

**PROCESO INTEGRAL PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE
FIQUE**

LILIANA DEL PILAR CASTRO MOLANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2012**

**PROCESO INTEGRAL PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE
FIQUE.**

LILIANA DEL PILAR CASTRO MOLANO

**Tesis presentada como requisito para acceder al título de:
Doctor en Ingeniería Química**

**Director:
Humberto Escalante Hernández**

**Co directoras:
Carolina Guzmán Luna
Claudia Ortiz López**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2012**

AGRADECIMIENTOS A ENTIDADES

La realización de esta tesis no hubiese sido posible sin el apoyo financiero del Departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación de Colombia (COLCIENCIAS), el Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR), la Universidad Industrial de Santander (UIS) Colombia y la Universidad de Barcelona (UB) España.

Agradezco también a las siguientes entidades por el suministro de información y materia prima para el desarrollo de esta investigación y a los grupos de investigación de la UIS por el apoyo de la infraestructura de los laboratorios:

Alcaldía de Mogotes

Asdefique - Asociación de Fiqueros de Santander

Cadefique - Cadena Productiva de Fique

Planta de sacrificio “Frigorífico el Vijagual” - Rionegro, Santander

Porcícola “Puerto Ferrayo” - Mesa de los Santos, Santander

Banco de Germoplasma Ruminal - Corpoica, Tibaitata, Cundinamarca

Universidad Pontificia Bolivariana Sede Medellín

Laboratorio de Difracción de Rayos X-UIS

Laboratorio de Biotecnología-UIS

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología - UIS

Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente – UIS

Grupo de Investigación en Desarrollo y Tecnología de nuevos materiales

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Después de haber recorrido este largo camino y sentirme cerca de la meta que en algunos momentos no era más que un sueño difícil de alcanzar, hoy solo me resta agradecer a las personas que durante esta etapa de mi vida me acompañaron con su apoyo, cariño y ayuda desinteresada.

A mi director el Doctor Humberto Escalante por haber creído en mí y en la digestión anaerobia para iniciar este camino científico, por su formación académica y personal. Siempre recordaré sus consejos y analogías que me enseñaron a ver la vida desde otra perspectiva. A pesar del paso de tiempo siempre lo considerare como mi segundo padre.

A la Doctora Carolina Gúzman por enseñarme a ser inconforme y buscar mas allá de lo evidente, por conseguir que una Ingeniera como yo pudiera comprender el mundo de los microorganismos, por su amistad, cariño y comprensión que hicieron más ameno este camino.

A la Doctora Claudia Ortiz por su profesionalismo y exigencia a la hora de analizar y presentar resultados.

Al Doctor Joan Mata por darme la oportunidad de realizar la pasantía en la Universidad de Barcelona, por sus enseñanzas y su amable trato.

A los profesores de la Escuela de Ingeniería Química y de la Escuela de Bacteriología de la UIS por sus enseñanzas y consejos.

A los estudiantes de Ingeniería Química y bacteriología Ximena, Paola, Laura, Sergio, Lily, Johny, Carol, Carlos, Angélica, Sonia, Sergio, Edison, Mayra, Natalia,

Dayana, Lorena, Edwar, Ronald, Viviana (mi mano derecha), Liliana, Arianna, Katherine, Karla, Dally, Norida (La jefesita), Guillermo, Mabel, Andrés, Lucia, Oscar, Ingrid, Alex, Freddy y la nueva integrante Stephanie por la ayuda en la parte experimental, además de pasar días analizando el extraño comportamiento de los microorganismos, también me contagiaron de su alegría y locuras compartimos onces, novenas y hasta fiesta de disfraces.

A mis amigas Viviana, Yeimy, Emilce, Nancy, Diomar y Mireya por ser mis confidentes y cómplices de muchas locuras, por su amistad y palabras de aliento sobre todo en esta última etapa.

A los integrantes del despacho de la UB Silvia, Xavi, Nuria, Sergie, Ana, Oscar, Angel, Antonella, Renato, Bruno, Albert, Violet por permitirme conocer un delta de las culturas catalana, francesa, italiana y brasilera, por compartir sus conocimientos conmigo, por amenizar las horas del almuerzo, por compartir los emocionantes partidos del barsa en casa de Silvia. A pesar de la distancia siempre estarán en mis recuerdos.

A los que fueron mi familia al otro lado del océano Leandro, Gaby, Bosco, Sean (MarN), Ceci, Liliana, Rodrigo, Xime, Paula, Clara por hacerme disfrutar de Barcelona, enviarme a tomar Mate y comer facturas y hacer de mi estancia en Barcelona una experiencia inolvidable.

A Jorge por el ser el confidente y cómplice que algún día fuiste y por regalarme momentos de felicidad que rompían con la cotidianidad del día a día.

A mis hermanitos Lizeth y Andrés por su cariño, paciencia y alegría. Recuerden que “somos los tres hermanitos inseparables”.

A mis padres Ana Yolanda y Héctor, a ustedes les debo lo que ahora soy, este trabajo es para ustedes. Los adoro.

Gracias a todos los mencionados y a aquellos que por el trabajo de la tesis y la nostalgia del momento no los he tenido en cuenta en este escrito, finalmente este logro es compartido.

“La vida solo se puede entender cuando se mira hacia atrás pero hay que vivirla hacia delante”

LILIANA

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
 I. CAPÍTULO: CONSORCIO MICROBIANO PRODUCTOR DE BIOGAS A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE.	
	32
1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	33
1.1.1 Bioquímica de la digestión anaerobia.....	34
1.1.2 Microbiología de la digestión anaerobia	36
1.1.3 Inóculos empleados en digestión anaerobia	38
1.1.4 Actividad hidrolítica.....	39
1.1.5 Actividad metanogénica.....	40
1.1.6 Potencial de biometanización.....	41
1.1.7 Generalidades de las saponinas esteroideas.....	42
1.1.8 Efecto de las saponinas esteroideas sobre la producción de biogás	43
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	44
1.2.1 Inóculos	44
1.2.2 Experimentación.....	45
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
1.3.1 Producción de azúcares reductores totales (ART) a partir de celulosa usando los diferentes inóculos	50
1.3.2 Producción de metano a partir de acetato usando los diferentes inóculos ..	52
1.3.3 Producción de metano a partir del bagazo de fique (BF) usando los diferentes inóculos	52
1.3.4 Evaluación de los parámetros: AH, AME Y PBM	54
1.3.5 Producción de azúcares reductores totales (ART) a partir de celulosa para cada cantidad de saponinas	56
1.3.6 Producción de metano a partir de acetato	58

1.4	CONCLUSIONES.....	60
1.5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
II.	CAPÍTULO: DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE.....	69
2.1	DISEÑO DE DA PARA BAGAZO DE FIQUE	69
2.1.1	Sustrato en la DA	70
2.1.2	Inóculo en la DA	72
2.1.3	RIS (inóculo/sustrato) en DA	73
2.1.4	Temperatura	73
2.1.5	Agitación.....	74
2.1.6	Configuración de biorreactores.....	75
2.2	ESTUDIO EXPERIMENTAL PARA DA DE BF EN OPERACIÓN POR LOTES Y EN CONTINUO	76
2.3	RESULTADOS	84
2.3.1	Caracterización microbiológica del inóculo: LR+LEC.....	84
2.3.2	Operación “Batch”: Influencia de la relación inóculo sustrato y la temperatura sobre el potencial de biometanización del bagazo de fique	85
2.3.3	Operación en continuo	91
2.3.4	Configuración en una y dos fases	95
2.4	CONCLUSIONES.....	101
2.5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
III.	CAPITULO: PRE-TRATAMIENTOS DEL BF PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS.....	111
3.1.	ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	112
3.2.	INCREMENTO DEL RENDIMIENTO DE BIOGÁS MEDIANTE PRE- TRATAMIENTOS.....	114
3.2.1.	Tratamiento mecánico.....	114
3.2.2.	Tratamiento hidrotérmico.....	115
3.2.3.	Tratamiento Oxidativo	116
3.3.	EXPERIMENTACIÓN	117

3.3.1. Pre-tratamientos	117
3.3.2. Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa.....	118
3.3.3. Análisis de difracción rayos x del BF	118
3.3.4. Análisis micrográfico del BF	119
3.3.5. PBM del BF pre-tratado	119
3.4. RESULTADOS	121
3.4.1. Efecto de los pre-tratamientos sobre la estructura lignocelulósica del BF .	121
3.4.2. Efecto de los pre-tratamientos sobre la cristalinidad del BF	123
3.4.3. Resultado de los análisis de micrografías.....	124
3.4.4. Efecto de los pre tratamientos sobre la digestión anaerobia del bagazo de fique	125
3.5. CONCLUSIONES.....	129
3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
IV. CAPITULO ALTERNATIVAS PARA EL APROVECHAMIENTO DEL SUBPRODUCTO GENERADO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE	136
4.1. INTRODUCCIÓN.....	136
4.2. EXPERIMENTACIÓN.....	140
4.2.1. Características microbiológicas y fisicoquímicas del LE.....	141
4.2.2. Proceso de estabilización del LE.....	143
4.2.3. Fertilización del suelo.....	143
4.3. RESULTADOS	145
4.3.1. Estabilización del LE	145
4.3.2. Capacidad del biosólido como fertilizante de suelos	148
4.3.3. Cambios fisicoquímicos del suelo tratado con biosólido.....	150
4.4. CONCLUSIONES.....	152
4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
V. CAPITULO MODELO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS DEL BAGAZO FIQUE	159

5.1. EVOLUCIÓN DE LOS MODELOS CINÉTICOS DE LA DA.....	159
5.2. MODELO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA ADM.....	161
5.3. DESARROLLO DE LA ESTRUCTURA DEL MODELO	163
5.4. Efecto de los pre-tratamientos hidrotérmico, oxidativo y mecánico sobre la cinética de la degradación anaerobia del BF.....	164
5.5. MÉTODOS	171
5.5.1. Implementación del modelo cinético ADM para la DA del BF	171
5.5.2. Validación del modelo	172
5.5.3. Determinación de la constante de desintegración.....	172
5.6. RESULTADOS	174
5.6.1. Efecto de los pre-tratamientos sobre la cinética de biodegradación del BF.....	174
5.7. ESTRUCTURA, DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MODELO	176
5.7.1. Evaluación del efecto de las saponinas esteroideas (<i>Furcraea ssp</i>) sobre la cinética de la acetogénesis-metanogénesis	178
5.8. CONCLUSIONES.....	179
5.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	180
CONCLUSIONES GENERALES	184
ANEXOS.....	186

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. PBM de residuos lignocelulósicos evaluados recientemente.....	25
Figura 1.1 Etapas del proceso de digestión anaerobia	34
Figura 1.2 Principales etapas de la digestión anaerobia y grupos tróficos bacterianos involucrados	36
Figura 1.3 Estructura química de la saponina del BF	42
Figura 1.4 Cinética de producción de Azúcares Reductores [mg/ml] para cada inóculo usando celulosa como sustrato (pH: 7.0, T: 39±2 °C)	50
Figura 1.5 Volumen de metano acumulado (condiciones estándar de presión y temperatura) a partir del acetato usando los diferentes inóculos (pH: 7.0, T: 39±2 °C)	52
Figura 1.6 Producción de metano (condiciones estándar de presión y temperatura) a partir del BF usando los diferentes inóculos (pH: 7.0; T: T: 39±2 °C	53
Figura 1.7 Distribución de medias y medianas de la producción de metano utilizando BF como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1 gSV55	
Figura 1.8 Cinéticas de producción y consumo de ART a diferentes cantidades de saponina	56
Figura 1.9 Actividad hidrolítica de los microorganismos a diferentes cantidades de saponina	57
Figura 1.10 Producción de metano a diferentes cantidades de saponina.....	58
Figura 1.11 Actividad Metanogénica de los microorganismos a diferentes cantidades de saponina	59
Figura 2.1 Esquema del reactor anaerobio de 23 l	81
Figura 2.2 Recuento de los grupos tróficos del inóculo (mezcla de LR+LEC) por la técnica del NMP*	84
Figura 2.3 Producción de metano a diferentes temperaturas para cada RIS evaluada.	87

Figura 2.4 Variación de pH y relación AGVT/AT durante el tiempo de digestión a diferentes temperaturas para cada RIS evaluada.....	88
Figure 2.5 Diagrama de Pareto: Efecto de la temperatura y la RIS sobre el volumen de metano.	89
Figura 2.6 Efecto de la temperatura sobre el PBM del bagazo de fique	90
Figura 2.7 Rendimientos de metano de diferentes sustratos lignocelulósicos expresados en kwh/kg SV adicionado	90
Figura 2.8 Variación de los ART y los AGV durante el tiempo de operación.	91
Figura 2.9 a) Variación del pH durante el tiempo de digestión; b) Variación del ratio AGVT/AT durante el tiempo de digestión.....	93
Figura 2.10 Dinámica del crecimiento microbiano en operación continua	94
Figura 2.11 Volumen diario de biogás producido a partir del bagazo de fique	95
Figura 2.12 Variación de AGVT y pH para la fase A y para el proceso convencional	97
Figura 2.13 Producción de metano para cada uno de los reactores evaluados	98
Figura 2.14 Evaluación de la estabilidad de los reactores fase B y convencional: a) pH ; b) Ratio AGV/AT.....	100
Figura 2.15 Comparación de la producción de metano en un proceso convencional y un proceso en dos fases	100
Figura 3.1 Diagrama general del proceso para cada pre-tratamiento evaluado ..	120
Figura 3.2 Composición porcentual de la estructura lignocelulósica del BF tratado y sin tratar	121
Figura 3.3 Cambio en el pH durante el tiempo de reacción del pre tratamiento oxidativo.....	122
Figura 3.4 Difractograma rayos X del BF tratado y sin tratar	123
Figura 3.5 Micrografías del BF. A: Tratamiento hidrotérmico; B: Tratamiento oxidativo; C: Tratamiento mecánico; D: BF sin tratar.....	125
Figura 3.6 Efecto de los pre-tratamientos sobre las cinéticas de consumo de ART y AGVT.	126
Figura 4.1 Etapas metodológicas para el aprovechamiento del lodo efluente	141

Figura 4.2.Variación del pH durante la Estabilización Alcalina de LE	146
Figura 4.3. Crecimiento de plántulas de pasto alpiste en tierra abonada con Biosólido	149
Figura 4.4. Distribución de medias para el crecimiento de las plantas durante el ensayo.	150
Figura 5.1 Procesos bioquímicos de ADM (Parker, 2005)	163
Figura 5.2 Algoritmo de desarrollo del modelo AMD para la DA del BF	164
Figura 5.3 Esquema de Matlab/Simulink (Astals <i>et al.</i> , 2011).....	172

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 0 Clasificación taxonómica del fique.....	22
Tabla 0.1 Caracterización fisicoquímica del bagazo de fique	24
Tabla 1.1 Reacciones Bioquímicas que ocurren durante la digestión anaerobia ..	36
Tabla 1.2 Productos metabólicos de las bacterias hidrolíticas	37
Tabla 1.3 Caracterización Fisicoquímica de los inóculos evaluados	45
Tabla 1.4 AH, AME de los inóculos y PBM de BF	54
Tabla 2.1 Potencial de biometanización de diferentes residuos	71
Tabla 2.2 Características Fisicoquímicas del inóculo LR-LEC	77
Tabla 2.3 Características principales de NMP de acuerdo con los grupos tróficos	78
Tabla 2.4 Diseño factorial del efecto de la RIS y la temperatura sobre la producción de metano a partir de BF	79
Tabla 2.5 Condiciones de operación proceso en continuo	81
Tabla 2.6 Condiciones de operación para biorreactor de DA en proceso convencional y por fases.	83
Tabla 2.7 Rendimiento de metano del BF a diferentes RIS y temperaturas	86
Tabla 3.1 Composición de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos*.....	112
Tabla 3.2 Índice de cristalinidad (CrI) del BF tratado y sin tratar	123
Tabla 3.3 Efecto de los pre tratamientos sobre el PBM	128
Tabla 4.1 Caracterización microbiológica del LE.....	142
Tabla 4.2. Características fisicoquímicas del LE	142
Tabla 4.3. Dosificación de Ca(OH) ₂ para la estabilización de LE	143
Tabla 4.4 Características de la tierra utilizada en el experimento	144
Tabla 4.5. Dosis de “biosólido” aplicada a un suelo destinado a cultivo de pasto alpiste.	144
Tabla 4.6. Comparación de las características fisicoquímicas del LE y biosólido	147

Tabla 4.7. Indicadores de degradación de la materia orgánica.	148
Tabla 4.8. Germinación de las plántulas de pasto alpiste	149
Tabla 4.9. Cambios fisicoquímicos del suelo tratado con biosólido.....	151
Tabla 5.1 Ejemplos de modelos cinéticos de DA.....	161
Tabla 5.2 Matriz de Petersen.....	165
Tabla 5.3 Variables de consideradas en el modelo (Galí <i>et al.</i> , 2009)	167
Tabla 5.4 Parámetros estequiométricos (Batstone <i>et al.</i> , 2002).....	168
Tabla 5.5 Parámetros cinéticos a condiciones mesófilas (Batstone <i>et al.</i> , 2002)	169
Tabla 5.6 Términos individuales de inhibición (Batstone <i>et al.</i> , 2002)	170
Tabla 5.7 Caracterización fisicoquímica del BF tratado y sin tratar	174
Tabla 5.8 Fracciones de DQO del BF particulado	175
Tabla 5.9 Constantes de desintegración del BF tratado y sin tratar	176

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: REGISTRO FOTOGRÁFICO	186

TÍTULO: PROCESO INTEGRAL PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE*

AUTOR: Liliana del Pilar Castro Molano**

PALABRAS CLAVES: Bagazo de fique, residuo lignocelulósico, digestión anaerobia, líquido ruminal, lodo estiércol de cerdo.

El bagazo de fique es vertido al suelo ocasionando un problema ambiental. La caracterización fisicoquímica de esta biomasa residual mostró que contenía 41,81% de celulosa, 22,17% hemicelulosa, 15,56% lignina, una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 26, y otros compuestos orgánicos que lo hacen un sustrato atractivo para procesos de digestión anaerobia. Este bioproceso se limita debido a la presencia de lignina y saponina en la estructura del bagazo. La investigación se centró en la identificación de un consorcio microbiano con alta actividad hidrolítica y metanogénica; el estudio del efecto de la lignina y de la saponina en la producción de biogás; el desarrollo de la producción de metano con las mejores condiciones de operación y un modelo cinético que describa el proceso de metanización. Lo anterior contempla el análisis de corrientes de entrada (sustrato e inóculo) y de salida (biogás y lodo efluente).

Como resultados, se identificó que la mezcla de líquido ruminal y lodo estiércol de cerdo degrada el bagazo de fique. Se demostró que las saponinas esteroideas a bajas concentraciones estimulan la actividad hidrolítica y metanogénica del inóculo seleccionado. La máxima producción de metano ($0.30 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ adicionado) se obtuvo cuando el proceso se llevó a cabo con una relación inóculo sustrato de 1.3 en rango mesófilo. Durante la operación en continuo se alcanzó una conversión a metano de $1.30 \text{ l biogás/l reactor} \cdot \text{día}$ a temperatura ambiente (21°C). En cuanto a la alteración de la estructura lignocelulósica, el pre-tratamiento hidrotérmico mejoró la producción de metano en un 30% comparado con el bagazo sin tratar. Finalmente, la implementación del modelo ADM permitió describir paso a paso la etapa de desintegración del bagazo de fique.

*Tesis para optar el título de Doctor en Ingeniería Química

**Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química. Director: Prof. Humberto Escalante, Ph. D. Co directoras: Prof. Carolina Guzmán, Ph. D., Prof. Claudia Ortíz, Ph. D.

TÍTULO: INTEGRAL PROCESS FOR ANAEROBIC DIGESTION FROM FIQUE'S BAGASSE *

AUTHOR: Liliana del Pilar Castro Molano**

KEYWORDS: Fique's bagasse, lignocellulosic waste, anaerobic digestion, ruminal liquid, pig manure sludge.

Fique's bagasse is disposed into soil causing pollution. Physico-chemical characterization of this residual biomass contains cellulose: 41,81%, hemicellulose: 22,17%, lignin: 15,56%, ratio carbon/nitrogen (C/N): 26 and other organic compounds suitable for anaerobic digestion. The bioprocess in mention is limited by high lignin content and saponins concentration in the substrate. The aim of this research was to identify a microbial consortium with high hydrolytic and methanogenic activity; study of lignin and saponins effect on biogas production; enhancement of operational conditions on anaerobic digestion from fique's bagasse; development of kinetic model to describe the metanization process. It contains the analysis of in (substrate and inoculum) and out (biogás and effluent) streams of the process.

