-8.
9. CHU L.B., YANG F.L., ZHANH X.W., Anaerobic treatment of domestic wastewater in a membrane-coupled expanded granular sludge bed (EGSB) reactor under moderate to low temperature. 2005, *Process Biochemistry*, Vol. 40, pp. 1063–1070.
10. DE LA RUBIA M., RAPOSO F., RINCÓN B., BORJA R., Evaluation of the hydrolytic-acidogenic step of a two-stage mesophilic anaerobic digestion process of sunflower oil cake. 2009, *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 4133-4138.
11. DEMIRER G., CHEN S., Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. 2005, *Process Biochemistry*, Vol. 40, pp. 3542-3549.

12. DIAZ BÁEZ M., ESPITIA V. y MOLINA P., ed. Digestión anaerobia, una aproximación a la tecnología. Bogotá : Unibiblios, 2002.
13. DINSDALE R., PREMIER G., HAWKES F., HAWKES D., Two-stage anaerobic co-digestion of waste activated sludge and fruit/vegetable waste using inclined tubular digesters. 2000, Bioresource Technology, Vol. 72, pp. 159-168.
14. FAJARDO ORTIZ M., Producción de inóculos para reactores anaerobios. División de ciencias biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana. México : s.n., 1997.
15. FEZZANI B., CHEIKH R., Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuos digesters at mesophilic temperature. 2010, Bioresource Technology, Vol. 101, pp. 1628-1634.
16. Finagro. Fique. Producción y zonas de producción. [Online] [Cited: Enero 24, 2011.] www.finagro.com.co.
17. FORERO W., ZÚÑIGA J. Evaluación de la actividad metanogénica de lodos. Ingeniería civil y agrícola, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá : s.n., 2003.
18. FORSTER T., Digestión anaerobia termofílica seca de residuos sólidos urbanos: estudio de las variables del proceso en el arranque y estabilización del biorreactor. Ingeniería química, Tecnología de alimentos y del medio ambiente, Universidad de Cádiz. Cádiz : s.n., 2005.
19. GARZÓN L., Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana de açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Faculdade de engenharia química. Universidade estadual de campinas. 2009.
20. GUITIERREZ PULIDO H., Análisis y diseño de experimentos. México : Mc Graw Hill., 2008.
21. HALALSHEH M., SAWAJNEH Z., ZU-BI M., ZEEMAN J., LIER M., FAYYAD M., LETTINGA G., Treatment of strong domestic sewage in a 96 m³ UASB reactor operated at ambient temperatures: Two-stage versus single-stage reactor. 2005, Bioresource Technology, Vol. 96, pp. 577-585.
22. HAN Y., HERBERT H.P. F., Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. 2003, Water Research, Vol. 37, pp. 55-66.
23. HASHIMOTO A., Methane from swine manure: Effect of temperature and influent substrate concentration on kinetics parameter (K). 1984, Agriculture Wastes, Vol. 9 (4), pp. 299-308.

24. HELD C., WELLACHER M., ROBRA K.H., GÜBITZ G., Two-stage anaerobic fermentation of organic waste in CSTR and UFAF-reactors. 2002, *Bioresource Technology*, Vol. 81, pp. 19-24.
25. HENDRISKS A.T.W.M., ZEEMAN G., Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. 2009, *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 10-18.
26. HU Z., WANG G., YU H., Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. 2004, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 21, pp. 59-62.
27. IDAE, Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. *Biomasa: Digestores anaerobios*. Madrid : BESEL, S.A., 2007.
28. JUNG PARK M., HYE JO J., PARK D., SUNG L.D, MOON PARK J., Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. 2010, *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 35, pp. 6194-6202.
29. KAPARAJU P., BUENDÍA I., ELLEGAARD L., ANGELIDAKIA I., Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab-scale and pilot-scale studies. 2008, *Bioresource Technology* , Vol. 99, pp. 4919–4928.
30. KAPARAJU P., RINTALA J., Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. 2005, *Resources, Conservation and Recycling*, Vol. 43, pp. 175-188.
31. KASHYAP D.R., DADHICH K.S., SHARMA S.K., Biomethanation under psychrophilic conditions: a review. 2003, *Bioresource Technology*, Vol. 87, pp. 147–153.
32. KHANAL S., *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and applications*. s.l. : Blackwell, 2008. ISBN: 978-0-813-82346-1.
33. LETTINGA G., REBAC S., ZEEMAN G., Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. 2001, *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 19 (9), pp. 363-370 .
34. MAHMOUDA N., ZEEMANA G., GIJZEN H., LETTINGA G., Anaerobic stabilisation and conversion of biopolymers in primary sludge—effect of temperature and sludge retention time. 2004, *Water Research*, Vol. 38, pp. 983–991.
35. MAHMOUDA N., ZEEMANA G., GIJZEN H., LETTINGA G., Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. 2003 : s.n., *Bioresource Technology* , Vol. 90, pp. 1–9.