It was identify a mixture of ruminal liquid and pig manure sludge capable for fique's bagasse degradation. It was shown that low concentrations of steroidal saponins increase hydrolytic and methanogenic activity of the inoculum. The highest methane production ($0.30 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV add}$) was obtained with an inoculum-substrate ratio of 1.3 at the mesophilic range. In continuous operation mode, it was achieved $1.30 \text{ l biogas/l reactor*day}$ at (21°C). Respect to lignocellulosic structure changes, hydrotermic pre-treatment improves methane yields in 30% in comparison with untreated bagasse. Finally, ADM model describes step to step fique's bagasse disintegration.

*Thesis to obtain the degree of Doctor in Chemical Engineering.

**Faculty of Physical-chemical Engineering, Departament of Chemical Engineering. Director: Prof. Humberto Escalante, Ph. D. Co directoras: Prof Carolina Guzmán, Ph. D., Prof Claudia Ortiz, Ph. D

ABREVIATURAS

ADM: *Anaerobic Digestion Model*

AGVT: Ácidos Grasos Volátiles
Totales

AH: Actividad Hidrolítica

ART: Azúcares Reductores Totales

AT: Alcalinidad Total

BAS: Bacterias anaerobias estrictas

BF: Bagazo de Fique

BFG: Bacterias fermentadoras de
glucosa

BFL: Bacterias fermentadoras de
lactato

BMA: Bacterias metanogénicas
acetoclásticas

BMH: Bacterias metanogénicas
hidrogenofílicas

BMM: Bacterias metanogénicas del
metanol

BSRA: Bacterias sulfatoreductoras
del acetato

BSR: Bacterias sulfatoreductoras

CrI: Índice de cristalinidad de
celulosa

DA: Digestión anaerobia

DCM: Dinámica del crecimiento
microbiano

DQO: Demanda Química de Oxígeno

EB: Estiércol Bovino

FDA: Fibra Detergente Ácida

HMF: Hidroximetil furfural

LE: Lodo Efluente

LEC: Lodo Estiércol de Cerdo

LR: Líquido Ruminal

LPTAR: Lodo planta de tratamiento
de aguas residuales

NMP: Número más probable

PDA: *Photo Diode Array*

PBM: Potencial de Biometanización

RA: Reactor Acidogénico

RC: Reactor convencional

RIS: Relación inóculo sustrato

RM: Reactor Metanogénico

SMP: *Specific methane production*

ST: Sólidos Totales

SV: Sólidos Volátiles

SF: Sólidos Fijos

UI: Unidad internacional

INTRODUCCIÓN

El fique es una planta xerófila originaria de América tropical, que pertenece a la familia *Agavaceae*. (Tabla 0). México, Brasil, Bangladesh, India, China, Tailandia y Tanzania cultivan industrialmente sisal y henequén; plantas que pertenecen a la familia del fique. La importancia del cultivo de las plantas *Agavaceae* radica en que a partir del beneficio de sus hojas se extraen fibras utilizadas para fabricar cordeles, hamacas, redes, empaques, artesanías, sogas, agromantos y geotextiles. (Finagro 2011; Centro regional de estudios económicos, 2004).

Tabla 0 Clasificación taxonómica del fique

Categoría taxonómica	Clasificación
Dominio	Eucharya
Subdominio	plantae
Phylum	Spermatophyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Monocotyledonea
Orden	Liliflorae
Familia	Agavaceae
Género	<i>Furcraea</i>
Nombre común	Fique, cabuya, penca, fique perulero, maguey, cabui, cabuya blanca, chuchao, cocuiza.

Fuente: Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, 2006

El proceso de beneficio de la planta del fique conlleva a) cortar y desorillar las hojas, b) extraer la fibra, haciendo pasar las hojas por una desfibradora y c) finalmente lavar y secar la fibra para su comercialización. La fibra constituye entre un 3 a 5% en peso de la hoja; el restante 95 a 97% está formado por una pulpa residual compuesta de bagazo y jugo. Actualmente, los residuos del proceso de beneficio del fique están siendo descartados al ambiente ocasionando problemas de contaminación en cuerpos de agua (superficial y/o subterránea) y atracción de vectores debido a su composición orgánica (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2004).

Una opción para disminuir la contaminación ambiental ocasionada por los subproductos de la industria del fique, es tratarlos (mediante procesos físicos y /o químicos y biológicos) con el fin de darles un valor agregado.

Colombia en las últimas décadas ha direccionado la investigación biotecnológica hacia la búsqueda de fuentes alternas de energía, con el fin de mitigar en parte el efecto contaminante del uso de combustibles fósiles. La selección de una biomasa como fuente alterna de energía, depende de la oferta del residuo y de sus características fisicoquímicas; las cuales determinan la tecnología más idónea para su aprovechamiento.

En el caso de la disponibilidad de bagazo de fique, en Colombia existen 20 mil hectáreas sembradas con plantas (distribuidas en los departamentos de Cauca, Nariño, Antioquia, Santander y Boyacá), con un rendimiento anual de 12.5 t/ha de fibra, las cuales generan alrededor de 0.9 t/ha de bagazo y 4.5 t/ha de jugo (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2009).

Las características fisicoquímicas del bagazo de fique (Tabla 0.1) indican que este residuo posee una fracción soluble (carbohidratos no estructurados y ácidos grasos volátiles) y una fracción particulada (celulosa, hemicelulosa, proteínas y lípidos) que permite considerarlo como una fuente de biomasa residual de tipo lignocelulósico. Las alternativas tecnológicas, para el aprovechamiento energético de las biomásas lignocelulósicas, están direccionadas preferencialmente hacia la digestión anaerobia. Residuos con características similares al bagazo de fique, como el sisal, ensilado de maíz y ensilado de pasto, entre otros, han dado excelentes resultados al ser utilizados como sustratos para la producción de biogás, generando rendimientos de 0.32 m³ CH₄/kg SV adicionado, 0.36 m³ CH₄/kg SV adicionado y 0.6 m³ CH₄/kg SV, respectivamente (Mshandete *et al.*, 2004; Amon *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Tabla 0.1 Caracterización fisicoquímica del bagazo de fique

Parámetro	Método	Unidades	Valor
pH			4
ST	Gravimetrico	gST kg ⁻¹	195
SV	Gravimetrico	gSV kg ⁻¹	163
DQO	Volumetrico	g O ₂ kg ⁻¹ ST	1230
Alcalinidad Total	Titulación	mgCaCO ₃ /L	3300
AGVT	Titulación	g AGV kg ⁻¹ ST	48.1
Proteínas	Kjeldahl	g kg ⁻¹ ST	43.8
Lípidos	Soxhlet	g kg ⁻¹ ST	41.3
Holocelulosa	Van Soest	g kg ⁻¹ ST	639.8
Carbohidratos	Van Soest	g kg ⁻¹ ST	69.4
Lignina	Van Soest	g kg ⁻¹ ST	157.6
C	Walkey Black	% p/p	35.58
H	Análisis elemental	% p/p	6.02
O	Análisis elemental	% p/p	47.44
N	Kjeldahl	% p/p	1.32
C/N		% p/p	26.9
Sulfuros	Turbidimetría	% p/p	0.006
Poder calorífico	Calorimetría	kJ kg ⁻¹	13799.16
Fórmula empírica		C₃₃H₆₇O₃₃N₁	

Fuente: El Autor

Una de las principales variables a considerar para el aprovechamiento de una biomasa mediante digestión anaerobia es la relación C/N. El rango óptimo de la relación C/N recomendado en la literatura para el crecimiento de consorcios microbianos en sistemas anaerobios es aproximadamente de 25/1. Sin embargo, la digestión de rastrojo de maíz y la co digestión de cebolla y lodo digerido se ha llevado a cabo satisfactoriamente manteniendo una relación de C/N entre 15 y 18 (Li *et al.*, 2011). Por consiguiente dado que el bagazo de fique posee una relación C/N de 26.9, implica que este residuo tiene una composición apropiada para el arranque y estabilización de un proceso de digestión anaerobia.

En cuanto al poder calórico, el bagazo de fique contiene 3298 kcal/kg, el cual es bastante similar a otras biomásas residuales utilizadas actualmente como fuentes

alternas de energía. Por ejemplo, los residuos de oliva tienen un poder calorífico de 4240 kcal/kg y pueden llegar a producir 54.26 l de biogás /l de sustrato (Fernández, 2006; Fezzani & Cheikh, 2010). Los residuos de aceite de girasol tiene un poder calórico de 3700 kcal/kg, a partir de los cuales, se obtiene 0.20 l CH₄/kg SV mediante digestión anaerobia (Galí, *et al.*, 2009; Fernández, 2006). Es de destacar que el bagazo de fique posee un bajo contenido de azufre y cenizas que aumenta la calidad energética de este residuo con respecto a los combustibles fósiles.

El análisis fisicoquímico del bagazo de fique indica que este residuo posee características idóneas para aplicarle la tecnología de digestión anaerobia y obtener biogás. El creciente interés por la producción de metano a partir de residuos agro-industriales se evidencia por las recientes investigaciones donde se demuestra el alto potencial de biometanización (PBM) que poseen los desechos agro-industriales (Figura 1).

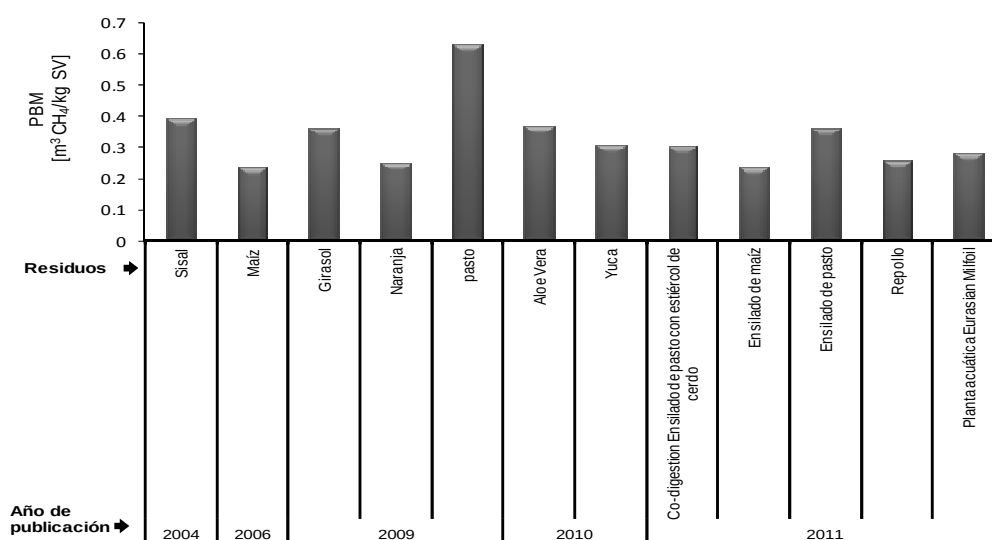


Figura 1. PBM de residuos lignocelulósicos evaluados recientemente

Fuente: Mshandete *et al.*, 2004; Raposo *et al.*, 2006; Raposo *et al.*, 2009; Galí *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Panichnumsin *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2011; Asam *et al.*, 2011.

En un bioproceso de digestión anaerobia, la materia orgánica disponible para ser degradada, aporta a los consorcios microbianos la fuente de carbono y a su vez, la fuente de energía. La digestión anaerobia permite hacer un aprovechamiento energético de los residuos agrícolas, dado que maximiza el reciclaje de nutrientes como nitrógeno y fósforo; estabiliza el residuo; disminuye su impacto ambiental (reducción de olores y emisiones de efecto invernadero) y presenta un bajo costo operacional, dando lugar a un balance de energía positivo (Ward *et al.*, 2008; Jingura & Matengaifa, 2009).

La producción de biogás a partir de un residuo lignocelulósico, como es el caso del bagazo de fique, involucra un proceso integral de DA que contemple el análisis de las corrientes de entrada (sustrato e inóculo) así como las corrientes de salida (biogás y lodo efluente).

A la fecha un gran número de plantas para la DA, a escala industrial, utilizan consorcios microbianos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; Lettinga *et al.*, 2001; Carrhá *et al.*, 2006). Sin embargo, para el caso estudio de esta tesis, al tratarse de un residuo lignocelulósico difícil de degradar, se requiere un consorcio microbiano con alta actividad hidrolítica y metanogénica que actúe en sintrofía durante las etapas de la degradación de materia orgánica.

Por otra parte, los consorcios de microorganismos pueden ser inhibidos por algún tipo de compuesto presente en un sustrato. En el caso del bagazo de fique, el residuo está impregnado de saponinas procedentes del jugo residual del proceso de beneficio. Las saponinas pueden ocasionar perturbación sobre el proceso metabólico del consorcio o sobre la viabilidad de la digestión anaerobia, causando un desbalance poblacional y por consiguiente, una disminución del producto final: el metano, estos resultados son presentados y discutidos en el capítulo 1.

El proceso de digestión anaerobia puede ser llevado en reactores en operación por lotes o continuo; con una configuración de una fase o de dos fases. Asimismo, se pueden realizar diferentes combinaciones para optimizar los rendimientos de la producción de metano. Cada configuración presenta ventajas y desventajas en su utilización. La operación de digestión anaerobia por lotes alcanza conversiones de materia orgánica a metano entre el 40 y el 70%. No obstante, la producción de metano es irregular y discontinua. Los digestores en continuo se caracterizan por su simplicidad en el diseño y operación, sin embargo, su alta producción de AGV de cadena larga, ocasiona una rápida acidificación que puede repercutir en los rendimientos de metano. Las ventajas de llevar a cabo la operación en una fase son la simplicidad del diseño y el bajo costo operacional. Esta operación requiere de altos tiempos de retención hidráulico comparado con la configuración en dos fases, por lo anterior en el capítulo dos se presenta un estudio de las mejores condiciones de operación (temperatura, relación inóculo/sustrato, agitación) para producir un alto contenido de biogás, a partir del bagazo, tanto en operación por lotes como en continuo.

Dado que la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos es la etapa limitante de la degradación anaerobia, una de las alternativas para optimizar el proceso son los pre-tratamientos físicos, químicos y/o biológicos que permitan aprovechar los azúcares contenidos en la celulosa y la hemicelulosa. En el capítulo tres se describen tres alternativas de pre tratamientos al bagazo de fique (hidrotérmico, reducción de tamaño y adición de peróxido alcalinizado) para mejorar los rendimientos de producción de biogás.

Las alternativas de aprovechamiento del lodo efluente generado durante la producción de biogás a partir del bagazo de fique son discutidas en el capítulo cuatro.

La producción de metano, como proceso productivo a escala industrial a partir del bagazo de fique, requiere un modelo que describa la cinética del bioproceso, como una función de la incidencia que tienen los pre-tratamientos sobre la velocidad de desintegración de un sustrato complejo como el bagazo de fique. En el capítulo cinco se presenta el desarrollo del modelo ADM1 modificado que describe los procesos bioquímicos y fisicoquímicos que ocurren durante la biodegradación anaerobia del bagazo de fique.

Durante el desarrollo de esta tesis se investigaron aspectos microbiológicos, químicos e ingenieriles que permiten un entendimiento integral del proceso de digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos y particularmente conducen al aprovechamiento integral del bagazo de fique como fuente energética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA A.; DAS K.C.; BALAGURUSAMY N. "*Biochemical methane potential of Desert plants: aloe vera and Opuntia robusta in comarca Lagunera, México*". En Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste Venice, Italy; 8 November 2010.

AMON T.; AMON B.; KRYVORUCHKO V.; ZOLLITSCH W.; MAYER K.; GRUBER L. "*Biogas production from maize and dairy cattle manure—Influence of biomass composition on the methane yield*". *Agr.Ecosyst. Environ.*, 118, 2007, 173-182.

ASAM Z.; POULSEN G.; NIZAMI A.; RAFIQUE R.; KIELY G.; MURPHY J. "*How can we improve biomethane production per unit of feedstock in biogas plants?*". *Appl energ.*, 88, 2011, 2013-2018.

CARRHÁ R.; CORNELIUS A.; ZEEMAN G.; LETTINGA G. "*The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems*". *Bioresource Technol.*, 97, 2006, 1105–1118.

CENTRO REGIONAL DE ESTUDIOS ECONÓMICOS, "*El cultivo del fique en el departamento de Santander*", Bucaramanga, Colombia, 2004.

FERNÁNDEZ J. "*Los residuos de las agroindustrias como biocombustibles sólidos (I)*". *Vida rural.*, 15, 2006, 14-18.

FEZZANI B.; BEN R. "*Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature*" *Bioresource Technol.*, 101, 2010, 1628-1634.

FINAGRO. "Fique. Producción y zonas de producción". Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Diciembre 1 de 2011, Disponible: http://www.finagro.com.co/html/l_portals/index.php.

GALÍ A.; BENABDALLAH T.; ASTALS S.; MATA-ALVAREZ J. "*Modified version of ADM1 model for agro-waste application*". Bioresource Technol., 100, 2009, 2783–2790.

JINGURA R.M.; MATENGAIFA R. "*Optimization of biogas production by anaerobic digestion for sustainable energy development in Zimbabwe*". Renew sust energ rev., 13 (5), 2009, 1116-1120.

LETTINGA G.; REBAC S.; ZEEMAN G. "*Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment*". Trends in Biotechnol., 19, 2001, 363-370

LI Y.; PARK S.Y.; ZHU J. "*Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste*". Renew sust energ rev., 15, 2011, 821–826.

LIU G.; ZHANG R.; EL-MASHAD H.M.; DONG R. "*Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes*". Bioresource Technol., 100, 2009, 5103–5108.

MATA-ALVAREZ J.; MACÉ S.; LLABRÉS P. "*Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives*". Bioresource. Technol., 2000, 74, 3-16.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL MADR. Acuerdo para el Fomento de la Producción y la Competitividad del Subsector del Fique. Primera edición. Bogotá D.C., Colombia, 2004.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Anuario Estadístico del sector Agropecuario y Pesquero 2009. Bogotá. D.C.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Ministerio nacional de planeación. Guía ambiental del subsector fiquero. 2006.

MSHANDETE A.; KIVAIISI A.; MUGASSA R.; BO M. "*Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes*". Bioresource Technol., 951, 2004, 19-24.

PANICHNUMSIN P.; NOPHARATANA A.; AHRING B.; CHAIPRASERT P. "*Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure*". Biomass Bioenerg., 34, 2010, 1117-1124.

RAPOSO F.; BANKS C.J.; SIEGERT I.; HEAVEN S.; BORJA R. "*Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests*". Process biochem.; 41, 2006, 444–1450.

RAPOSO F.; BORJA R.; MARTÍN M.A.; MARTÍN A.; DE LA RUBIA M.A.; RINCÓN B. "*Influence of inoculum-substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation*". Chem Eng J., 2009, 149, 70-77.

WARD A.J.; HOBBS P.J.; HOLLIMAN P.J.; JONES D.L. "*Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources*". Bioresource Technol., 99, 2008, 7928–7940.

XIE S.; LAWLOR P.G.; FROST J.P.; HU Z.; ZHAN X. "*Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage*". Bioresource Technol., 102, 2011, 5728.

I. CAPÍTULO: CONSORCIO MICROBIANO PRODUCTOR DE BIOGAS A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE

La eficiente degradación anaerobia de un sustrato requiere de consorcios microbianos con alta actividad hidrolítica y metanogénica. Particularmente, la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (compuestos formados por lignina, celulosa y hemicelulosa) como el bagazo de fique (BF), es lenta e incompleta debido a que la degradación depende de su estructura y de su composición (Tong & McCarty, 1991). Por lo tanto para la digestión de este tipo de sustratos se han usado enzimas celulolíticas obtenidas a partir de microorganismos aislados o en consorcios de hongos y/o bacterias con alta eficiencia celulolítica (Sleat & Mah, 1987; (Silva *et al.*, 2004; Kumar, 2008; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

La producción de biogás es llevada a cabo por diferentes fuentes de consorcios microbianos incluyendo lodos anaerobios provenientes de plantas de aguas residuales (PTAR), líquido ruminal, estiércol de bovino o porcino y cultivo puro de microorganismos entre otros (Mshandete *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; O'Sullivan *et al.*, 2006; Amon *et al.*, 2007; Panichnumsin *et al.*, 2010).

Por otra parte, el fique produce metabolitos secundarios como las saponinas esteroidales, que actúan como defensa a la actividad microbiana. Estos compuestos quedan incorporados tanto en el jugo como en el bagazo después del proceso de beneficio (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2006).

Dado que el BF es empleado como sustrato para la producción de biogás, las saponinas podrían afectar la actividad metabólica de los consorcios microbianos disminuyendo los rendimientos de la producción de biogás.

En este capítulo, se estudió la capacidad de siete consorcios microbianos procedentes de diversas fuentes para mejorar el arranque de reactores anaerobios

utilizando BF como sustrato. Para este propósito, se evaluaron los inóculos: Líquido ruminal (LR), estiércol bovino (EB), lodo estiércol de cerdo (LEC), lodo de plantas de tratamiento de aguas residuales (LPTAR) y la mezcla de cada uno de ellos con LR. La actividad hidrolítica (AH), actividad metanogénica específica (AME) y potencial de biometanización (PBM) fueron medidos como variables de respuesta para seleccionar el mejor consorcio microbiano para la degradación del BF.

De igual forma, se evaluó la incidencia de las saponinas esteroideas (*Furcraea* ssp) sobre la actividad hidrolítica y metanogénica del inóculo seleccionado previamente.

1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico que descompone la materia orgánica, empleando un consorcio microbiano sensible o completamente inhibido por el oxígeno; produciendo un compuesto denominado biogás (mezcla de metano y dióxido de carbono). Como subproducto de la fermentación anaerobia se genera un lodo efluente debido al sustrato no degradado y a la muerte o lisis de los microorganismos involucrados en el bioproceso.

Durante la DA más del 90% de la energía disponible por oxidación directa se transforma en metano, consumiéndose sólo un 10% de la energía en crecimiento bacteriano (Mata-Alvarez, 2003; Kumar, 2008). El proceso de DA ofrece la posibilidad de reciclar nutrientes como nitrógeno y fósforo contenidos en el lodo efluente para ser aplicados en los suelos como biofertilizantes y reemplazar los fertilizantes artificiales (Fernández *et al.*, 2009). Entre las ventajas que presenta el proceso de degradación anaerobia se encuentran la reducción del impacto ambiental (reducción de emisiones de efecto invernadero y reducción de olores),

la baja producción de lodo effluente, la no utilización de compuestos químicos, el bajo costo operacional y un balance de energía positivo (Ward *et al.*, 2008).

1.1.1 Bioquímica de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico complejo que involucra cuatro etapas: a) la hidrólisis de las macromoléculas como polisacáridos, lípidos y proteínas b) la acidogénesis de los monómeros, c) la acetogénesis y d) la metanogénesis (Figura 1.1). Estas etapas son realizadas por consorcios microbianos conformados por diferentes poblaciones de microorganismos que pueden utilizar variedad de sustratos y que actúan en sintrofía. Los productos generados en una etapa constituyen el sustrato de otra, con lo cual el trabajo sinérgico de los grupos tróficos lleva a añadir la energía necesaria para mantener las células y además de liberar productos de gran interés industrial (Kumar, 2008).

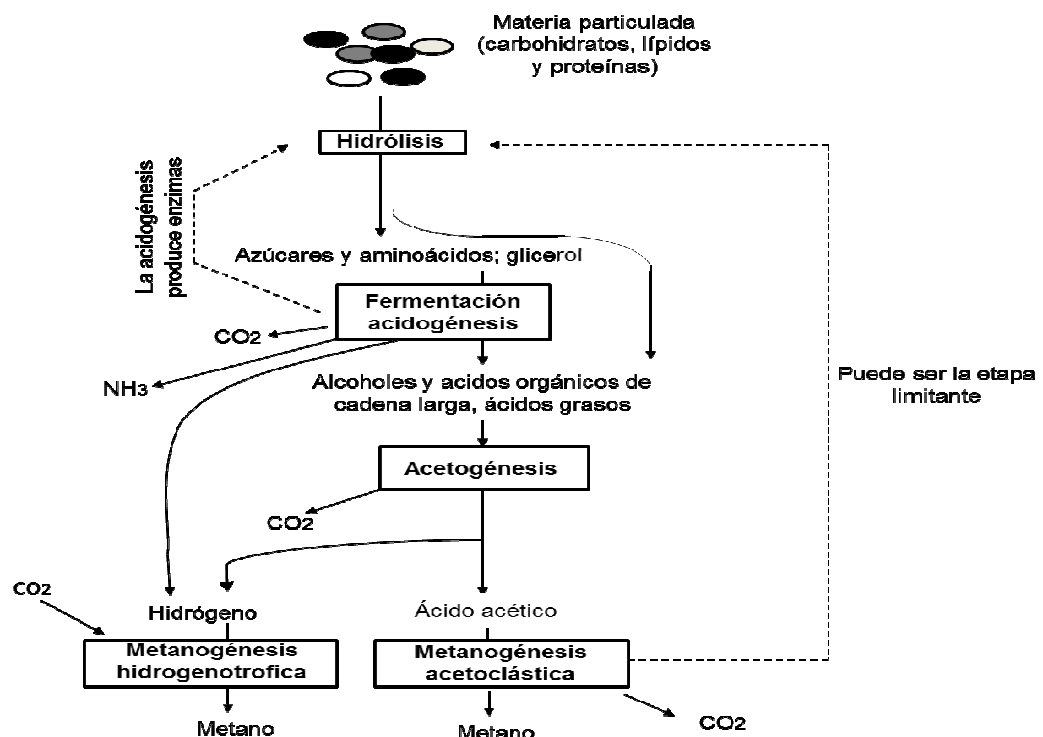


Figura 1.1 Etapas del proceso de digestión anaerobia
Fuente: (Angelidaki *et al.*, 2011)

La **Hidrólisis** es el primer paso para la digestión anaerobia debido a que la materia orgánica, compuesta de moléculas complejas, debe ser degradada a compuestos más simples que puedan ser metabolizados por los microorganismos. Las bacterias que participan en esta etapa son las hidrolíticas, que producen ácido acético, compuestos monocarbonados, ácidos grasos orgánicos y otros compuestos policarbonados. En esta etapa las bacterias, actúan sobre sustratos tales como celulosa, almidón, proteínas y grasas, transformándolos por hidrólisis en compuestos orgánicos solubles. De esta forma los carbohidratos se convierten en azúcares simples, las grasas en ácidos grasos y glicerol y las proteínas se hidrolizan hasta péptidos y aminoácidos, liberando dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2) (Appels *et al.*, 2008).

La etapa hidrolítica es compleja y se lleva a cabo mediante enzimas extracelulares. Estas enzimas pueden estar adheridas a la célula del microorganismo o secretarse al medio. Generalmente la hidrólisis se conoce como la etapa limitante de la degradación de la materia orgánica particulada (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

En la etapa de **Acidogénesis**, los monosacáridos producidos en la etapa anterior son convertidos en ácidos orgánicos tipo acetato, propionato, butirato, valerato, y CO_2 e H_2 .

La tercera etapa es la **Acetogénesis**, en la que se genera acetato mayoritariamente, H_2 y CO_2 . La **Metanogénesis** es el paso final, donde actúa el consorcio metanogénico utilizando el acetato para producir gas metano (CH_4) y CO_2 principalmente (Gerardi, 2003).

Las principales reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el proceso de digestión anaerobia se presentan en la Tabla 1.1. Se observa que algunas

reacciones no ocurren de forma espontánea y sin embargo se ven favorecidas por la syntrofia que existe entre los microorganismos.

Tabla 1.1 Reacciones Bioquímicas que ocurren durante la digestión anaerobia

Reacción	Ecuación	ΔG^0 [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

Fuente: (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

1.1.2 Microbiología de la digestión anaerobia

En la Figura 1.2 se esquematizan las etapas y reacciones metabólicas de la digestión anaerobia.

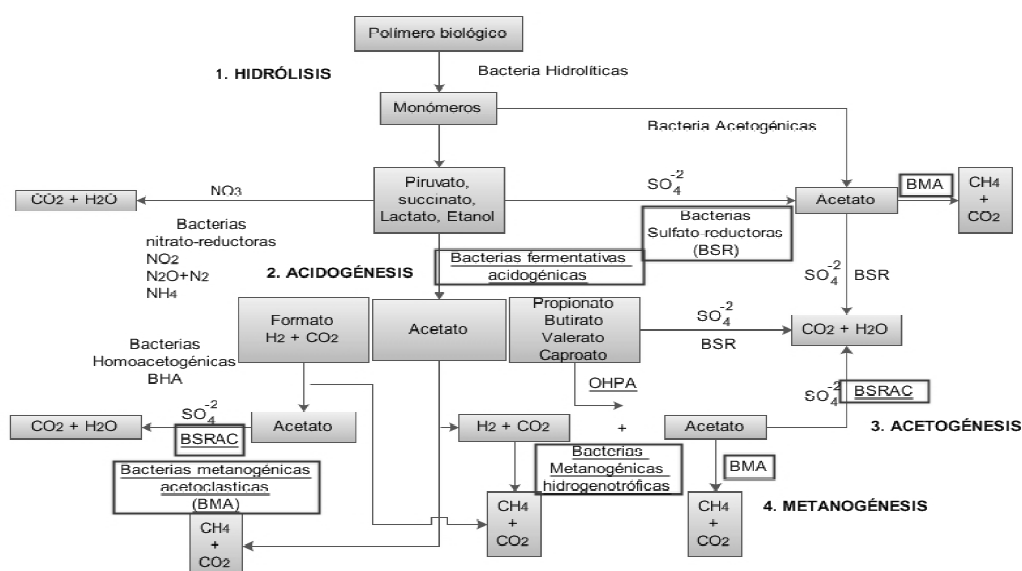


Figura 1.2 Principales etapas de la digestión anaerobia y grupos tróficos bacterianos involucrados
Fuente: (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

Fuente: El Autor

Durante el desarrollo de la DA intervienen tres grupos de bacterias: a) Bacterias fermentativas-hidrolíticas, b) Bacterias acetogénicas y c) Bacterias metanogénicas. El primer grupo está representado por los géneros *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Sleat & Mah, 1987). De igual forma se encuentran bacterias celulolíticas como *Celomonas*, *Microbispora* y *Streptomyces* que pueden producir celulasas que hidrolizan eficientemente biomasa lignocelulósica (Li *et al.*, 2011). En la Tabla 1.2 se detallan productos de la fermentación de algunas bacterias hidrolíticas.

Tabla 1.2 Productos metabólicos de las bacterias hidrolíticas

Género	Fuente	Sustrato	Productos*
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Rumen	Celulosa	F, A, S
		Celulosa	F,L, H ₂ , CO ₂
<i>Bacteroides fibrisolvens</i>	Rumen	Hemicelulosa	F,B,L, H ₂ , CO ₂
		Pectina	F,A,B,L,M,H ₂ ,CO ₂
<i>Bacteroides rumenicola</i>	Rumen	Hemicelulosa	F, A,P,S
		Pectina	F,A,P,B,L,S
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Rumen	Celulosa	F,A,S,H ₂ ,CO ₂
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Rumen	Celulosa	F,A,L,E, CO ₂
Rumen spirochetes	Rumen	Pectina	F, A, M
Rumen treponemes	Rumen	Pectina	F,A,S,M
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Digestor	Celulosa	A,E,H ₂ ,CO ₂
<i>Clostridium thermocellum</i>	Digestor	Celulosa	A,E,H ₂ ,CO ₂
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Laguna de estabilización	Celulosa	F,A,L,E
<i>Clostridium butyricum</i>	Laguna de estabilización	Pectina	A,B,M,E, H ₂ , CO ₂

*F=Formato; A=Acetato; P=Propionato; B=Butirato; S=Succionato; L=Lactato; M=Metanol; E=Etanol.

Fuente: Sleat & Mah, 1987

Para que tenga lugar una eficiente metanogénesis, los productos de fermentación como el propionato y el butirato deben ser oxidados a acetato, CO₂, e H₂. Esta oxidación es llevada a cabo por el segundo grupo de bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA). La producción de acetato por las OHPA es termodinámicamente desfavorable a menos que la presión parcial de

hidrógeno se mantenga por debajo de 10^{-3} atm gracias a la eficiente remoción de hidrógeno por bacterias metanogénicas hidrogenofílicas, las cuales utilizan el H_2 y CO_2 y producen metano.

Los microorganismos implicados en la generación de metano a partir del acetato son bacterias denominadas metanogénicas acetoclásticas y representan el 72% de la producción total del metano. En presencia de sulfatos las bacterias acetogénicas y metanogénicas compiten con las bacterias sulfatorreductoras (BSR) por sustratos como los ácidos, H_2 , lactato, y etanol. Las BSR oxidan el butirato, el propionato y el lactato sin producir hidrógeno, el cual es indispensable para la producción de metano a partir de las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas (Gerardi, 2003; Kumar, 2008).

Las bacterias metanogénicas (tercer grupo) pertenecen al dominio *Archaea*, phylum *Euryarchaeota*. Cinco órdenes filogenéticos de microorganismos metanógenos han sido identificados: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, y *Methanopyrales* (Gerardi, 2003). Recientemente un sexto orden *Methanocellales* fue descrito (Sakai *et al.*, 2008). Las bacterias metanogénicas son las responsables de la etapa final de la DA para la formación de metano a partir de acetato y/o desde dióxido de carbono e hidrógeno, alcohol principalmente (Thauer *et al.*, 2008).

1.1.3 Inóculos empleados en digestión anaerobia

Uno de los inóculos utilizados en la degradación de sustratos vegetales es el líquido ruminal (LR), el cual constituye un inóculo primario para el arranque de reactores debido a la actividad celulolítica y metanogénica que presenta. Se ha demostrado que los microorganismos del LR poseen una alta capacidad celulolítica y hemicelulítica, por lo que resultan más eficientes que los lodos PTAR (Hu & Yu, 2006; Hu *et al.*, 2006; O'Sullivan *et al.*, 2006).

Otros inóculos como el estiércol bovino y el estiércol de cerdo son excelentes inóculos para la digestión anaerobia de residuos. Se caracterizan por ser eficientes en la producción de metano debido a su afinidad hacia sustratos como cáscaras de papa, ensilado de hierba, remolacha y paja de avena (Kaparaju & Rintala, 2005; Lehtomäki, *et al.*, 2007).

Por otro lado, el lodo PTAR ha sido empleado ampliamente en el arranque de biodigestores anaerobios exhibiendo altos rendimientos en la producción de metano (aproximadamente entre 70 y 85%, con PBM de $0.40\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}$ adicionados) (Sandoval, *et al.*, 2009; Altinbas *et al.*, 2010). Sin embargo, presenta baja capacidad de degradación de materiales lignocelulósicos (Hu & Yu, 2005).

Recientemente la mezcla de inóculos (en distintas proporciones) procedentes de diversas fuentes, ha sido propuesta como una nueva alternativa para incrementar la biodegradabilidad del sustrato. Esta alternativa permite aprovechar el efecto sinérgico entre los consorcios microbianos promoviendo una mejor digestión comparada con los procesos que emplean un tipo de inóculo (Magbanua *et al.*, 2001; Buendía *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2010).

El rendimiento de la producción de biogás depende de: la Actividad Hidrolítica (AH) y Actividad Metanogénica Específica (AME) de los inóculos y el Potencial de Biometanización (PBM) del sustrato.

1.1.4 Actividad hidrolítica

Debido a que la hidrólisis de sustratos complejos es la etapa limitante, la determinación de la actividad hidrolítica de la biomasa celular con un sustrato específico es importante para el arranque y control de las condiciones del proceso. La 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, referida a la biomasa o población microbiana evaluada (Miller, 1959; Manuel de métodos Laboratorio Biotecnología Ambiental Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2009).

La literatura muestra que la degradación de la celulosa cristalina es más eficiente a valores de pH entre 6.8 y 7.3 empleando microorganismos ruminales como inóculo (Hu *et al.*, 2004). En otros estudios se evaluó la capacidad hidrolítica de microorganismos de LPTAR después de ser sometidos a un tratamiento aerobio. Como resultado de esta investigación se encontró que la máxima actividad hidrolítica se alcanzó después de 9 horas de tratamiento con valores de 0.90 UI/ml y 0.40 UI/ml empleando papel filtro y carboximetilcelulosa como sustratos específicos (Mshandete *et al.*, 2005).

1.1.5 Actividad metanogénica

Se refiere a la capacidad de la biomasa microbiana para transformar un sustrato específico (Hidrógeno, acetato y propionato) 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-CH₄/gSSV día) (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Le Hyaric *et al.*, 2011). La determinación de la AME es importante para evaluar el arranque de reactores anaerobios, optimizar el proceso y para la toma de decisiones acerca del funcionamiento de los reactores (Mata-Álvarez, 2003).

La influencia de la concentración de sustrato y contenido de humedad sobre la AME fue estudiada en una planta de digestión anaerobia de residuos sólidos urbanos. La mayor AME fue observada a una concentración de sustrato (propionato) de 10 gDQO/kg y un contenido de humedad de 82%, concluyendo que la AME disminuye linealmente cuando se reduce el contenido de humedad (Le

Hyaric *et al.*, 2011). Estos resultados son importantes para optimizar los procesos anaerobios porque permiten seleccionar las mejores condiciones ambientales para el crecimiento y metabolismo de los consorcios microbianos y consecuentemente incrementar el rendimiento en la producción de metano.

1.1.6 Potencial de biometanización

Determina el máximo rendimiento de metano y la capacidad de biodegradabilidad de un sustrato. En los ensayos de PBM se debe considerar emplear un inóculo adecuado, óptimas condiciones ambientales y una adecuada concentración de sustrato dentro de los digestores.

El PBM puede describirse como el volumen de metano acumulado (medido en condiciones estándar de presión y temperatura) por la cantidad de sustrato adicionado en términos de sólidos volátiles ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}$). (Carrhá *et al.*, 2006; Angelidaki *et al.*, 2009; Monou *et al.*, 2009; Labatud *et al.*, 2011).

El PBM ha sido estudiado en procesos de fermentación por lotes usando estiércol de ganado, de cerdo y bovino, obteniendo rendimientos de metano de 148 ± 41 ; 356 ± 28 and $275 \pm 36 \text{ L CH}_4/\text{kg SV}$, respectivamente (Moller *et al.*, 2004). De igual forma, el PBM ha sido evaluado en sistemas de co-digestión usando mezclas de estiércol de vaca con residuos agroindustriales como ensilado de maíz y pasto entre otros (Amon *et al.*, 2007; Labatud *et al.*, 2011).

A pesar de la importancia que representan los sustratos agro-industriales, en la actualidad se presentan pocos estudios relacionados con los inóculos más adecuados para el arranque de reactores anaerobios utilizando residuos lignocelulósicos como el bagazo de fique.

1.1.7 Generalidades de las saponinas esteroidales

Las saponinas son glicósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Díaz, 2009).

Las saponinas presentes en el BF son glucósidos de esteroides, constituidos por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o aglicon) y un elemento soluble en agua (el azúcar) (Hostettmann & Marston, 1995). Cuando las saponinas son hidrolizadas se obtiene una aglicona, conocida comúnmente como sapogenina principalmente hecogenina y tigogenina (Barbosa, 2006; Simmons-Boycea & Tinto, 2007). Osorio *et al.*, 2010 mediante espectrometría de masas (ESI-MS) propusieron una estructura química de las saponinas del BF, las cuales contienen una hecogenina (aglicona de la saponina) y dos unidades de hexosa (Figura 1.3).