36. MANDUJANO P., Digestión Anaerobia de Sólidos en Alta Concentración. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid : s.n., 2001.
37. MATA-ALVAREZ J., MACÉ S., LLABRÉS P., Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. 2000, Bioresource Technology, Vol. 74, pp. 3-16.
38. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Ministerio nacional de planeación. Guía ambiental del subsector fiquero. 2006.
39. MOJICA P. A., PAREDES V. J., El cultivo del fique en el departamento de Santander. Bucaramanga : Centro regional de estudios económicos, 2004.
40. MSHANDETE A., BJÖRNSSONA L., KIVAIISI A., RUBINDAMAYUGI M., MATTIASSON B., Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment.. 2005, Water Research , Vol. 39, pp. 1569–1575.
41. MYINT M., NIRMALAKHANDAN N., SPEECE R.E., Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogénesis. 2007, Water Research, Vol. 41, pp. 323 – 332.
42. NIZAMI A., MURPHY J., What type of digester configurations should be employed to produce biomethane from grass silage. 2010 , Renewable and Sustainable Energy Reviews , Vol. 14, pp. 1558-1568.
43. O'KEEFE D., CHYNOWETH D., Influence of phase separation, leachate recycle and aeration on treatment of municipal solid waste in simulated landfills cells. 2000, Bioresource Technology, Vol. 72, pp. 55-66.
44. PARAWIRA R., READ J., MATTIASON B., BJÖRNSSON L., Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion. 2008, Biomass and Bioenergy, Vol. 32, pp. 44-50.
45. POIRRIER P., Hidrólisis y acidificación psicrófila de moléculas complejas en sistemas anaerobios. Ingeniería química, Universidad de Santiago de Compostela. 2005.
46. RAPOSO F., BANKS C., SIEGERT I., BORJA R., Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. 2006, Process Biochemistry , Vol. 41, pp. 1444-1450.
47. RODRÍGUEZ MAROTO J., GÓMEZ LAHOZ C., GARCÍA HERRUZO F., VEREDA ALONSO C., Producción de biogás a partir de residuos vegetales (II): Biorreactores anaeróbicos. 2006, Ingeniería química, , pp. 124-128. ISSN 0210-2064, N°. 433.