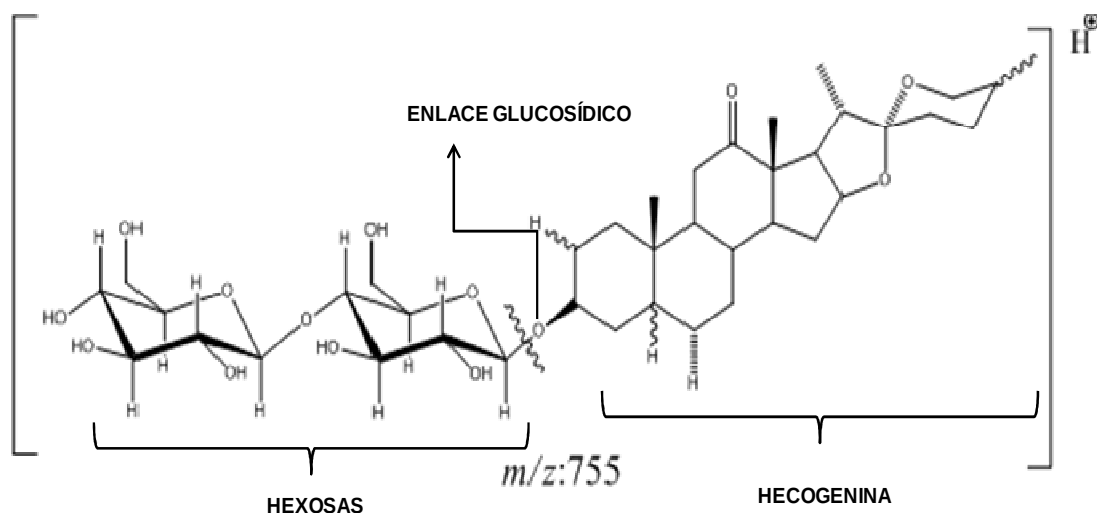


Figura 1.3 Estructura química de la saponina del BF

Fuente: El Autor

1.1.8 Efecto de las saponinas esteroidales sobre la producción de biogás

Las investigaciones relacionadas con la incidencia de las saponinas sobre los rendimientos de la producción de biogás son limitadas y contradictorias.

Los primeros estudios plantearon que la adición de 0.5 mg/ml de extracto de saponina obtenido a partir de *Yucca schidigera* a la fermentación de heno y alfalfa empleando líquido ruminal como inóculo, ocasionó una drástica reducción de protozoos causando una disminución en la degradación de proteínas. La producción de metano se redujo 15% con respecto al control, pero estadísticamente esta diferencia no es significativa, por lo cual se concluyó que el extracto de saponinas no presentó efectos inhibitorios sobre los microorganismos ruminales para la producción de biogás (Wang *et al.*, 1998).

La actividad antimicrobiana ocasionada por las saponinas ocurre usualmente por su interacción con el colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoarios causando lisis y muerte celular (Cheeke, 2000).

Aunque las saponinas son conocidas por ocasionar defaunación de protozoarios, también presentan efectos benéficos sobre el crecimiento de bacterias celulolíticas y hongos en el rumen (Galindo *et al.*, 2000).

Asimismo, durante la digestión anaerobia de desechos de cocina empleando estiércol de ganado como inóculo, se incrementó en 55% la producción de biogás al adicionar una dosis de 15 ppm de Aquasan y Teresan (aditivos químicos con 7% saponina esteroideal) (Singh *et al.*, 2001). Sin embargo, existen estudios contradictorios respecto del efecto.

Las bacterias (*Ruminococcus Flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus Albus*) contenidas en el rumen fueron inhibidas en presencia de 50

µg/ml y 180 µg/ml de saponinas esteroideas (*Yucca schidigera*) (Wang *et al.*, 2000). De igual forma, los extractos de saponinas *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* afectaron negativamente el crecimiento de las bacterias celulolíticas *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*. La mayor actividad inhibitoria se observó en *F. succinogenes* utilizando concentraciones de 3 y 5 mg/ml de saponina. La presencia de saponinas pueden reducir el número de bacterias celulolíticas, lo cual podría repercutir en la actividad degradativa del rumen (Santos *et al.*, 2005).

El estudio del efecto de la cafeína y de la saponina sobre la digestión anaerobia de los residuos de comida demostró que 100 ppm de cafeína incrementa la producción de metano de 182 ml/g ST a 408.5 ml/g ST mientras que a partir de 50 ppm de saponina inhiben radicalmente la producción de metano (Prabhudessai *et al.*, 2009).

Estudios recientes demostraron que las saponinas presentes en el *Aloe Vera* reducen el PBM de esta planta (Almeida *et al.*, 2010).

Dado que se ha incrementado la utilización de residuos agro-industriales para la producción de biogás, no solo es importante evaluar el PBM sino también las posibles inhibiciones que puedan causar los componentes asociados a sustratos de origen vegetal.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Inóculos

Los inóculos evaluados en la producción de biogás a partir de BF fueron los siguientes: a) LR y EB, recogidos de la planta de procesamiento de carnes “Frigorífico Vijagual”, b) LPTAR, recolectado en la planta de tratamiento de aguas

residuales “Rio Frio”, c) LEC, obtenido de una planta municipal dedicada a la cría de cerdos “Porcícola Porto Ferrayo” y d) Las diferentes mezclas de los consorcios anteriores (proporción 1:1) LR+EB, LR+LPTAR y LR+LEC. El EB fue diluido (1:1) en agua para evitar digestión anaerobia seca. La concentración de inóculo empleada para la determinación de la AH y la AME fue ajustada a 1.5 g/l de SSV (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

La caracterización fisicoquímica de cada inóculo se realizó de acuerdo con los protocolos descritos en el *Standard Methods* (APHA, 1998) y se presenta en la Tabla 1.3. Los inóculos sólidos fueron diluidos 1:1(v/v) para evitar digestión anaerobia seca.

Tabla 1.3 Caracterización Fisicoquímica de los inóculos evaluados

Parámetro	Unidades	EB	LEC	LPTAR	LR	LR+EB	LR+LEC	LR+LPTAR
pH		8	8	7	7	8	8	7
ST	g/l	107.5	105.9	35.1	17.5	36.5	43.8	23.6
SSV	g/l	80.5	51.7	22.1	7.9	20.8	23.6	29.1
Alcalinidad	mgCaCO ₃ /l	2200	1700	2100	4100	3000	3100	3100
AGV	mg/l	20880	2520	2280	9360	15120	7200	6960

Fuente: El Autor

1.2.2 Experimentación

La experimentación se dividió en dos etapas: a) evaluación de la AH y la AME usando celulosa y acetato respectivamente, como sustratos modelo; b) determinación del PBM empleando bagazo de fique como sustrato. La producción de metano de cada consorcio (sin sustrato) fue sustraída de los experimentos y utilizada como blanco, con el fin de evitar interferencias con el metabolismo endógeno de los inóculos.

1.2.2.1 Determinación de la actividad hidrolítica (AH) usando celulosa como sustrato modelo

La AH de cada consorcio microbiano se determinó con base en la hidrólisis de la celulosa de acuerdo con el protocolo descrito por Hu *et al.* (2004). Los ensayos fueron realizados en biodigestores de 500 ml, con un volumen de operación de 400 ml. Inicialmente se añadió el volumen de inóculo equivalente a una concentración de 1.5 g/L de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y se aforó con medio mineral denominado “*balch*” (en honor al investigador que formuló el medio) compuesto por cisteína (0.5 g/L), NaHCO₃ (5 g/L) y Na₂S como agente reductor, a pH de 7.0-7.2 (Balch *et al.*, 1979; Díaz-Báez *et al.*, 2002).

Como sustrato modelo se utilizó papel de filtro cuantitativo (*Schleicher & Schuell* (589/1, 110 mm)) en una concentración de 10 g/l de celulosa. Los ensayos se realizaron a $39 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 días.

La configuración de experimentos consistió en 5 biodigestores por cada inóculo. Tres digestores fueron empleados para el análisis de azúcares reductores totales (ART) y los otros reactores fueron usados como blanco. Se tomaron de los biodigestores 2 ml de muestra diariamente y se procedió a centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.

La fracción de sobrenadante se recogió y se mantuvo a 4°C para su posterior análisis. La producción de ART durante la hidrólisis de la celulosa fue determinada utilizando un espectrofotómetro GENESYS 20 Thermo Spectronics a 540 nm de acuerdo con el método del ácido dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959). La AH fue determinada usando la máxima velocidad inicial de ART y definida como g DQO glucosa/ g SSV*día.

1.2.2.2 Determinación de la actividad metanogénica específica (AME) usando acetato como sustrato modelo

Los ensayos de actividad metanogénica específica fueron realizados en biodigestores de 500 ml de capacidad. Inicialmente se añadió el volumen de inóculo equivalente a una concentración de 1.5 g/L de SSV y se aforó con medio mineral “balch” hasta completar un volumen de operación de 400 ml.

El medio contenía una concentración de 5 g/L de acetato de sodio como sustrato, además de sales minerales disueltas en tampón bi-carbonato de sodio 0.02 N y pH 7. Los experimentos fueron realizados por triplicado durante 30 días a temperatura de incubación de $39 \pm 2^\circ\text{C}$. El volumen de metano se midió por el método de desplazamiento alcalino (Angelidaki et al., 2009). La determinación de la AME se realizó usando la ecuación 1.1

$$AME = \frac{P}{FC * V * SSV} ; \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Dónde:

AME = Actividad metanogénica específica (g DQO/ g SSV * día)

P = Máxima pendiente de la cinética de producción de metano para cada experimento (ml/d)

FC = Factor de conversión de g DQO (430 ml CH₄ húmedo/g DQO a 39 °C)

V = Volumen del inóculo utilizado en el ensayo (l)

SSV= Concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles en el inóculo (g/l)

1.2.2.3 Determinación del potencial de biometanización (PBM)

El BF usado como sustrato fue colectado en una planta de beneficio de fique ubicada en el municipio de Mogotes-Santander. 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 caracterización.

Los análisis fisicoquímicos realizados al BF se determinaron de acuerdo con los procedimientos establecidos. (APHA, 1998; Goering & Van Soest, 1970).

Los experimentos se llevaron a cabo en reactores por lotes de 500 ml, los cuales contenían una relación sustrato/inóculo de 1 (g SV inóculo/ g SV sustrato) determinada por experimentación preliminar. La digestión anaerobia fue evaluada durante 15 días a $39 \pm 2^\circ\text{C}$. El desarrollo experimental consistió en 10 digestores para cada inóculo con su respectivo duplicado. Tres reactores fueron usados para las mediciones de metano; cinco digestores se usaron para los análisis de azúcares reductores totales, ácidos grasos volátiles totales, alcalinidad total, pH y los otros reactores se utilizaron como blancos.

Las cinéticas de producción de ART, AGVT, relación AGVT/AT (APHA, 1998) fueron usadas como parámetros de control del proceso anaerobio.

La producción de metano se cuantificó por el método de desplazamiento alcalino (APHA 1998; Angelidaki *et al.*, 2009; Demirel & Chen, 2005). El PBM fue expresado en términos de potencial específico de metano a condiciones estándar de temperatura y presión ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}$).

Los resultados experimentales fueron analizados con el software *StatGraphics plus 5.1*, StatPoint Inc. (Virginia, EE.UU). La prueba de Fisher fue usada para verificar la diferencia estadística entre los resultados.

1.2.2.4 Incidencia de las saponinas sobre la actividad metabólica del inóculo

Se evaluó la AH y la AME del inóculo seleccionado en la etapa anterior en presencia de cuatro cantidades (2mg, 2mg, 3mg, 4mg) diferentes de saponina en un volumen de operación de 35 ml.

El extracto de saponinas se obtuvo a partir del bagazo de fique proveniente de una planta de beneficio del municipio de Mogotes-Santander. Las muestras fueron cuantificadas por el Laboratorio CIBIOT de la Universidad Pontificia Bolivariana (Sede Medellín), mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección en *PDA (Photo Diode Array)*.

La AH y la AME se llevaron a cabo en digestores de 50 ml, con un volumen de operación de 35 ml, incubados a $39 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y 192 horas respectivamente. El volumen del inóculo, el medio empleado, el tipo y concentración de sustrato fueron descritos en la sección 1.2.2 de este capítulo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El ensayo consistió en 24 digestores (12 para la determinación de AH y 12 para la cuantificación de la AME). Cuatro reactores fueron utilizados para cada cantidad de saponina adicionada (1mg, 2mg, 3mg, 4mg) con su respectivo duplicado, dos reactores control (sin saponinas) y dos experimentos como blanco (sin sustrato).

En el caso de la AH, durante cada hora se tomaron muestras de los diferentes ensayos para cuantificar la concentración de ART por el método colorimétrico DNS (Miller, 1959). La AH fue determinada usando la máxima velocidad inicial de ART y definida como g DQO glucosa/ g SSV*día.

El volumen de metano producido diariamente se usó para la determinación de la AME mediante la ecuación 1.1.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Producción de azúcares reductores totales (ART) a partir de celulosa usando los diferentes inóculos

En la Figura 1.4 se presentan las cinéticas de producción de azúcares para cada uno de los inóculos evaluados, empleando celulosa como fuente de carbono.

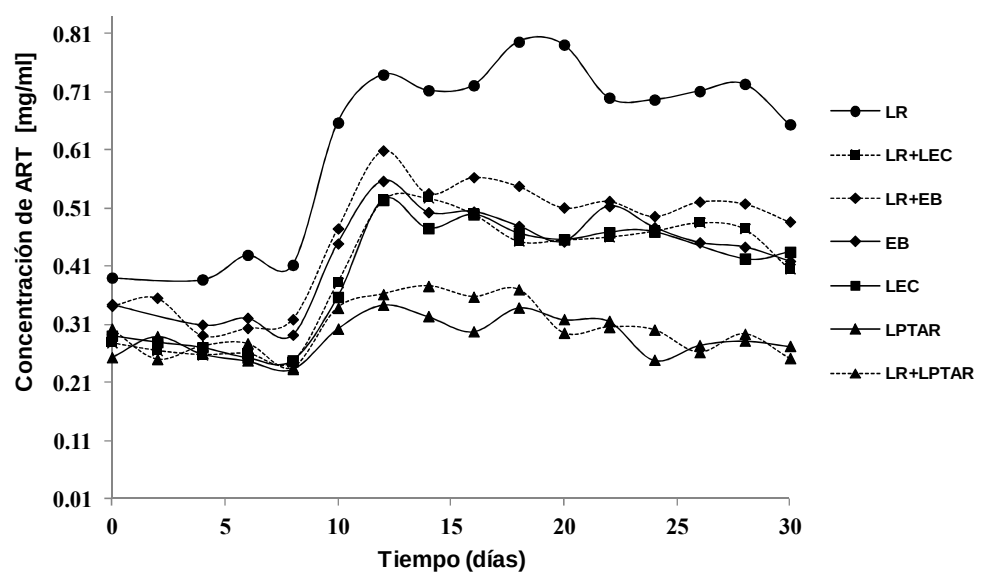


Figura 1.4 Cinética de producción de Azúcares Reductores [mg/ml] para cada inóculo usando celulosa como sustrato (pH: 7.0, T: 39±2 °C)

Fuente: El Autor

Como se observa en la figura 1.4 el arranque de los biodigestores para cada uno de los inóculos evaluados inicia en un intervalo entre 0.25 y 0.39 mg/ml de ART, esto se debe a que cada inóculo contiene una concentración de ART diferente de acuerdo a la matriz donde proviene.

Durante los primeros ocho días, no se observan incrementos en la producción de ART, debido probablemente a un periodo de adaptación por parte de los

consorcios microbianos hacia el sistema. Una vez que transcurre este periodo, se aprecia un significativo aumento en la concentración de los ART para todos los inóculos evaluados, alcanzando la mayor concentración (0.795 mg/ml) el líquido ruminal; este valor representa un incremento de la producción de ART de 34% con respecto al inóculo compuesto por LR+LEC. La producción más baja de ART fue la obtenida por los inóculos LPTAR y la mezcla LR+LPTAR con valores de 0.343 mg/ml y 0.375 mg/ml, respectivamente. A partir del día 13, todos los inóculos alcanzan una producción estable de ART. De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que durante la cinética de producción de ART se presenta una fase de adaptación, una fase de producción de ART y una fase estacionaria, para cada consorcio microbiano.

La producción de ART más alta correspondió al LR. Estos resultados están asociados con las características nativas de la matriz donde proviene este consorcio. Russell & Rychlik (2001) confirmaron que las bacterias presentes en el líquido ruminal juegan un papel dominante en la fermentación de fibras. El alto rendimiento (0.795 mg/ml) del LR en la producción de ART representa una conversión del 85% de celulosa (fracción lentamente hidrolizable) en azúcares (fracción soluble) favoreciendo la etapa hidrolítica de la degradación anaerobia de residuos lignocelulósicos.

Concentraciones más bajas de azúcares fueron encontradas por Hu *et al.* (2004); 0.104 g/ml y Mshandete *et al.* (2005); 0.26 mg/ml cuando usaron los sistemas sustrato-consorcio celulosa con LR y sisal con LPTAR respectivamente; para la producción de biogás. La diferencia en las concentraciones de azúcares obtenidos en este trabajo comparada con la de otros investigadores puede deberse a la composición de cada uno de los sustratos evaluados y al tipo de consorcio microbiano utilizado.

1.3.2 Producción de metano a partir de acetato usando los diferentes inóculos

La producción de metano a partir del acetato usando los diferentes inóculos se presenta en la Figura 1.5. LEC y la mezcla LR+LEC (660 y 572 ml, respectivamente), muestran la mejor capacidad de conversión del sustrato y arranque del reactor comparado con los otros inóculos. De igual forma, con respecto al metano teórico, el LEC y la mezcla LR+LEC alcanzaron los valores más altos (41% y 47% respectivamente), comparado con los otros inóculos (LR, EB, LPTAR y sus combinaciones) en los que se obtuvo entre 12 y 26% del metano teórico.

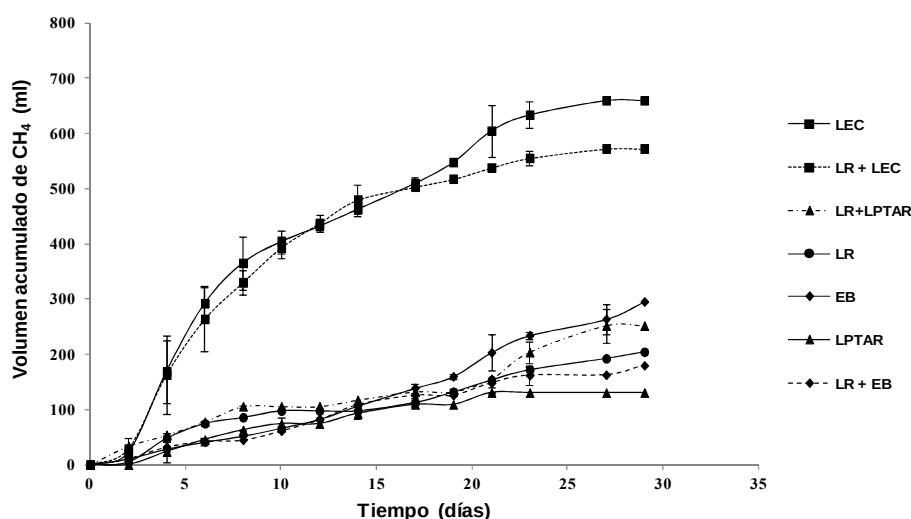


Figura 1.5 Volumen de metano acumulado (condiciones estándar de presión y temperatura) a partir del acetato usando los diferentes inóculos (pH: 7.0, T: 39±2 °C)

Fuente: El Autor

1.3.3 Producción de metano a partir del bagazo de fique (BF) usando los diferentes inóculos

Los resultados de la producción de metano usando como sustrato BF se presentan en la Figura 1.6. Comparando estos resultados con los presentados

previamente, todos los inóculos tienen un comportamiento similar. A partir del día 8, el LEC y la mezcla LR+LEC muestran la mejor producción de metano favoreciendo el proceso de biodegradación. Los otros inóculos mantienen una producción estable durante el ensayo.

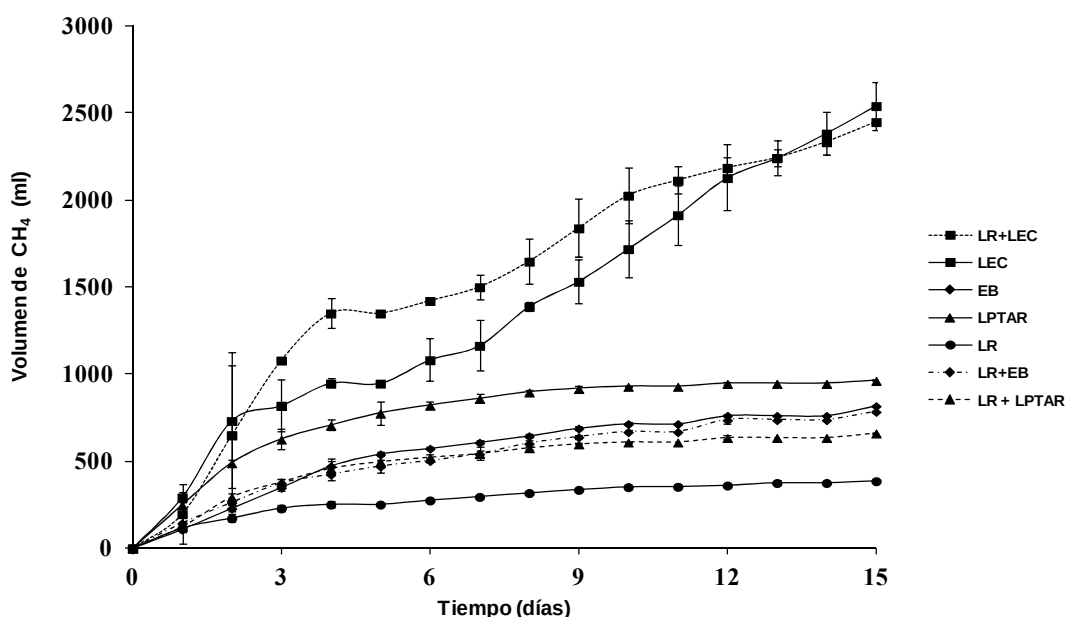


Figura 1.6 Producción de metano (condiciones estándar de presión y temperatura) a partir del BF usando los diferentes inóculos (pH: 7.0; T: 39 ± 2 °C)

Fuente: El Autor

La producción de metano a partir del BF usando LR + LEC mejora 38% respecto a los rendimientos obtenidos usando LPTAR como consorcio microbiano. Estos resultados demuestran que la degradación de materiales lignocelulósicos empleando microorganismos anaerobios convencionales no es eficiente. Resultados similares se encuentran en la literatura para sustratos como rastrojo de maíz y *cattail*, entre otros (Thanakoses *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006). Por otra parte, el PBM del BF se redujo drásticamente cuando se utilizó LR como inóculo, esto ocurrió porque se presentó una acumulación de AGVT de 7440 mg/L (Quintero, 2011) durante el proceso. De lo anterior, se puede concluir que a pesar de que el líquido ruminal presenta una excelente capacidad para metabolizar

sustratos complejos en componentes solubles, el exceso en la producción de AGVT afecta los rendimientos en la producción de metano.

1.3.4 Evaluación de los parámetros: AH, AME Y PBM

Usando los resultados presentados en las Figuras 1.4 y 1.5 se calcularon los valores de AH y AME para cada uno de los inóculos estudiados. El PBM se determinó a partir de los resultados de producción de metano a partir del BF (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 AH, AME de los inóculos y PBM de BF

INÓCULO	AH* (g DQO/ g SVS * día)	AME** (g DQO/ g SVS * día)	PBM*** (m ³ CH ₄ /Kg SV)
E.B.	0.039	0.042	0.042
LEC	0.060	0.146	0.172
L. PTAR	0.015	0.017	0.150
L.R.	0.068	0.026	0.157
L.R. + E.B.	0.048	0.025	0.087
L.R. + LEC	0.051	0.144	0.299
L.R. + PTAR	0.006	0.030	0.106

*Actividad Hidrolítica

**Actividad Metanogénica Específica

***Potencial de Biometanización

Fuente: El Autor

El LR y el LEC presentaron la mejor actividad hidrolítica, alcanzando valores de 0.068 y 0.060 g DQO/g SVS*día, respectivamente; la excelente actividad enzimática de estos inóculos demostrando la capacidad de degradar carbohidratos complejos como la celulosa, ha sido reportada (Thanakoses, *et al.*, 2003; Hu, *et al.*, 2004; Mshandete *et al.*, 2005). Cuando el BF fue evaluado como sustrato, en lugar de celulosa, los resultados de AH usando LR fueron significativamente más altos que para los otros inóculos (AH: 6.929 g DQO/g SVS*día), con estos resultados se corrobora que el LR es el mejor inóculo para la hidrólisis de la celulosa. El alto valor de AH cuando se emplea BF como sustrato se debe a que

durante la fermentación se produce ART a partir de las fracciones de celulosa y hemicelulosa presentes en el BF.

Por otra parte, la AME está fuertemente relacionada con la capacidad del consorcio microbiano para transformar efectivamente los AGVT en acetato y subsecuentemente convertido a metano por unidad de tiempo (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Kumar, 2008). En este estudio, LEC y la mezcla LR+LEC mostraron los mejores resultados con valores de 0.146 y 0.144 g DQO/g SVS*día, respectivamente.

Los máximos valores de PBM utilizando BF como sustrato fueron obtenidos cuando se emplearon LR+LEC y LEC como consorcios microbianos (0.299 y 0.172 m³ CH₄/kg SV adicionados, respectivamente). Dado que existen diferencias estadísticamente significativas entre el inóculo LR+LEC comparado con los otros inóculos (p= 0.000), es posible afirmar que los consorcios microbianos contenidos en la mezcla de LR +LEC tienen mejor afinidad al BF que otros consorcios (Figura 1.7).

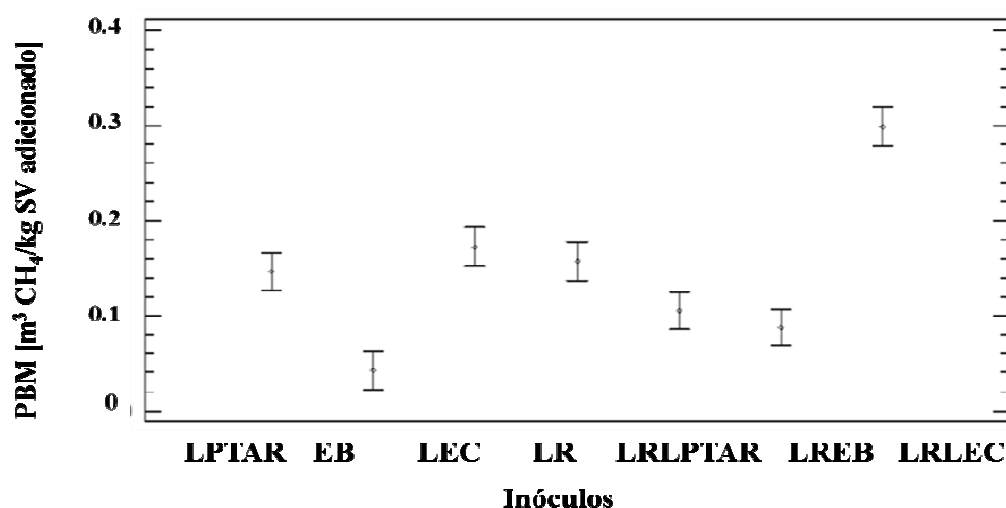


Figura 1.7 Distribución de medias y medianas de la producción de metano utilizando BF como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1 gSV

Fuente: El Autor

En la mezcla LR+LEC cada consorcio actúa en sinergia para degradar la celulosa, transformando los azúcares en AGVT y finalmente en metano. Los resultados expuestos anteriormente, demuestran que el sistema de mezclar LR + LEC constituye un inóculo apropiado para la degradación de sustratos provenientes de la agro industria como el BF (Quintero *et al.*, 2011).

1.3.5 Producción de azúcares reductores totales (ART) a partir de celulosa para cada cantidad de saponinas

Las cinéticas de producción de ART para cada cantidad de saponina (1 mg, 2 mg 3 mg y 4 mg) empleando como inóculo la mezcla de líquido ruminal y lodo estiércol de cerdo, se observa en la Figura 1.8.

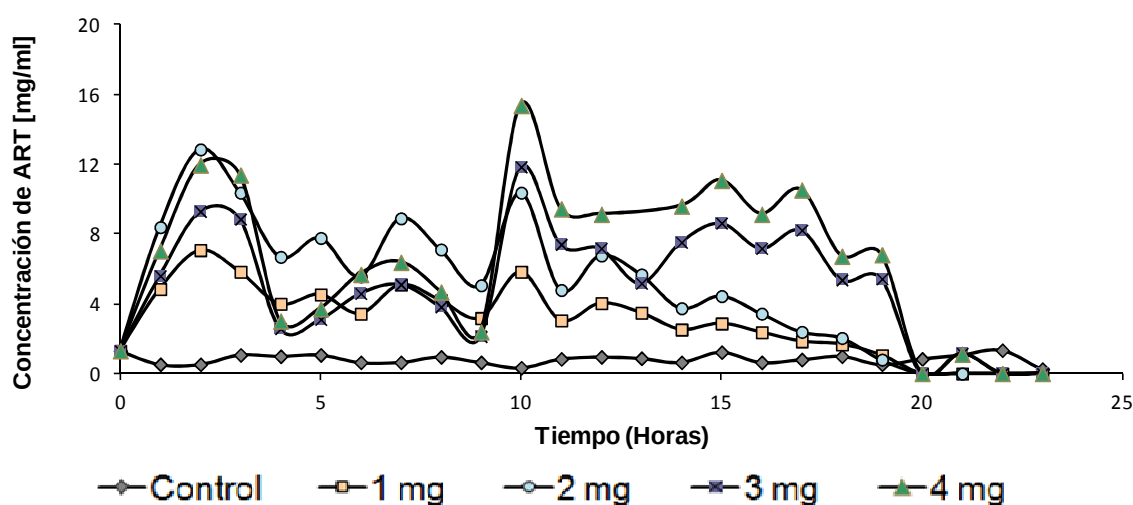


Figura 1.8 Cinéticas de producción y consumo de ART a diferentes cantidades de saponina

Fuente: El Autor

De acuerdo con la Figura 1.8 la hidrólisis de la celulosa y el consumo de azúcares se presenta durante las 10 primeras horas para cada uno de los experimentos que contienen saponina. Transcurrido este tiempo se alcanza la estabilidad del

proceso y posteriormente la actividad hidrolítica se reduce significativamente al terminar el tiempo de digestión, lo cual se traduce en un consumo total de azúcar.

La actividad enzimática mas alta se alcanza a la hora 10 con una concentración de ART de 15.36 mg/ml cuando se adicionan 4 mg de saponina; la producción más baja de ART fue la obtenida por el ensayo con 1 mg de saponina. Los resultados mostrados confirman que 24 horas son suficientes para que las enzimas extracelulares de las bacterias hidrolíticas desarrollen eficientemente su actividad hidrolizando la celulosa y consumiendo los azúcares producidos.

La relación lineal (Figura 1.9) comprobada entre la actividad enzimática y la presencia de saponinas (*Furcraea ssp*) demuestra que los compuestos esteroidales no inhiben el crecimiento y desarrollo de las bacterias hidrolíticas, por el contrario estimulan su actividad hidrolítica mejorando los rendimientos en la producción de azúcar a partir de sustratos complejos como la celulosa (Figura 1.9).

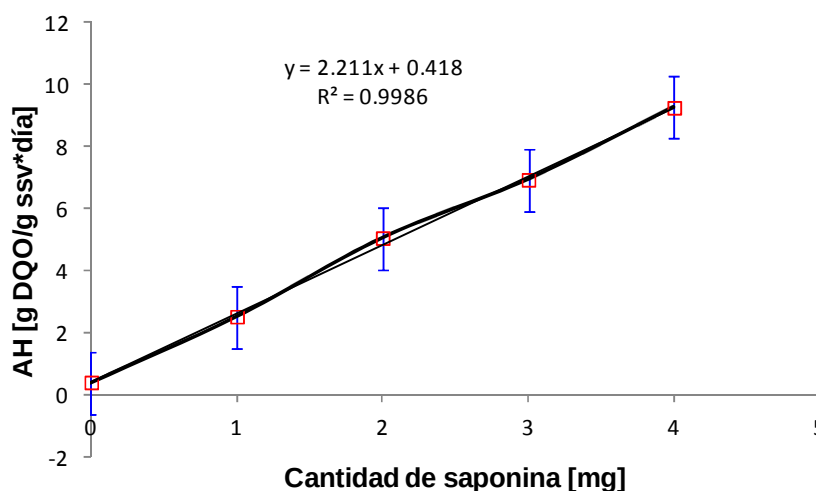


Figura 1.9 Actividad hidrolítica de los microorganismos a diferentes cantidades de saponina

Fuente: El Autor

Dado que la saponina presente en el BF activa la capacidad hidrolítica del inóculo LR+LEC, es posible emplear este aditivo para incrementar los rendimientos de la

etapa hidrolítica de la digestión de sustratos complejos. Estos resultados son contradictorios a los presentados por Wang *et al.* (2000) quienes plantearon que las saponinas a partir de *Yucca schidigera* inhiben la actividad hidrolítica de las bacterias presentes en el rumen. Esto indica que las investigaciones acerca de la incidencia de la saponina sobre los microorganismos es particular para cada consorcio microbiano y depende de la planta de donde proviene la saponina.

1.3.6 Producción de metano a partir de acetato

La producción de metano para las cantidades de saponina adicionadas se presenta en la Figura 1.10. Durante las primeras 98 horas de digestión no se observan diferencias significativas del volumen de metano producido.

A partir de la hora 100 se incrementa el volumen de metano para los reactores que contienen 1 mg y 2 mg de saponina alcanzando valores de 145 ml y 104 ml respectivamente. Comportamiento contrario presentaron los ensayos con 3 mg y 4 mg de saponinas, en los cuales se redujo significativamente el volumen de metano a 74 ml y 60 ml respectivamente.

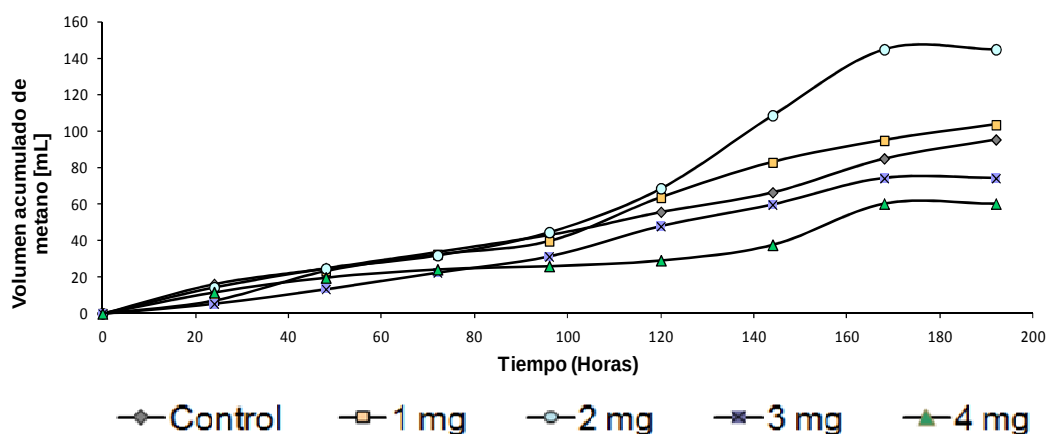


Figura 1.10 Producción de metano a diferentes cantidades de saponina

Fuente: El Autor

Durante la evaluación de la AME a partir del inóculo previamente seleccionado, en presencia de diferentes cantidades de saponina del inóculo (Figura 1.11), se distinguen dos zonas: la primera representa un incremento en la AME del inóculo lo que se traduce a una activación de las funciones metabólicas del consorcio microbiano y la otra zona muestra una inhibición de la actividad microbiana en presencia de saponinas esteroidales.

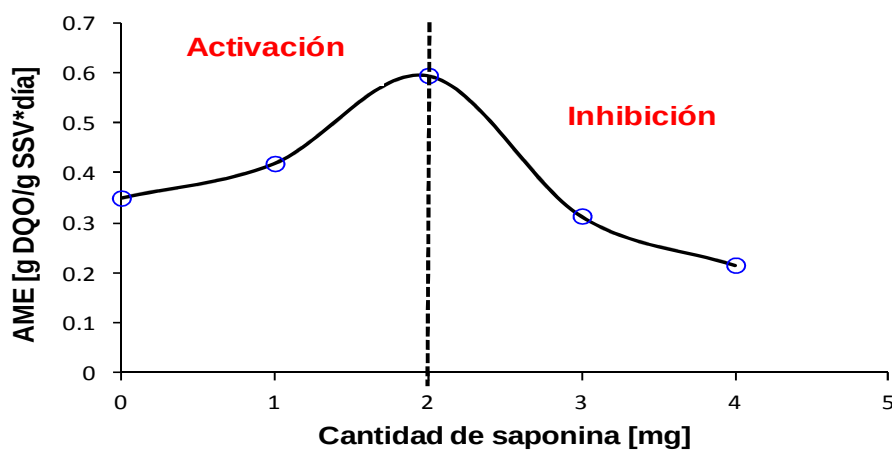


Figura 1.11 Actividad Metanogénica de los microorganismos a diferentes cantidades de saponina

Fuente: El Autor

Lo anterior, determina que bajas concentraciones de saponinas presentan un mecanismo de activación sobre las bacterias metanogénicas, incrementando la producción de metano en un 51.5% con respecto al control. Lo cual es corroborado por Singh *et al.* (2001) quienes explicaron que la producción de biogás aumenta al manipular el metabolismo de los microorganismos a través de compuestos estimulantes como los esteroides. Sin embargo, altas concentraciones de saponina causan inhibición del proceso de metanización. Esto puede explicarse debido a que la mayoría de bacterias metanogénicas carecen de protección en la pared celular y fácilmente se pueden lisis en la presencia de altas concentraciones de surfactantes como la saponina (Gerardi, 2003). Resultados similares fueron discutidos para la degradación anaerobia de desechos de cocina y plantas desérticas (Prabhudessai *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Patra & Saxena, 2010).

1.4 CONCLUSIONES

Se estudió la degradación anaerobia de BF usando diferentes fuentes de consorcios microbianos. El inóculo LR+LEC garantiza la mejor producción de biogás a partir del bagazo de fique. Las actividades hidrolítica y metanogénica de este inóculo (0.05 g DQO/g SVS*día y 0.14 g DQO/g SVS*día, respectivamente) determinan el arranque de la producción de biogás a partir de residuos lignocelulósicos. El potencial de biometanización del bagazo de fique (0.3 m³ CH₄/kg SV adicionados) demuestra el alto potencial de bioconversión del inóculo compuesto por la mezcla LR +LEC.

Durante este estudio se encontró que las saponinas esteroideas (*Furcraea ssp*) presentan una relación lineal con la actividad hidrolítica, demostrando que los compuestos esteroideos estimulan la actividad hidrolítica de los consorcios microbianos presentes en la mezcla LR+LEC y podrían ser utilizados para mejorar los rendimientos de la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia de sustratos complejos.

La actividad metanogénica se favorece cuando se adicionan bajas dosis de saponina (1mg y 2 mg), consiguiendo un incremento del 51.5% en la producción de metano con respecto al control.

El uso de compuestos esteroideos a bajas concentraciones puede manipular positivamente la actividad metabólica de los microorganismos consiguiendo mejorar la producción de biogás.

1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA A.; DAS K.C.; BALAGURUSAMY N. "*Biochemical methane potential of Desert plants: aloe vera and Opuntia robusta in comarca Lagunera, México*". En Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste Venice, Italy; 8 November 2010.

ALTINBAS M.; CIFCI D.I.; ARIKAN O.A.; OZTURK I. "*Increasing biomethane potential of waste activated sludge by food waste under mesophilic and thermophilic conditions*". En: Proceedings Venice 2010, Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste Venecia, Italia, Noviembre, 2010, 1-11.

ÁLVAREZ J.A.; OTERO L.; LEMA J.M. "*A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes*" Bioresource. Technol., 101, 2010, 1153-1158.

AMON T.; AMON B.; KRYVORUCHKO V.; ZOLLITSCH W.; MAYER K.; GRUBER L. "*Biogas production from maize and dairy cattle manure—Influence of biomass composition on the methane yield*". Agr. Ecosyst. Environ., 118, 2007, 173-182.

ANGELIDAKI I.; ALVES M.; BOLZONELLA D.; BORZACCONI L.; CAMPOS J.; GUWY A.; KALYUZHNYI S.; JENICEK P.; VAN LIER J. "*Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays*". Water Sci. Technol., 59, 2009, 927-934.

ANGELIDAKI I.; KARAKASHEV D.; BATSTONE D.J.; PLUGGE C.M.; STAMS J. M. "Biomethanation and Its Potential" En: *Methods in Methane Metabolism*. Editor Rosenzweig and Ragsdale. Editorial Elsevier Applied Science, Inglaterra, 2011, 328-347.

APHA - American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20th. Washington, USA.

APPELS L.; BAEYENS J.; DEGRÉVE J.; DEWIL R. *"Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge"*. Prog energ combust., 34, 2008, 755–781

BALCH W. E.; FOX G. E.; MAGRUM L. J; WOESE C. R.; WOLFE R. S. *"Methanogens: evaluation of a unique biological group"*. Microbiol Rev., 43, 1979, 260-296.