48. RUBIO-LOZA L., NOYOLA A., Two-phase (acidogenic-methanogenic) anaerobic thermophilic/mesophilic digestion system for producing Class A biosolids from municipal sludge. 2010, *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 576-585.
49. SANDOVAL C., MENDOZA M., CARRENO M., CASTILLO E., Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. 2009, *Waste Management*, Vol. 29, pp. 704–711
50. SOLERA R., ROMERO L., SALES D., The evolution of biomass in a two-phase anaerobic treatment process during start-up 2002, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, Vol. 16 (1), pp. 25-29.
51. STROOT P., MCMAHON K., MACKIE R., RASKIN L., Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions: Digester performance. 2001, *Water Research*, Vol. 35 (7), pp. 1804–1816.
52. VALDEZ-VAZQUEZ I., POGGI-VARALDO H. Hydrogen production by fermentative consortia. 2009, *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, Vol. 13, pp. 1000-1013.
53. VAVILIN V., RYTOV V., LOKSHINA L., RINTALA J.A., LYBERATOS G., Simplified hydrolysis models for the optimal design of two-stage anaerobic digestion. 2001, *Water Research*, Vol. 35 (17), pp. 4247–4251.
54. VAVILIN V.A., FERNANDEZ B., PALATSI J., FLOTATS X., Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. 2008, *Waste Management*, Vol. 28, pp. 939–951.
55. WEI C., WANG W., DENG Z., WU C. Characteristics of high-sulfate wastewater treatment by two-phase anaerobic digestion process with Jet-loop anaerobic fluidized bed. 2007, *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 19, pp. 264-270.
56. YUE Z.B., YU H.Q., HARADA H., Optimization of anaerobic acidogenesis of an aquatic plant, *Canna indica*L, by rumen cultures. 2007, *Water Research*, Vol. 42, pp. 2361-2370.
57. ZHAO B.H., YUE Z.B., NI B.J., MU Y., YU H.Q., HARADA H., Modeling anaerobic digestion of aquatic plants by rumen cultures: Cattail as an example. 2009, *Water Reserarch*, Vol. 43, pp. 2047-2055.
58. ZHU M., LÜ F., HAO L.P., HE J., SHAO L.M, Regulating the hydrolysis of organic wastes by micro-aeration and effluent recirculation. 2009, *Waste Management*, Vol. 29, pp. 2042-2050.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de toma de muestra de bagazo de fique

Materiales y Reactivos

- Nevera de icopor
- Hielo
- Alcohol al 70%
- Tiras reactivas de pH
- Guantes de látex
- Bolsa plástica con cierre
- Cinta de enmascarar
- Marcadores permanentes



Imagen 1. Toma de muestra de BF

Procedimiento

1. Escoger hojas de fique en las que no se observen daños ocasionados por alguna clase de microorganismo o éste lacerada.
2. Limpiar la máquina desfibradora de hojas de fique, con alcohol al 70% antes de proceder a tomar la muestra de bagazo.
3. Solicitar al manipulador de la máquina que comience la operación del desfibrado de la hoja de fique. Descartar la primera fracción expulsada del bagazo, tomar la fracción del medio, igualmente descartar la última parte.
4. Llenar la totalidad de las bolsas de la toma de muestra, sin dejar espacios de aire, medir pH y cerrar inmediatamente.
5. Llevar la nevera de icopor con hielo; cerrar y rotular las bolsas con las muestras con nombre del lugar, día y fecha de la toma de muestra.
6. Conservar refrigerado hasta su uso.

Anexo 2. Protocolo de toma de muestra de inóculos

Líquido Ruminal

Materiales

- Nevera de icopor
- Recipiente hermético
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Cinta



Imagen 2. Toma de muestra del contenido ruminal

Procedimiento

1. Seleccionar el rumen (materia sólida y LR) de las panzas de los bovinos.
2. Llenar la totalidad de los recipientes con la muestra y cerrar inmediatamente.
3. Llevar a la nevera de icopor, cerrar y reforzar con cinta.
4. Trasladar las muestras al laboratorio. Las muestras de rumen no deben dejarse más de dos días sin utilizarse.
5. Para la obtención de LR, las muestras de contenido ruminal se filtran, con el fin de separar la materia sólida del LR.
6. Finalizada la etapa anterior, el LR ya puede ser utilizado para iniciar el proceso de digestión.



Imagen 3. Filtración LR

Estiércol de Cerdo

Materiales:

- Pimpinas
- Toma muestra para lodos anaerobios
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Arnés



Imagen 4. Toma de muestra de EC

Procedimiento:

1. Introducir el equipo para la toma muestra hasta el fondo de la laguna de lodos.
2. Una vez determinado un punto adecuado, se recolecta la muestra y se saca a la superficie el toma muestra.
3. Llenar las pimpinas con el EC recolectado en el toma muestra y cerrar inmediatamente.
4. Trasladar las muestras al laboratorio para su posterior uso en la experimentación.