BARBOSA E. "Obtención de sapogeninas crudas y carbohidratos a partir del jugo de fique a nivel de planta piloto. Contenido de hecogenina y tigogenina en el jugo de las variedades cenizo y tunoso común" En Facultad de Ciencias. Departamento de Química. 2006, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá

BUENDÍA I.M.; FERNÁNDEZ J.V.; RODRÍGUEZ L. *"Feasibility of anaerobic admixed as a treatment option of meat industry wastes"*. Bioresource Technol., 100, 2009, 1903–1909.

CARRHÁ R.; CORNELIUS A.; ZEEMAN G.; LETTINGA G. *"The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems"*. Bioresource Technol., 97, 2006, 1105–1118.

CHEEKE P. R. *"Actual and potential applications of Yucca schidigera and Quillaja saponaria saponins in human and animal nutrition"* Asas Ws P., 2000, 1-10.

DEMIRER G.N.; Chen S. *"Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure"*. Process Biochem., 40, 2005, 3542–3549.

DÍAZ M.C.; Espitia S.E.; Molina F. *Digestión Anaerobia: Una aproximación a la tecnología*. Editorial Universidad Nacional de Colombia UNIBIBLOS, Colombia, 2002, 43-45.

DÍAZ L.N. “*Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión*”. Ret., 2009, 1, 32- 47.

FERNÁNDEZ J.M.; PLAZA C.; GARCIA-GIL J.C.; POLO A. “*Biochemical properties and barley yield in a semiarid Mediterranean soil amended with two kinds of sewage sludge*”. Appl soil Ecol., 42, 2009, 18–24.

GALINDO J.; ALDAMA A.; MARRERO Y.; GONZÁLEZ N. “*Efecto de Sapindus saponaria en los géneros de protozoos y poblaciones de bacterias ruminales*”. Rev. Cub. Cienc. Agríc., 34, 2000 353-358.

GERARDI M.H. *The microbiology of anaerobic digesters*. Editorial Wiley-Interscience a John Wiley & Sons, Estados Unidos, 2003, 17-30.

GOERING H.K.; VAN SOEST P.J. Forage Fibre Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook No. 379, ARS-USDA, Estados Unidos., 1970.

HOSTETTMANN K.; MARSTON A. Saponins. Cambridge, New York. Cambridge University press. 1995.

HU Z.; GANG W.; YU H. “*Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values*”. Biochem. Eng. J., 21, 2004, 59-62.

HU Z.; YU H. "Anaerobic digestion of cattail by rumen cultures". *Waste Managent.*, 26, 2006, 1222-1228.

HU Z.; YU H. "Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic degradation of corn stover". *Process Biochem.*, 40, 2005, 2371–2377.

HU Z.; YU H.; Zheng J. "Application of response surface methodology for optimization of acidogenesis of cattail by rumen cultures". *Bioresource Technol.*, 97, 2006, 2103–2109.

KAPARAJU P.; RINTALA J. "Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure". *Resour conserve recy.*, 43, 2005, 175-188.
KUMAR K.S. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications*. Editorial Blackwell Publishing, Estados Unidos, 2008, 29-63.

LABATUT R.A.; ANGENENT L.T.; SCOTT N.R. "Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates". *Bioresource Technol.*, 102, 2011, 2255–2264.

LE HYARIC R.; CHARDIN C.; BENBELKACEM H.; BOLLON J.; BAYARD R.; ESCUDIÉ R.; BUFFIÈRE P. "Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate". *Bioresource Technol.*, 102, 2011, 822–827.

LEHTOMÄKI A.; HUTTUNEN S.; RINTALA J.A. "Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio" *Resour conserve recy.*, 51, 2007, 591-609.

LI Y.; PARK S.Y.; ZHU J. *"Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste"*. *Renew sust energ rev.*, 15, 2011, 821–826.

LOMAS E.J.; URBANO RODRIGUEZ C.; MERINO TORRENS J.M.; CAMARERO ESTELA L.M. *Valorización de la biomasa en el país vasco*. Editorial Ente Vasco de la Energía, España, 2001, 16-30.

MAGBANUA B.S.; ADAMS T.T.; JOHNSTON P. *"Anaerobic codigestion of hog and poultry waste"*. *Bioresource Technol.*, 76, 2001, 165-168.

MATA-ALVAREZ J. *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. Editorial IWA, España, 2003, 5-20.

MILLER G. *"Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar"*. *Anal. Chem.*, 31, 1959, 426-428.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. MINISTERIO NACIONAL DE PLANEACIÓN. *Guía ambiental del subsector fiquero*. 2006.

MOLLER H.B.; SOMMER H.B.; AHRING B.K. *"Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure"*. *Biomass Bioenerg.*, 26, 2004, 485 – 495.

MONOU M.; KYTHREOTOU N.; FATTA D.; SMITH S. *"Rapid screening procedure to optimise the anaerobic codigestion of industrial biowastes and agricultural livestock wastes in Cyprus"*. *Waste Manage.*, 29, 2009, 712–720.

MSHANDETE A.; BJÖRNSSON L.; KIVAISIA A.K.; RUBINDAMAYUGIA S.T.; MATTIASSON B. *"Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment"*. *Water Res.*, 39, 2005, 1569–1575.

O'SULLIVAN C.A.; BURRELL P.C.; CLARKE W.P.; BLACKALL L.L. "*Comparison of cellulose solubilisation rates in rumen and landfill leachate inoculated reactors*". Bioresource Technol., 97, 2006, 2356–2363.

OSORIO C.; BLANCO C.; COMBARIZA M. "Saponinas obtenidas a partir del bagazo de fique (*Furcraea Macrophylla*)" En XXIX Congreso Latinoamericano de Química. Cartagena, Colombia, Octubre de 2010.

PANICHNUMSIN P.; NOPHARATANA A.; AHRING B.; CHAIPRASERT P. "*Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure*". Biomass Bioenerg., 34, 2010, 1117-1124.

PATRA A.; SAXENA J. "*A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen*" Phytochemistry., 71, 2010, 1198–1222.

PAVLOSTATHIS S. G.; GIRALDO-GOMEZ E. "*Kinetics of anaerobic treatment: A critical review*". Crit. Rev. Environ. Control., 21, 1991, 411–490.

PRABHUDESSAI V.; GANGULY A.; MUTNURI S. "*Effect of caffeine and saponin on anaerobic digestion of food waste*" Ann Microbiol., 59, 2009, 643-648.

QUINTERO M. "Estudio de consorcios microbianos para la producción de biogás a partir de residuos del fique" Tesis de maestría. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 40-45.

QUINTERO M.; CASTRO L.; ORTIZ C.; GÚZMAN C.; ESCALANTE H.. "*Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example*" Bioresource Technol. DOI 10.1016/j.biortech.2011.12.052.

RUSSELL J.B.; RYCHLIK J.L. "*Factors that alter rumen microbial ecology*". Science. 292, 2001, 1119–1122.

SAKAI S.; IMACHI H.; HANADA S.; OHASHI A.; HARADA H.; KAMAGATA Y. "*Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov". Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 2008, 929–936.

SANDOVAL C.J.; VERGARA M.; CARREÑO M.; CASTILLO E.F. "*Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment*". Waste Manage., 29, 2009, 704-711.

SANTOS A.L.; JIMÉNEZ H.; CANO A. "*Efecto in vitro de extractos ricos en saponinas de Pithecellobium saman y Sapindus saponaria sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales*". Revista Corpoica., 6, 2005, 20-25.

SILVA W.; DUARTE V.; PRASAD S. "*Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste*". Bioresource Technol., 94, 2004, 261-266.

SIMMONS B.; TINTO J.W. "*Steroidal Saponins and Sapogenins from the Agavaceae family*". Nat. Produc. Commu., 2, 2007, 99-114

SINGH S.; KUMAR S.; JAIN M.C.; KUMAR D. "*Increased biogas production using microbial stimulants*". Bioresource Technol., 78, 2001, 313-316.

SLEAT R.; MAH R. "Hydrolytic Bacteria". In: *Anaerobic Digestion of Biomass*. Editores Chynoweth and Isaacson, Editorial Elsevier Applied Science, Inglaterra, 1987, 15-30.

THANAKOSES P.; BLACK A.; HOLTZAPPLE M. "*Fermentation of Corn Stover to Carboxylic Acids*". Biotechnol. Bioeng., 83, 2003, 191–200.

THAUER R.K.; KASTER A.; SEEDORF H.; BUCKEL W.; HEDDERICH R. "*Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation*". Nat. Rev. Microbiol., 6, 2008, 579-591.

TONG Z.; MCCARTY P. "Microbial hydrolysis of lignocellulosic materials". In *Methane from Community Wastes*. Editor Roan Isaacson. Editorial Elsevier Applied Science, Inglaterra, 1991, 61–100.

VALDEZ-VAZQUEZ I.; POGGI-VARALDO H. "*Hydrogen production by fermentative consortia*". Renew. Sust. Energ. Rev., 13, 2009, 1000-1013.

WANG Y.; MCALLISTER T.A.; YANKE L.J.; CHEEKE P.R. "*Effect of steroidal saponin from Yucca schidigera extract on ruminal microbes*" J Applied Microbiol., 88, 2000, 887-896.

WANG Y.; MCALLISTER T.A.; NEWBOLDB C.J.; RODEA L.M.; CHEEKE P.R.; CHENGA KJ. "*Effects of Yucca schidigera extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC)*". Anim Feed Sci Tech., 74, 1998, 143-153.

WARD A.J.; HOBBS P.J.; HOLLIMAN P.J.; JONES D.L. "*Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources*". Bioresource Technol., 99, 2008, 7928–7940.

II. CAPÍTULO: DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE

La DA descrita en el capítulo uno, es un proceso ingenieril y por ende la determinación de sus mejores condiciones de operación se convierte en un reto. Prueba de lo anterior lo constituyen los 2266 reactores instalados alrededor del mundo (Censo enero 2007). La mayoría de estos reactores son alimentados con residuos de la industria agro alimentaria (Van Lier, 2008).

El diseño de DA para el bagazo de fique conllevó a determinar las variables de operación que brinden una producción de biogás acorde a valores reportados en literatura para residuos lignocelulósicos y además garantice la estabilización del residuo.

En este capítulo se presenta el desarrollo del proceso de DA para el bagazo de fique, en el cual se estudiaron los aspectos relacionados con las variables de operación: relación inóculo/sustrato, cuantificación de grupos tróficos presentes en el inóculo, evaluación de la dinámica de crecimiento microbiano, temperatura, agitación y tipo de configuración operacional del bioreactor. El rendimiento del proceso se evaluó a partir del potencial de biometanización (PBM), variable respuesta que ha sido establecida a nivel internacional por la comunidad científica que investiga en DA.

2.1 DISEÑO DE DA PARA BAGAZO DE FIQUE

La DA es una tecnología interesante para mitigar problemas ambientales y producir energía; se aplica a fuentes de energía renovables debido a su bajo costo y alta eficiencia (Rapport *et al.*, 2008). Los residuos agrícolas son materias primas atractivas para la DA, debido a su abundante oferta, bajo costo y alto rendimiento en la producción de biogás. Biomásas residuales como la cebada y el arroz

mostraron alto potencial de biometanización generando producciones específicas de metano en términos de Sólidos Volátiles (SV) de 229 y 195 NI CH_4 /kg SV respectivamente (Dinuccio *et al.*, 2010). El ensilado de pasto se ha convertido en el sustrato más importante después del ensilado de maíz empleado en plantas de biogás en Alemania (Prochnow *et al.*, 2009).

Durante la DA las etapas de hidrólisis de las macromoléculas, acidogénesis de los monómeros, acetogénesis y metanogénesis, son realizadas por consorcios microbianos conformados por diferentes poblaciones de microorganismos (Kumar, 2008). En la hidrólisis los microorganismos convierten las grandes cadenas de carbonos en compuestos sencillos. En la etapa de acidogénesis, los monosacáridos producidos en la etapa anterior son convertidos en ácidos orgánicos tipo acetato, propionato, butirato, valerato, y CO_2 e H_2 . Posteriormente, en la etapa de acetogénesis se genera acetato mayoritariamente, H_2 y CO_2 . Finalmente en la metanogénesis el consorcio metanogénico utiliza el acetato para producir gas metano (CH_4) y CO_2 (Gerardi, 2003).

En la DA la hidrólisis es la etapa limitante de la degradación de la materia orgánica (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991) y su evolución se cuantifica mediante la determinación de las concentraciones de azúcares reductores totales (ART). Así mismo la cuantificación de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y metano, determinan el grado de desarrollo de las etapas acidogénica y metanogénica respectivamente.

2.1.1 Sustrato en la DA

En la DA el biogás obtenido es producto de una serie de reacciones en cadena, a partir del carbono que posee el sustrato. De esta forma los carbohidratos se convierten en azúcares simples, las grasas en ácidos grasos y glicerol y las

proteínas se hidrolizan hasta péptidos y aminoácidos, liberando dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂) para finalmente llegar a metano (Appels *et al.*, 2008). Por consiguiente, en la DA las características fisicoquímicas del residuo influyen directamente en el tiempo de retención del proceso y en la conversión de los sólidos totales y volátiles hacia metano (Li *et al.*, 2011). El tipo de residuo, y por ende sus características fisicoquímicas, influye directamente sobre la cantidad y concentración del metano producido (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Potencial de biometanización de diferentes residuos

FUENTE DE RESIDUO	RESIDUO	PRODUCCIÓN DE METANO (m ³ CH ₄ /kg SV)	REFERENCIA
Residuos sólidos urbanos (RSU)	Carne cocida	0.48	Cho <i>et al.</i> , (1995)
	Alimentos mezclados	0.47	
	Arroz cocido	0.29	
	Papel de oficina	0.37	
	Papel periódico	0.10	
	RSU + ensilaje	0.11	Forster-Carneiro <i>et al.</i> , (2007)
	RSU + estiércol	0.03	
	RSU + lodo digerido	0.29	
Agro industriales	Semillas oleaginosas	0.42	Petersson <i>et al.</i> , (2007)
	Paja	0.44	
	Maíz (ensilado)	0.39	Amon <i>et al.</i> , (2007)
	Hojas de remolacha	0.21	
	Girasol	0.3	
	Sisal + desechos de pescado	0.39	Mshandete <i>et al.</i> , (2004)
	Sisal	0.24	Mshandete <i>et al.</i> , (2005)
Frutas y vegetales	Cáscara de plátano	0.27	Nallathambi Gunaseelan (2004)
	Mango	0.37	
	Tomate podrido	0.3	
	Cebolla	0.4	
Estiércol	Cerdo	0.356	Moller <i>et al.</i> , (2004)
	Jabalí	0.275	
	Ganado vacuno	0.328	Hashimoto <i>et al.</i> , (1981)

Fuente: Ward *et al.*, 2008 modificado por el autor.

Algunos residuos cuyas características fisicoquímicas se asemejan a las del fique, por su naturaleza lignocelulósica, han presentado buenos rendimientos al ser utilizados como sustratos para la DA. Por ejemplo, el *cattail* (planta acuática) y el sisal ofrecen una conversión promedio de sólidos volátiles a metano del 60%, empleando líquido ruminal como inóculo (Hu & Han-Qing Yu, 2006, Mshandete *et al.*, 2004). La máxima producción de metano ($0.21 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$) a partir del maíz se alcanzó con una relación inóculo/sustrato de 3, usando como inóculo LPTAR (Raposo *et al.*, 2006). De igual forma, se obtuvo un rendimiento de metano de $0.304 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$ a partir de la co-digestión de pasto con estiércol de cerdo (Xie *et al.*, 2011).

2.1.2 Inóculo en la DA

En el proceso de degradación anaerobia intervienen grupos de bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas, las cuales son las responsables de la producción de metano. Los grupos tróficos involucrados en la DA son altamente dependientes de las interacciones metabólicas de cada especie; la inhibición de uno de ellos puede causar disminución en el rendimiento del proceso de biometanización (Schink & Zeikus, 1982).

La cuantificación de los grupos tróficos en una DA ayuda a identificar las diferentes reacciones metabólicas que se llevan a cabo y mejorar el arranque y estabilidad del reactor (Sandoval *et al.*, 2009). De igual forma, la determinación de la viabilidad de las poblaciones bacterianas anaerobias estrictas, permite evaluar la calidad del inóculo durante el tiempo de operación y tomar decisiones acerca del control y optimización del proceso (Díaz-Báez *et al.*, 2002). El tipo de inóculo, es un factor importante que influye en el arranque y operación del biodigestor como se discutió en el capítulo 1 (Forero & Zúñiga, 2003; Silva *et al.*, 2004; Mshandete *et al.*, 2005).

2.1.3 RIS (inóculo/sustrato) en DA

La relación sustrato inóculo (RIS) se expresa en función del contenido de sólidos volátiles en el inóculo por la concentración de sólidos volátiles adicionados en el sustrato. En la DA la RIS se constituye en un parámetro operacional importante para especificar el potencial de biometanización de cualquier residuo (Chen & Hashimoto, 1996).

Durante la DA de desechos de cocina, mediante lodo granular y lodo suspendido, se evidenció que la selección de la RIS llega a ser más determinante que la misma actividad metabólica del inóculo (Neves *et al.*, 2004). En la degradación anaerobia de desechos de comida, residuos agro-industriales y co-digestión se comprobó que existe una relación lineal decreciente entre los rendimientos de biogás y el relación sustrato/inóculo (Liu *et al.*, 2009). Recientemente se evaluó el efecto de la RIS sobre la digestión anaerobia a partir de algas, en este estudio se demostró que la producción de metano se redujo de 0.140 m³CH₄/kg SV a 0.094 m³CH₄/kg SV cuando la RIS disminuyó de 2.0 a 0.5 gsv/gsv (Zeng *et al.*, 2010).

Por lo anterior se evidencia que la RIS tiene una influencia significativa, casi que de forma lineal, sobre los rendimientos de la producción de metano. Por consiguiente durante la DA de cualquier tipo de residuo, la determinación experimental de la RIS se constituye en un parámetro operacional obligatorio.

2.1.4 Temperatura

En la DA intervienen grupos de bacterias hidrolíticas y metanogénicas, las cuales pueden necesitar de niveles de temperatura específicos para su adecuado crecimiento. Algunas fermentaciones llevadas a cabo en el rango termofílico (50-55°C) favorecen la reducción de patógenos. Sin embargo, a estos rangos de temperatura se genera una alta concentración de AGV que inhiben la

metanogénesis, y además el proceso conlleva implicaciones energéticas (Hansen *et al.*, 1998; Kabouris *et al.*, 2009).

Con respecto al rango psicrófilico, recientes estudios han demostrado que existen microorganismos que son flexibles a bajas temperaturas mediante adaptaciones entre rangos psicrófilicos y mesófilicos, lo cual favorece las aplicaciones a escala industrial (Kashyap *et al.*, 2003). Por ejemplo, los rendimientos de biogás a partir de estiércol de ganado y estiércol de cerdo fueron de $0.92 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 / \text{m}^3 / \text{día}$ y $0.21 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg SV}$ adicionados cuando las fermentaciones fueron llevadas a cabo a 9°C y a 23°C respectivamente (Kanwar & Guleri, 1994; Hill *et al.*, 2001).

La mayoría de procesos anaerobios se llevan a cabo en rangos mesofílicos ($35\text{-}39^\circ\text{C}$) debido a que estas temperaturas permiten la estabilización del reactor, presentando rendimientos de metano satisfactorios (Gerardi, 2003; Kumar, 2008; Mata-Álvarez 2003).

2.1.5 Agitación

La importancia de la agitación en los procesos anaerobios radica en asegurar una eficiente transferencia de la materia orgánica (sustrato) con la biomasa microbiana (inóculo). El mezclado del reactor puede ser continuo o intermitente, dependiendo del diseño del reactor, el tipo de agitador y el contenido total de sólidos del sustrato.

La agitación usada en procesos de digestión anaerobia puede ser de dos tipos: mecánica y por recirculación de gas; el uso de una u otra depende del tamaño del reactor y de la tecnología disponible (Bullock & Kristiansen 1989; Ward *et al.*, 2008, Nizami & Murphy, 2010, Asam *et al.*, 2011).

Por ejemplo en la DA de melaza incrementar la agitación a 200 rpm en la fase hidrolítica-acidogénica y mantener la fase metanogénica a 30 rpm, permitió

incrementar el rendimiento del proceso hasta un 70%, con respecto a un proceso sin agitación controlada (Park *et al.*, 2010).