Imagen 5. Inóculo metanogénico EC

Anexo 3. Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimento 2^2 , para determinar las condiciones de operación de los experimentos del conjunto 1 durante la fase hidrolítica-acidogénica y la fase metanogénica. La variable agitación se tuvo en cuenta para la Fase A y la variable temperatura para la fase B (el valor de la temperatura para la Fase A fue de 39°C).

Tabla 7. Variables y niveles del diseño de experimentos

VARIABLES	NIVELES	
	BAJO	ALTO
Agitación [rpm]	0	180
Temperatura [°C]	21	39

Matriz para el diseño de experimentos del conjunto 1:

Tabla 8. Diseño de experimentos conjunto 1

Experimento	Fase A		Fase B	
	Agitación [rpm]	Temperatura [°C]	Agitación [rpm]	Temperatura [°C]
E1	180	39	0	39
E2	180	39	0	21
E3	0	39	0	39
E4	0	39	0	21

Para determinar las condiciones de operación del conjunto 2, se tuvo en cuenta para la Fase A una temperatura de 21°C, y no se tuvo en cuenta la agitación para la Fase B.

La matriz de experimentos para el conjunto 2 fue:

Tabla 9. Diseño de experimentos conjunto 2

Experimento	Fase A		Fase B	
	Agitación [rpm]	Temperatura [°C]	Agitación [rpm]	Temperatura [°C]
E5	180	21	0	39
E6	180	21	0	21
E7	0	21	0	39
E8	0	21	0	21

Registro fotográfica del montaje de diseño de experimentos.

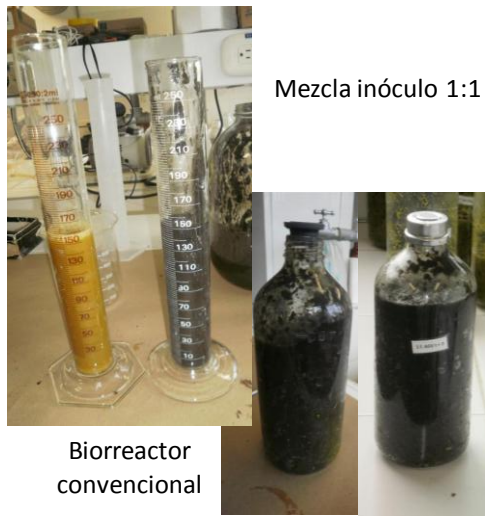


Imagen 6. Montaje experimento convencional

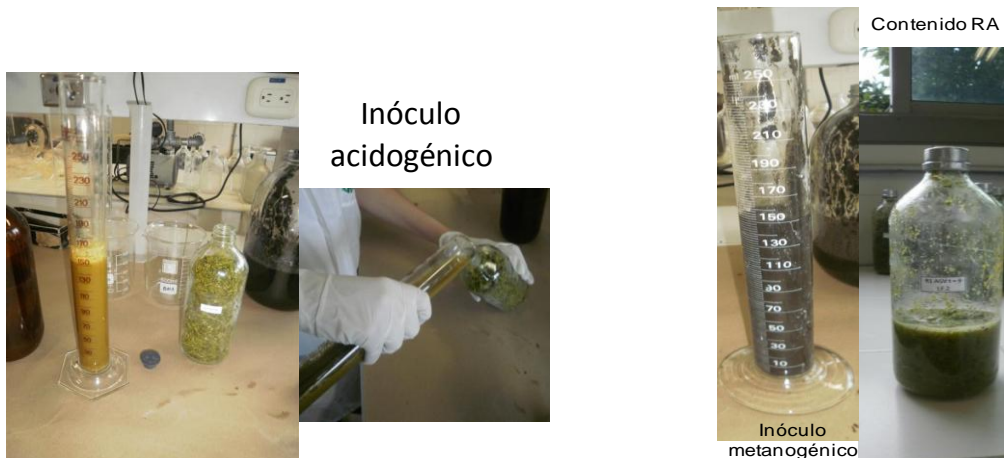


Imagen 7. Montaje reactor acidogénico

Imagen 8. Montaje reactor metanogénico

Anexo 4. Métodos analíticos

Determinación de la concentración de azúcares reductores

El método DNS o del ácido dinitrosalicílico es un método colorimétrico, desarrollado para la cuantificación de azúcares reductores. Este método es un método rápido y reproducible.

Reactivo DNS

- Mezclar y disolver en 250 mL de agua destilada 8 g de NaOH y 150 g de tartrato sodio potasio.
- Posteriormente agregar 5 g de ácido dinitrosalicílico.
- Aforar a 500 mL con agua destilada.
- Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Procedimiento

- Agregar 1 mL de reactivo a 1 mL de muestra usando tubos tapa rosca.
- Dejar en baño con agua en ebullición durante 5 minutos.
- Detener la reacción en un baño de hielo.
- Agregar 10 mL de agua destilada, y dejar reposando durante 15 minutos.

Leer densidad óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra.

Construcción de la curva estándar de glucosa

Se preparan las muestras de glucosa con concentraciones conocidas, se aplica el método DNS y se lee su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Con los datos obtenidos, se traza un gráfico lineal de la concentración de glucosa (azúcar reductor) como una función de absorción, y así se determina la ecuación que relaciona las dos cantidades.

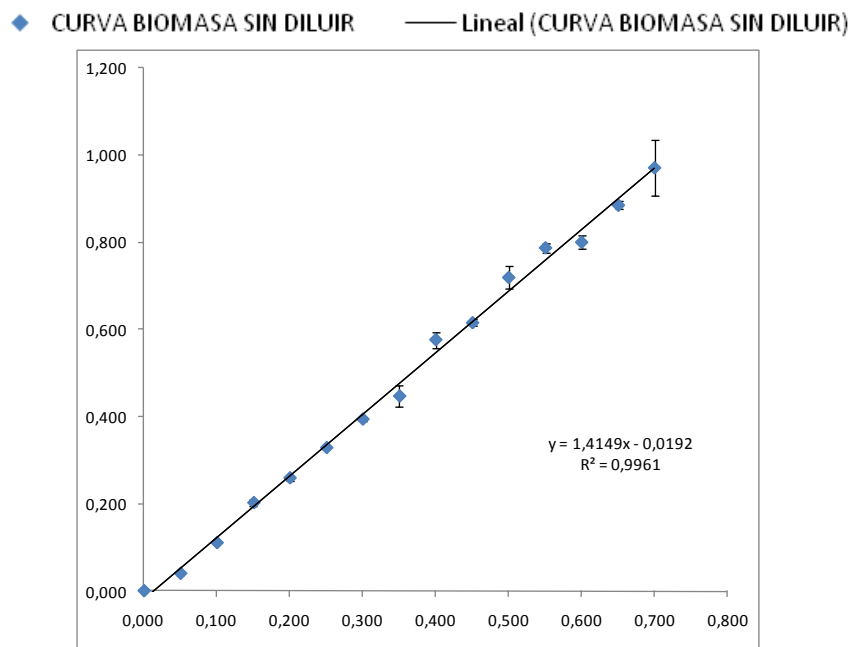


Figura 7. Curva estándar de glucosa

Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV se cuantificó de acuerdo al siguiente método:

Materiales:

- Vaso de precipitado de 100mL
- Probeta de 25 mL
- Centrífuga refrigerada
- pH-metro
- Agitador magnético
- 2 Balones esmerilados de fondo redondo o plano
- Condensador
- Plancha de calentamiento
- 2 Buretas
- Soporte de plancha
- Soporte universal
- Pinzas con nuez
- Solución de NaOH al 0,1 N
- Solución de HCl al 0,1 N

Procedimiento:

1. Tomar una muestra aproximadamente de 40 mL cada tres días durante el proceso de digestión, en tubos falcom de 50 mL.
2. Centrifugar las muestras por 15 minutos a 10000 gravedades.
3. Llevar el sobrenadante a frascos plásticos, medir pH y registrar el valor.
4. Medir 5 mL del sobrenadante y llevarlo a un vaso de precipitado de 100 mL.
5. Medir en una probeta 25 mL de agua destilada y agregarla al sobrenadante medido anteriormente.
6. Titular con una solución previamente preparada de HCl 0,1 N hasta alcanzar un pH de 4.5 y registrar volumen (V1), manteniendo agitación continúa.
7. Continuar titulado con la solución de HCl sin dejar de agitar hasta alcanzar un pH de 3, registrar volumen (V2).
8. Llevar la muestra a un balón esmerilado, adaptarlo al condensador.
9. Calentar hasta ebullición y mantener por 2 minutos.
10. Titular con una solución previamente preparada de NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 6,5, registrar el volumen (V3).

Cálculos:

$$\text{Alcalinidad} = \frac{A1 * N_{\text{HCl}} * 50000}{5} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

$$\text{AGV} = \frac{B * N_{\text{NaOH}} * 60000}{5} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

Método de desplazamiento alcalino**Materiales:**

- Biodigestor anaerobio
- Solución 0,1 N NaOH
- Fenolftaleína
- Mangueras y agujas

- Recipiente colector de 1L

Procedimiento:

Cada reactor se conecta con la botella de desplazamiento alcalino por medio de una red de mangueras de plástico y agujas (Esquema). El biogás producido en el reactor se burbujea en la solución alcalina con fenolftaleína como indicador y pH mayor que 12, en la cual el CO_2 es absorbido y el volumen de gas metano desplaza un volumen igual de la solución alcalina. El volumen de la solución desplazada fuera de la botella en el recipiente colector es equivalente al volumen de metano generado por el sistema.

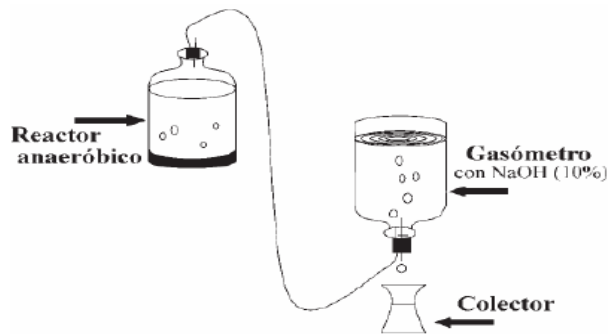


Imagen 4. Esquema de montaje para la medición de volumen de metano

Registro fotográfico de los equipos utilizados



Imagen 9. Centrifuga



Imagen 10. Sistema de agitación y temperatura



Imagen 11. Sistema de calidad de biogás

Anexo 5. Cálculo de la Actividad Hidrolítica

A continuación se describe el método para calcular la actividad hidrolítica, a partir de la concentración de azúcares reductores:

Experimento E1-E2:

Tabla 10. Concentración de ART para E1-E2

t [día]	[mg ART/L]
0	8,2
1	1,9
2	2,4
3	1,6
4	1,3

A partir de los datos de concentración de ART, se realizó una linealización exponencial, y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\ln ART = \ln 5,11 - \ln 0,379 t$$

La pendiente se consideró como la actividad hidrolítica, con un valor de 1,63 mg ART/(L día).

Anexo 6. Normalización de la producción de volumen de metano

La normalización es necesaria debido a la diferencia de los tiempos de operación 12 y 21 días en el RM de la configuración de dos fases y el reactor convencional respectivamente, obteniendo así una relación de los tiempos de operación de 0,57.

Tabla 11. Volumen de metano

Experimento	Volumen [mL]
E1	2308,50
E3	1927,00
E5	2509,50
E7	1972,67
E9	3432,00

Para el ensayo E1:

$$\text{Volumen de metano normalizado} = \frac{\text{Volumen E1}}{\text{Volumen E9}} = 0,67$$

Y así sucesivamente para los demás experimentos.