2.1.6 Configuración de biorreactores

La DA puede ser realizada en biorreactores de tanque agitado en operación por lotes. En Suiza se empleó este tipo de operación para la degradación anaerobia de maíz fresco, el inóculo utilizado provenía de una planta de DA y la operación se llevó a cabo a 37°C y 70 rpm alcanzando un rendimiento de metano de 450 m³CH₄/ t SV (Nges *et al.*, 2011). El rendimiento de metano del bagazo de fique fue de 0.36 m³ CH₄/kg SV cuando el proceso se llevó a cabo en un reactor “*batch*” de 3l a temperatura de 21°C y 80 rpm (Cardenas & Fuentes, 2011).

La operación en continuo también ha sido utilizada para llevar a cabo el proceso de DA. La producción de biogás a partir de estiércol fue llevada a cabo en un reactor *continuously stirred tank reactors* (CSTR) de 5l alcanzando una producción de 0.370 m³CH₄/kg SV alimentado (Kaparaju *et al.*, 2009).

Cuando sólo se utiliza un equipo de reactor, donde ocurren las cuatro etapas de la DA, se denomina proceso en una fase (Wang *et al.*, 2009).

La DA en operación por lotes permite alcanzar conversiones de materia orgánica a metano entre el 40% y 70%, aunque la producción de metano es irregular y discontinua. Alrededor del 90% de las plantas instaladas en Europa, para digerir residuos sólidos municipales y biológicos, corresponden a unidades que operan en forma continua en una fase; debido a que su diseño es más simple y el costo de inversión es menor que el de dos fases (Bouallagui *et al.*, 2005; Nizami & Murphy, 2010).

Sin embargo, la DA también puede llevarse a cabo en dos Biorreactores, que permiten separar la etapa de acidogénesis de la metanogénesis, y permitir la

optimización simultánea de ambos procesos. Este tipo de configuración se le denomina DA en dos fases (Alonso *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2007; Vavilin *et al.*, 2008).

Debido a que la hidrólisis es la etapa limitante del proceso para la DA a partir de residuos lignocelulósicos, una configuración en dos fases favorece la degradación de material particulado en la fase hidrolítica-acidogénica (Yue *et al.*, 2007). Además el proceso en dos fases aumenta la estabilidad del proceso mediante el control de la acidificación, evitando sobrecargas y acumulación de material tóxico (Solera *et al.*, 2002; Borja *et al.*, 2003; Demirer & Chen, 2005).

Diferentes sustratos han sido tratados en configuración de dos fases alcanzando rendimientos más altos comparados con los realizados en una fase. Por ejemplo, la producción de metano en un proceso en dos fases empleando residuos de frutas y vegetales y inóculo lodo activo residual produce un rendimiento de 0.37 m³ CH₄/kg SV (Dinsdale *et al.*, 2000). La degradabilidad anaerobia de materiales lignocelulósicos consigue un 95% de conversión de sólidos volátiles a metano (Bouallagui *et al.*, 2005).

En el estudio de la digestión anaerobia del estiércol de ganado se concluyó que el proceso es más eficiente cuando se lleva a cabo en dos fases porque la hidrólisis y la acidogénesis son las etapas controlantes (Myint *et al.*, 2007).

Sin embargo, para los residuos lignocelulósicos las investigaciones relacionadas con el tipo de configuración que debe emplearse durante la DA es limitado.

2.2 ESTUDIO EXPERIMENTAL PARA DA DE BF EN OPERACIÓN POR LOTES Y EN CONTINUO

En este apartado se describe el método experimental utilizado para el estudio de la DA del bagazo de fique. A partir del proceso en operación discontinua (lotes) se determinó el valor de la RIS y se evaluó el efecto de la temperatura.

Posteriormente en bioreactores a escala de 250 ml se comparó el rendimiento operacional del proceso tanto en una fase como en dos. Finalmente, mediante la operación en continuo se estableció la carga diaria de bagazo alimentado al reactor y se corroboró la estabilidad del consorcio microbiano para la producción del biogás.

Bagazo de fique: sustrato para DA

El bagazo de fique (BF), que se utilizó como sustrato en la DA, se recolectó en una planta de beneficio ubicada en Mogotes - Santander. Las muestras de BF se conservaron refrigeradas y fueron trasladadas al laboratorio de la Escuela de Ingeniería Química de la UIS para su posterior caracterización (Tabla 2- Introducción general).

Mezcla de LR y LEC inóculo para DA

Como inóculo se utilizó un consorcio de microorganismos presentes en la mezcla compuesta por líquido ruminal (LR) y lodo estiércol de cerdo (LEC). El LR se obtuvo de panzas bovinas y fue recolectado en el frigorífico “El Vijagual”, Rionegro – Santander. El LEC se recolectó en los pozos sépticos de la porcícola “Portoferrayo” ubicada en el municipio de La Mesa de los Santos-Santander. Al inóculo se le realizó una caracterización fisicoquímica (Tabla 2.2) (Quintero *et al.*, 2011), de acuerdo con los protocolos establecidos por el *Standard Methods* (APHA, 1998) y microbiológica (Tabla 2.3) de acuerdo a los protocolos APHA.

Tabla 2.2 Características Fisicoquímicas del inóculo LR-LEC

Parámetro	Unidades	Valor
pH	--	8
AGV	mg/l	7200
AT	mg CaCO ₃ /l	3100
ST	mg/l	43770
SSV	mg/l	21880
STV	mg/l	23640

Fuente: El Autor

La caracterización microbiológica tuvo por objeto cuantificar los principales grupos microbianos presentes en el inóculo y se llevó a cabo mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) (APHA, 1998). La muestra fue introducida en la cámara de atmósfera de nitrógeno, para realizar las diluciones, primero la muestra se homogenizó, y luego se tomó 1 ml de esta para diluirla en 9 ml de agua reducida. Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas, agregando 1ml de la dilución anterior en 9 ml de agua reducida, utilizando una jeringa purgada con nitrógeno previamente y trabajando con las normas de asepsia para evitar la contaminación de las diluciones, hasta llegar a la dilución 10^8 . La inoculación de los tubos se realizó con jeringas bajo flujo de nitrógeno, los medios se inocularon con 0.2 ml por tubo de la dilución correspondiente y se inocularon 5 tubos por dilución, mas dos blancos control sin inóculo por medio. La incubación se realizó a 35° C durante el periodo recomendado para cada grupo trófico.

La positividad del ensayo se identificó de acuerdo con las características de cada grupo trófico (Tabla 2.3). La producción de metano se midió con un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls*. El NMP se calculó utilizando la tabla estadística de Mac Grady para 5 tubos por dilución.

Tabla 2.3 Características principales de NMP de acuerdo con los grupos tróficos

Grupo Trófico	Sigla	Sustrato	Tiempo de incubación 35°C (días)	Detección de tubos positivos
Bacterias fermentadoras de glucosa	(BFG)	Glucosa	5 a 8	Cambio de color verde a amarillo
Bacterias fermentativas del lactato	(BFL)	Lactato	5 a 8	Cambio de color verde a amarillo
Bacterias sulfato reductoras del acetato	(BSRA)	Acetato	7 a 15	Producción de FeS
Bacterias metanogénicas hidrogenofílicas	(BMH)	H ₂ /CO ₂	15 a 45	Detección de metano
Bacterias metanogénicas acetoclásticas	(BMA)	Acetato	30 a 60	Detección de metano
Bacterias metanogénicas del metanol	(BMM)	Metanol	30 a 60	Detección de metano

Fuente: El Autor

Proceso de DA del BF operación por lotes

Como bioreactores para la digestión anaerobia del BF en operación por lotes se utilizaron botellas de vidrio de 500 ml, las cuales se gasificaron con CO₂, para garantizar anaerobiosis. La influencia de la RIS y de la temperatura sobre la producción de metano a partir del BF se evaluó mediante un diseño factorial 3². Al biorreactor se adicionó una masa de bagazo de fique y un volumen determinado de mezcla inóculo y posteriormente se taparon con corchos de butilo y se sellaron con agrafes de aluminio. A partir de una base fija de inóculo expresada en g SV (6,1 g SV) se modificó la carga orgánica (4.6 g SV; 10.4 g SV; 18.8 g SV), con el fin de obtener diferentes valores de RIS (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Diseño factorial del efecto de la RIS y la temperatura sobre la producción de metano a partir de BF

Variables		Unidades	Niveles de experimentación		
			Bajo	Medio	Alto
Entrada	RIS	g SV/g SV	0.3	0.6	1.3
	T	°C	21	39	55
Respuesta	Producción de metano	ml			

Fuente: El Autor

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, durante 10 días de operación y se incluyó un experimento denominado blanco el cual contenía solo inóculo.

La evolución y estabilidad del proceso de digestión se determinó cuantificando las variables ART, AGV, AGV/AT, pH y volumen de CH₄ producido.

La concentración de ART se determinó mediante el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico (DNS), usando un espectrofotómetro *GENESYS 20 Thermo Spectronics*, a una longitud de onda de 540 nm (Miller, 1959). La cuantificación de

SV, AGVT, AT se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos en el *Standard Methods* (APHA, 1998). El pH fue determinado por método directo.

La producción de biogás se determinó mediante el método de desplazamiento alcalino (APHA, 1998; Angelidaki *et al.*, 2009). El metano obtenido se expresó en condiciones normales, de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ecuación 2.1

$$V_{NTP} = V \times \left(\frac{P_0 - P_v}{P_{atm} \times T} \right)$$

Donde:

V_{NTP} = Volumen de gas en condiciones normales (ml)

V = Volumen de gas generado (ml)

P_0 = Presión del CH_4 en condiciones normales

P_v = Presión de vapor a la temperatura del test (mbar)

El porcentaje de metano se determinó mediante un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls*.

Proceso de DA del BF operación en continuo

La operación en continuo se realizó en un bioreactor de 23 l. (Figura 2.1), el cual está provisto de un tanque de acero inoxidable y un sistema de agitación tipo helicoidal operado por un motor *Tech Top electric motors*, en un rango de agitación entre 80 – 300 rpm. El tanque está equipado con un ducto lateral y otro inferior que permiten la carga y descarga de sustrato y efluente. La tapa del reactor cuenta con 3 válvulas especiales de seguridad, que permiten operar el equipo en un rango de 0 a 45 psi de presión. Una de las válvulas está conectada a un contador de diafragma marca METREX para realizar las mediciones diarias de volumen de gas producido.



Figura 2.1 Esquema del reactor anaerobio de 23 l
Fuente: El Autor

El arranque y puesta en marcha del reactor se realizó en dos periodos: El primer periodo consistió en operar el reactor por lotes durante 30 días (teniendo en cuenta los resultados preliminares obtenidos a volumen de 0.5l). Para el segundo periodo se probaron cargas de 180 g BF, 220 g BF, 260 g BF y 300 g BF con tiempos de retención hidráulica de 20 días. Posteriormente el reactor se operó continuamente durante 120 días, adicionando diariamente 300 g de BF y haciendo descargas de 260 g de lodo efluente, el cual fue separado en dos fases, la fracción sólida se encaló para su adecuada disposición y la fracción líquida se recirculó al reactor para evitar digestión seca. Las condiciones de operación del bioproceso se presentan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Condiciones de operación proceso en continuo

Variable	Unidad	Valor
Volumen de reactor	l	23
Volumen de operación	l	17.8
Carga orgánica diaria	kg SV de BF	0.5
Carga orgánica promedio	kg SV/m ³ *día	19
Agitación (intermitente)	rpm.	30
Temperatura ambiente	°C	21
Tiempo de retención hidráulico	días	120

Fuente: El Autor

De igual forma que en la operación por lotes las variables de respuesta fueron ART, AGV, AGV/AT, pH y volumen de metano. En esta operación se evaluó la dinámica de la población microbiana en completa anaerobiosis. Cada cinco días se tomó una muestra de la masa reaccionante dentro del bioreactor, y se cuantificó la densidad aproximada de microorganismos expresada en unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) utilizando el método de *roll tube*. (Hungate, 1970; Arcos *et al.*, 2004).

DA de bagazo de fique en proceso a dos fases

El proceso de DA en dos fases se diseñó con dos reactores, que permiten llevar a cabo las etapas por separado, utilizando en cada reactor el correspondiente inóculo. Para las etapas de hidrólisis y acidogénesis (Fase A) se utilizó un reactor, denominado acidogénico (RA) y para las etapas de acetogénesis y metanogénesis (Fase B) un reactor denominado metanogénico (RM). Los dos reactores fueron recipientes de vidrio de 500 ml de volumen. Se incluyó un reactor control (una fase) denominado convencional. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las variables de respuesta se cuantificaron por los protocolos señalados en la sección 2.1.4

El reactor acidogénico se inoculó con 150 ml de LR, teniendo en cuenta que este consorcio tiene alta actividad hidrolítica (Tabla 1.4 Capítulo 1). Los ensayos se realizaron en biodigestores por lotes de 500 ml con un volumen de operación de 172 ml, una carga orgánica de 3.6 g SV de BF, agitados continuamente a 180 rpm. (Rueda & Sanabria, 2011). Como parámetros de control se consideraron el pH y la relación AGV/AT; y como variables respuesta: la actividad hidrolítica (AH), determinada como la variación de la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo y definida como g DQO glucosa/ g SSV*día. La velocidad de agitación se controló con el equipo Agitador Orbital, marca “*Orbit Shaker Lab Line*” graduado en 180±20 rpm. La fase acidogénica se mantuvo a

temperatura ambiente durante 9 días, y luego la carga de este bioreactor se adicionó al reactor metanogénico.

El reactor metanogénico de 500 ml tuvo un volumen de operación de 322 ml. El arranque de los biodigestores metanogénicos inició con la mezcla del contenido total del reactor acidogénico y con una carga adicional de LEC, dado que este consorcio posee una alta actividad metanogénica (Tabla 1.5 capítulo 1). La fase metanogénica se mantuvo durante 12 días, a una temperatura de 39 ± 2 °C (Rueda & Sanabria, 2011). Al igual que en los biodigestores acidogénicos, se controló el pH y la relación AGV/AT, mientras que la variable respuesta fue el volumen de metano producido.

Con el objeto de evaluar el desempeño del proceso de DA en dos fases, se estructuró un experimento control en un reactor convencional (RC), a igual volumen y tiempo de operación, pero en una sola fase. El RC tuvo un volumen de operación de 322 ml, carga orgánica de 3.6 g SV de BF, inóculo la mezcla LR+LEC, tiempo de digestión 21 días y se incubó a una temperatura de 39 ± 2 °C, sin agitación. En la Tabla 2.6 se resumen las condiciones de operación de los reactores acidogénico y metanogénico respectivamente y para el reactor convencional.

Tabla 2.6 Condiciones de operación para biorreactor de DA en proceso convencional y por fases.

Variables de operación	Valor		
	(RA)	(RM)	(RC)
Volumen del reactor [l]	0.5	0.5	0.5
Temperatura [°C]	21	39	39
tiempo de digestión [días]	4	10	10
Agitación [rpm]	180	0	0
Sustrato [g SV]	3.6	Hidrolizados de RA	3.6
	9		9
	11		11
	13		13
Inóculo (LR-LEC) [l]	-	-	0.3
Inóculo (LR) [l]	0.150	-	-
Inóculo (LEC) [l]	-	0.150	-

Fuente: El Autor

Los resultados experimentales fueron analizados aplicando el software StatGraphics plus 5.1, StatPoint Inc. (Virginia, EE.UU). El test de Fisher's fue usado para verificar las diferencias estadísticas entre los resultados. El ajuste de los datos experimentales se realizó en *Matlab 7.9.0.529* con la herramienta *curvefitting*.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterización microbiológica del inóculo: LR+LEC

La distribución porcentual de las poblaciones microbianas presentes en la mezcla LR+LEC se presentan en la Figura 2.2. El análisis de la composición microbiana mostró una alta densidad de bacterias anaerobias estrictas (BAS), lo cual es favorable para el arranque del proceso. Las poblaciones de los microorganismos, presente en LR-LEC no fueron afectadas por el proceso de toma de muestra, traslado al laboratorio y durante tiempo de proceso.

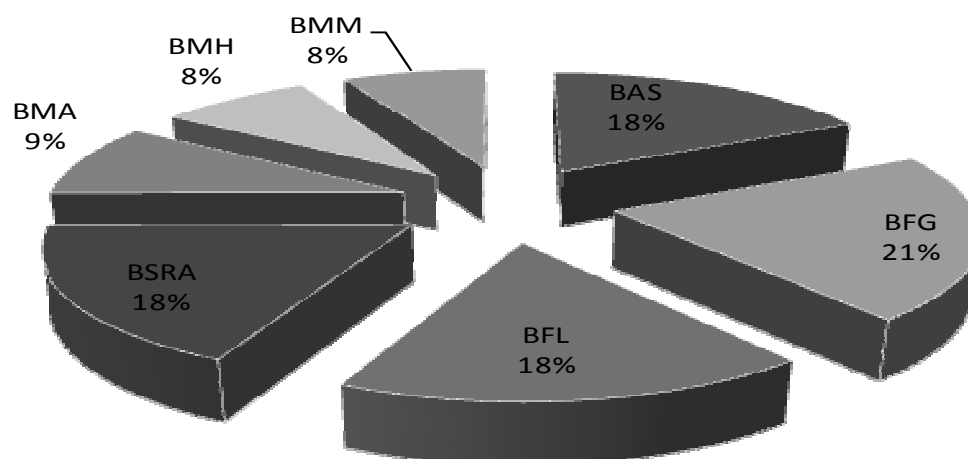


Figura 2.2 Recuento de los grupos tróficos del inóculo (mezcla de LR+LEC) por la técnica del NMP*

*BFG: Bacterias fermentadoras de glucosa; BFL: Bacterias fermentativas de lactato; BSRA: Bacterias sulfatoreductoras del acetato; BMH: Bacterias metanogénicas hidrogenofílicas; BMA: Bacterias metanogénicas acetoclásticas ; BMM: Bacterias metanogénicas del metanol

Fuente: El Autor

El alto recuento de bacterias BFG y BFL indica una mayor actividad enzimática durante las etapas hidrolítica y acidogénica del proceso fermentativo; esta característica del inóculo es favorable dado que la hidrólisis es la etapa limitante de la digestión anaerobia de los sustratos lignocelulósicos. Por otra parte la presencia de BSRA garantiza la metabolización del acetato, ya que estos grupos de bacterias tienen la habilidad de crecer utilizando el metabolismo de la oxidación incompleta de etanol, e incluso en algunos casos pueden llegar a desviar la ruta metabólica hacia la producción de H_2S (Chaves & Díaz-Báez, 2003). El grupo de las BMM, BMH y BMA es denominado bacterias arqueas metanogénicas hidrogenófilas, y son las encargadas de mantener una presión parcial de hidrógeno en un nivel que permita la degradación sintrófica del etanol y el propionato (Gerardi, 2003; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009). La población de las bacterias archibacterias metanogénicas hidrogenófilas presentes en el LR-EC corresponde al 25% del total del recuento de la población microbiana, esto indica que este inóculo tiene un alto potencial de bacterias responsables de la producción de metano. Estos resultados demuestran que el arranque y la estabilidad del proceso de digestión anaerobia es favorable al emplear la mezcla LR+LC debido a que existe una relación simbiótica equilibrada entre los diferentes grupos tróficos.

2.3.2 Operación “Batch”: Influencia de la relación inóculo sustrato y la temperatura sobre el potencial de biometanización del bagazo de fique

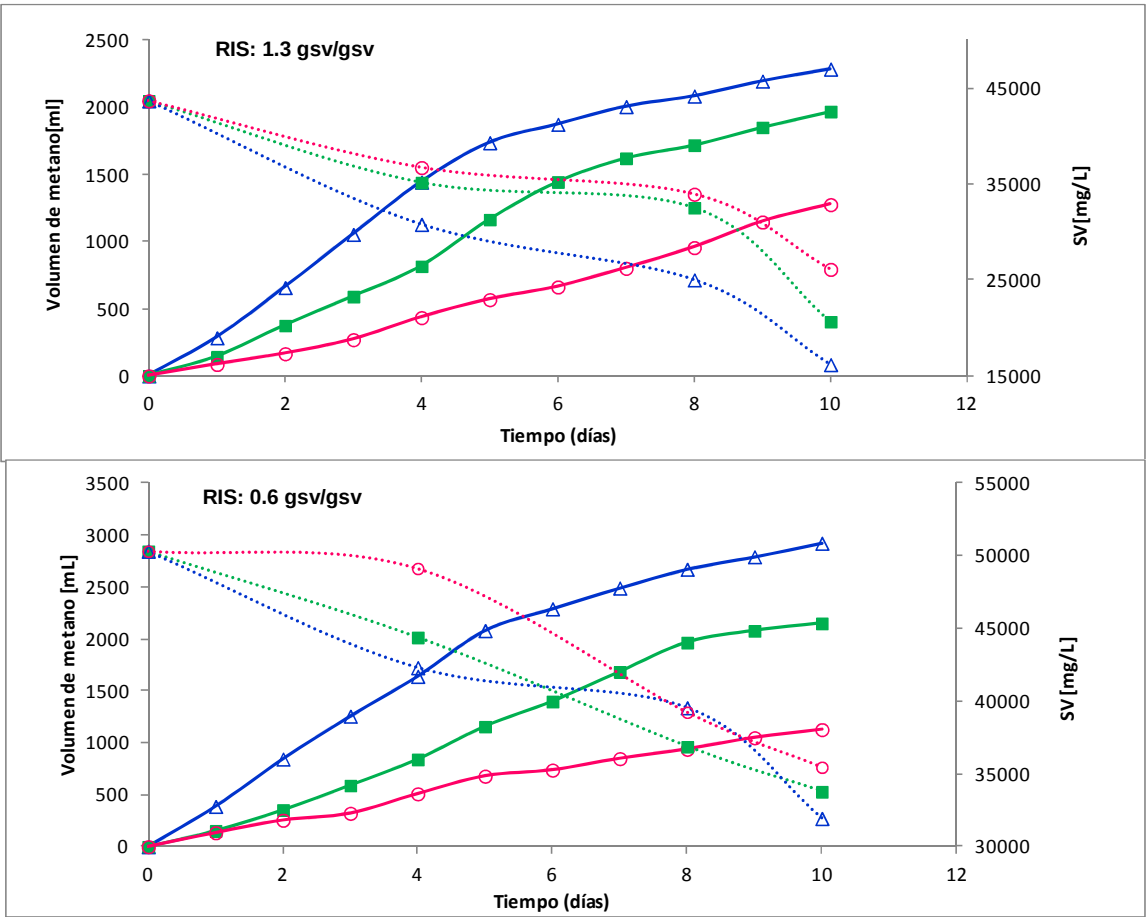
La producción de metano y degradación de sólidos volátiles a diferentes temperaturas (21°C, 39°C, y 55°C) para cada RIS evaluada se muestra en la Figura 2.3. Las mayores producciones de metano después de diez días de digestión 2285 ml, 2920ml y 1721 ml se alcanzaron a 39°C; los porcentajes de metano en el biogás obtenido fueron: 62%, 60% y 59% para la RIS de 1.3, 0.6 y 0.3 respectivamente. Los rendimientos de la producción de metano ($Y_{P/S}$) para cada RIS fueron calculados dividiendo el metano acumulado durante el tiempo de

digestión a condiciones estándar de presión y temperatura por la cantidad de sustrato (g SV) adicionado (Raposo *et al.*, 2006). Los valores obtenidos para cada temperatura se muestran en la Tabla 2.7

Tabla 2.7 Rendimiento de metano del BF a diferentes RIS y temperaturas

RIS	1,3			0,6			0,3		
Temperatura [°C]	21	39	55	21	39	55	21	39	55
$Y_{P/S}$ [m ³ CH ₄ /kg SV adicionado]	0.23	0.30	0.08	0.20	0.25	0.08	0.08	0.09	0.06

Fuente: El Autor



Pasa Figura 2.3

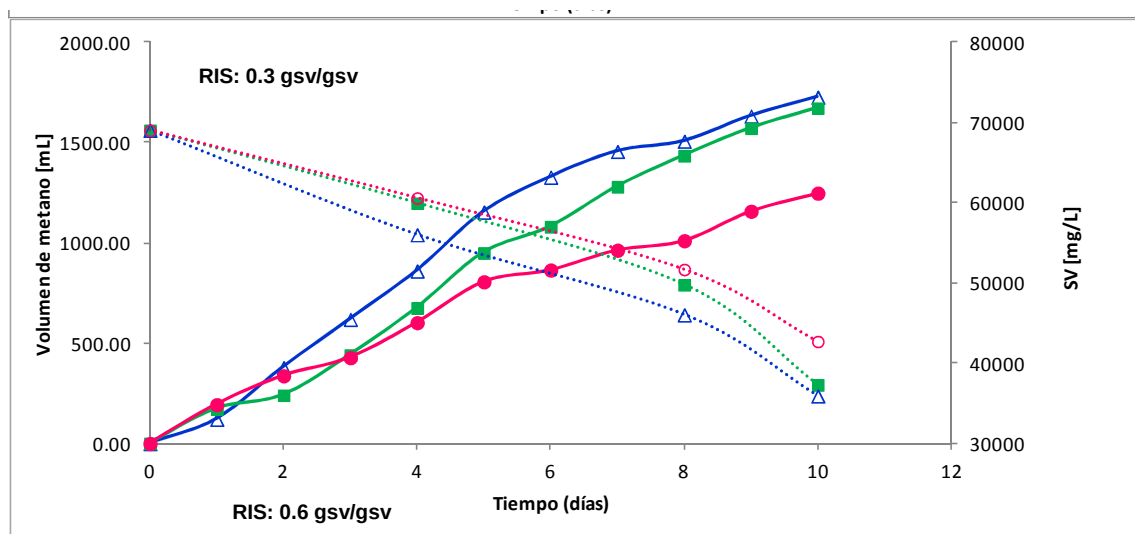


Figura 2.3 Producción de metano a diferentes temperaturas para cada RIS evaluada.

—△— 39°C —■— 21°C —●— 55°C

Fuente: El Autor

Los rendimientos de producción de metano más altos correspondieron a la RIS de 1.3. Estos resultados se correlacionan con los resultados de degradación de sólidos volátiles que a 39°C fueron de 63%, 58% y 48% para las RIS 1.3, 0.6 y 0.3 respectivamente. Según los resultados obtenidos se demuestra el alto potencial de metanización del BF, la eficiente capacidad enzimática del inóculo cuando se desarrolla en un ambiente mesófilo y la marcada influencia de la RIS sobre el potencial de biometanización. Los resultados obtenidos en esta investigación son más altos que los publicados por Raposo *et al.* (2006) quienes alcanzaron un rendimiento de 0.23 m³ CH₄/kg SV adicionado durante la digestión de maíz empleando LPTAR como inóculo a una RIS de 1.

Como se observa en la Tabla 2.7 los rendimientos de metano se reducen drásticamente al utilizar la RIS de 0.3. Esto se debe a una saturación dentro del reactor por exceso de AGVT (21°C: 8220 mg/L; 39°C: 9840 mg/L; 55°C: 10038 mg/L) ocasionando inhibición de la etapa metanogénica y consecuentemente bajos rendimientos en la producción de metano.

La estabilidad del proceso para cada una de las RIS evaluadas a diferentes temperaturas se presenta en la Figura 2.4: El pH para todos los ensayos realizados se mantuvo en un rango entre 6.5 y 8.5, valores propios de la digestión anaerobia; sin embargo, se observa que para la RIS de 0.3 el ratio AGVT/AT es alto, lo cual se traduce en una desestabilización del proceso provocando una disminución en la producción de metano, como se mencionó anteriormente. Similares resultados fueron obtenidos por Neves *et al.* (2004) durante la degradación de desechos de cocina.

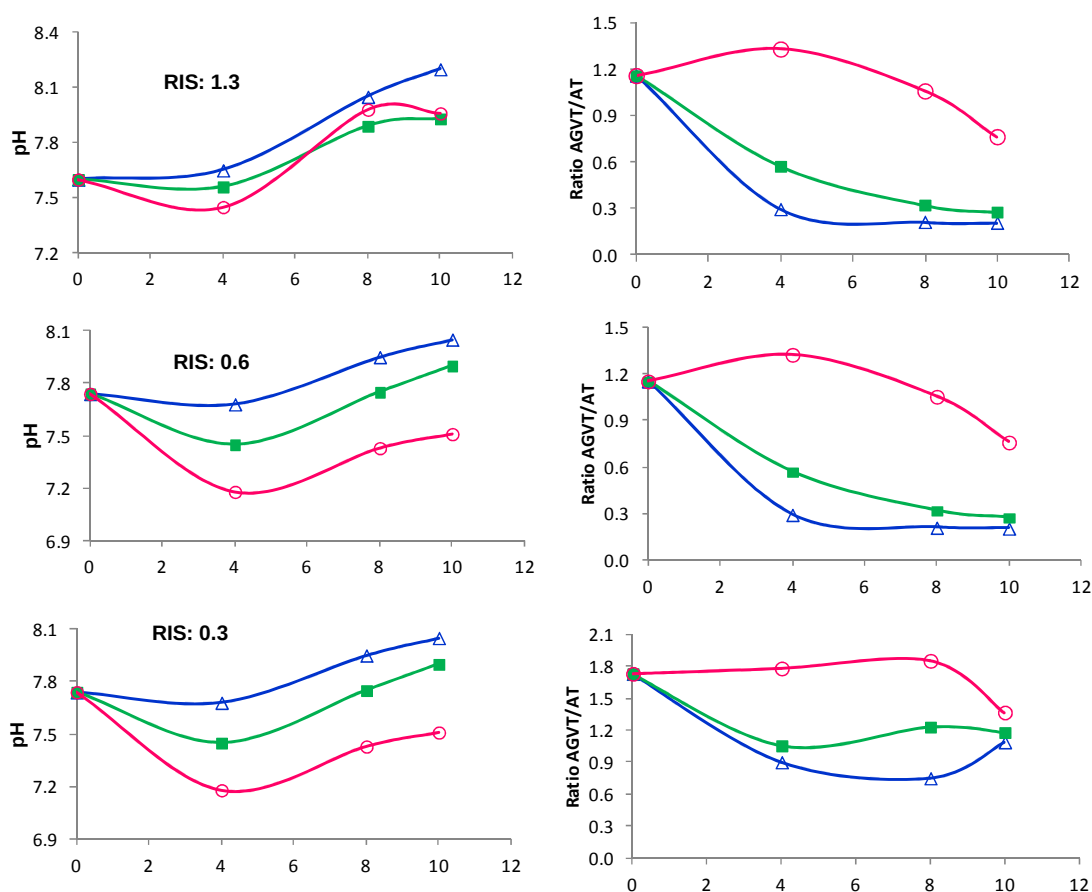


Figura 2.4 Variación de pH y relación AGVT/AT durante el tiempo de digestión a diferentes temperaturas para cada RIS evaluada

—△— 39°C —■— 21°C —○— 55°C

Fuente: El Autor

Los resultados del análisis estadístico (diagrama de paretto) indican que la RIS tiene un efecto positivo sobre el volumen de metano a partir del BF. Sin embargo, no es una variable significativa comparada con el efecto negativo que ejerce el incremento de la temperatura sobre el bioproceso (Figura 2.5). Estos análisis se correlacionan con los rendimientos de producción de metano a las diferentes temperaturas para cada carga orgánica evaluada.

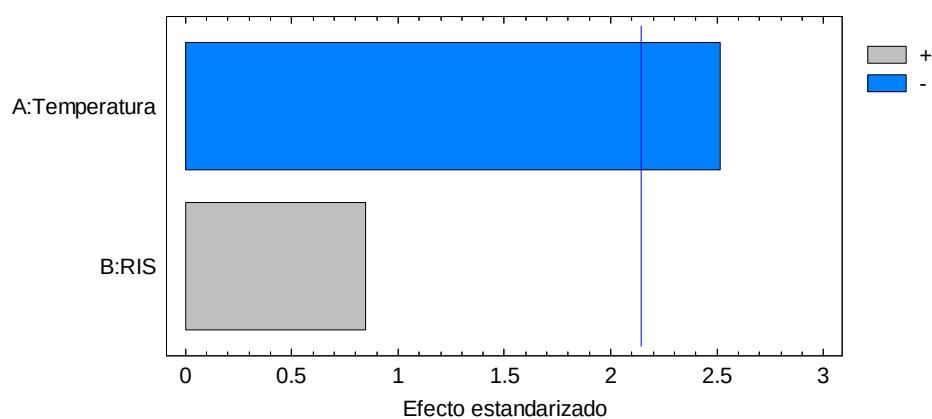


Figure 2.5 Diagrama de Pareto: Efecto de la temperatura y la RIS sobre el volumen de metano.

Fuente: El Autor

Debido a que la RIS de 1.3 fue la que alcanzó el mayor rendimiento de CH_4 , se analizó la influencia de la temperatura sobre el potencial de biometanización del BF. La temperatura se relaciona directamente con la actividad enzimática de los consorcios microbianos presentes en el inóculo (Madigan *et al.*, 2006). Considerando lo anterior, el potencial de biometanización del bagazo aumenta exponencialmente con la temperatura hasta alcanzar el punto óptimo, seguido por un decaimiento exponencial, demostrando la fuerte influencia del rango mesófilo sobre la digestión anaerobia del bagazo de fique (Figura 2.6).

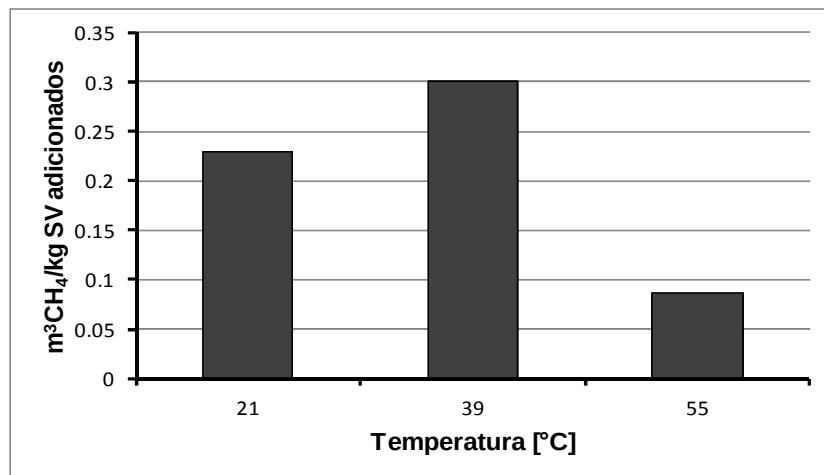


Figura 2.6 Efecto de la temperatura sobre el PBM del bagazo de fique

Fuente: El Autor

La composición porcentual del biogás obtenido fue 65% CH₄, 30% CO₂, 5% otros gases. De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, el máximo potencial de biometanización del bagazo de fique fue de 0.30 m³ CH₄/kg SV adicionado. Este valor fue comparado en términos energéticos (teniendo en cuenta que 1m³ biogás equivale a 1.9 kwh de electricidad) con diferentes sustratos de composición similar al bagazo de fique, (Mshandete *et al.*, 2004; Gunaseelan, 2004; Liu *et al.*, 2009, Tricase & Lombardi, 2009).

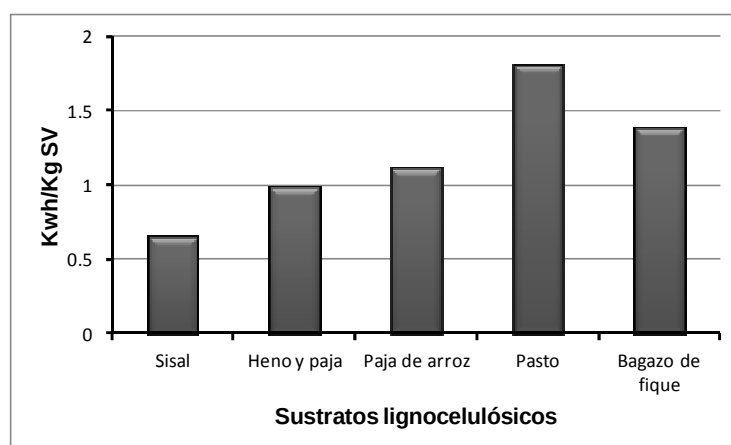


Figura 2.7 Rendimientos de metano de diferentes sustratos lignocelulósicos expresados en kwh/kg SV adicionado

Fuente: El Autor

Según la Figura 2.7, el BF es uno de los residuos lignocelulósicos con mayor eficiencia energética, indicando la viabilidad de utilizar este residuo como una fuente alternativa de energía renovable.

2.3.3 Operación en continuo

2.3.3.1 ART y AGVT en la digestión anaerobia de BF

Los rendimientos de las etapas hidrolítica y acidogénica de la DA se expresan en términos de las concentraciones de ART y AGV, respectivamente. La Figura 2.8 muestra la variación de las concentraciones de ART y AGV durante el tiempo de operación.

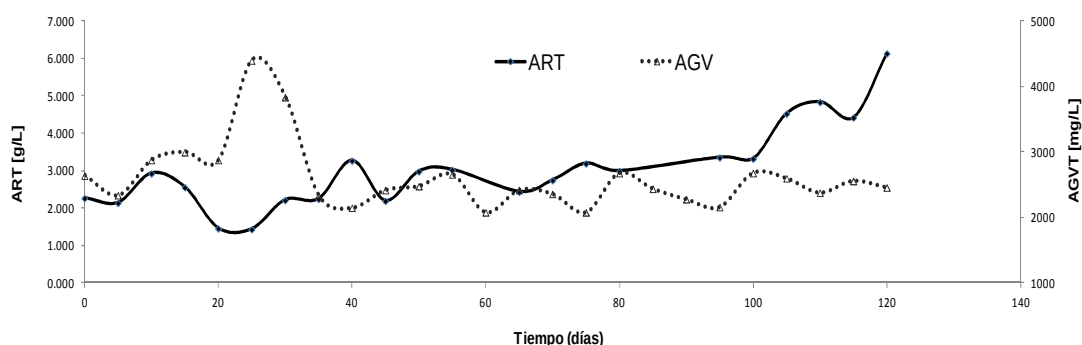


Figura 2.8 Variación de los ART y los AGV durante el tiempo de operación.

Fuente: El Autor

La alta concentración inicial de ART favorece el arranque del proceso y promueve el buen funcionamiento del reactor a lo largo del tiempo de digestión. Los ART son compuestos solubles que son fácilmente metabolizados por los microorganismos, permitiendo llevar a cabo todas las etapas de la digestión (Madigan *et al.*, 2006).

De acuerdo con la figura 2.9, se observan períodos de hidrólisis y de consumo de azúcares durante los primeros 50 días, lo cual es coherente con el metabolismo de las bacterias facultativas encargadas de llevar a cabo las etapas de hidrólisis y

acidogénesis (Angelidaki *et al.*, 2011), este comportamiento demuestra que el consorcio microbiano empleado en este estudio tiene una excelente actividad enzimática. A partir del día 50 hasta el día 100 la concentración de ART se mantuvo constante, lo que indica estabilidad dentro del reactor, a partir del día 100 se presenta un significativo incremento en la concentración de azúcares, producto de la hidrólisis del sustrato.

La variación de los AGV durante el tiempo de digestión es concordante con la variación de ART, teniendo en cuenta que las etapas de hidrólisis y acidogénesis son simultáneas. La máxima concentración de AGVT (4400 mg/l) se presenta el día 25, demostrando que no presenta inhibición en el reactor por acidificación.

Teniendo en cuenta las tendencias de variación de ART y AGVT se demuestra que el consorcio microbiano logra romper la estructura lignocelulósica del bagazo de fique, mejorando la degradabilidad del sustrato y consecuentemente favoreciendo las etapas hidrolítica y acidogénica de la digestión. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Yang *et al.* (2009).

2.3.3.2 Estabilidad de la digestión anaerobia del bagazo de fique

El pH se mantuvo en un intervalo entre 7.0 y 8.0. Estos valores de pH son adecuados para el crecimiento normal de los microorganismos anaerobios. Esto significa que este parámetro fue siempre estable durante todo el bioproceso (Figura 2.9a).

Respecto a la relación AGVT/AT la literatura recomienda un rango entre 0.3-0.4 sin riesgo de acidificación, una vez está estabilizado el proceso (Raposo *et al.*, 2009). En este estudio se obtuvieron valores superiores a 0.4, sin que se presentara riesgo de acidificación. El incremento en el ratio de AGVT/AT se debe

a que el BF es un sustrato ácido comparado con otros sustratos estudiados (Figura 2.9 b).

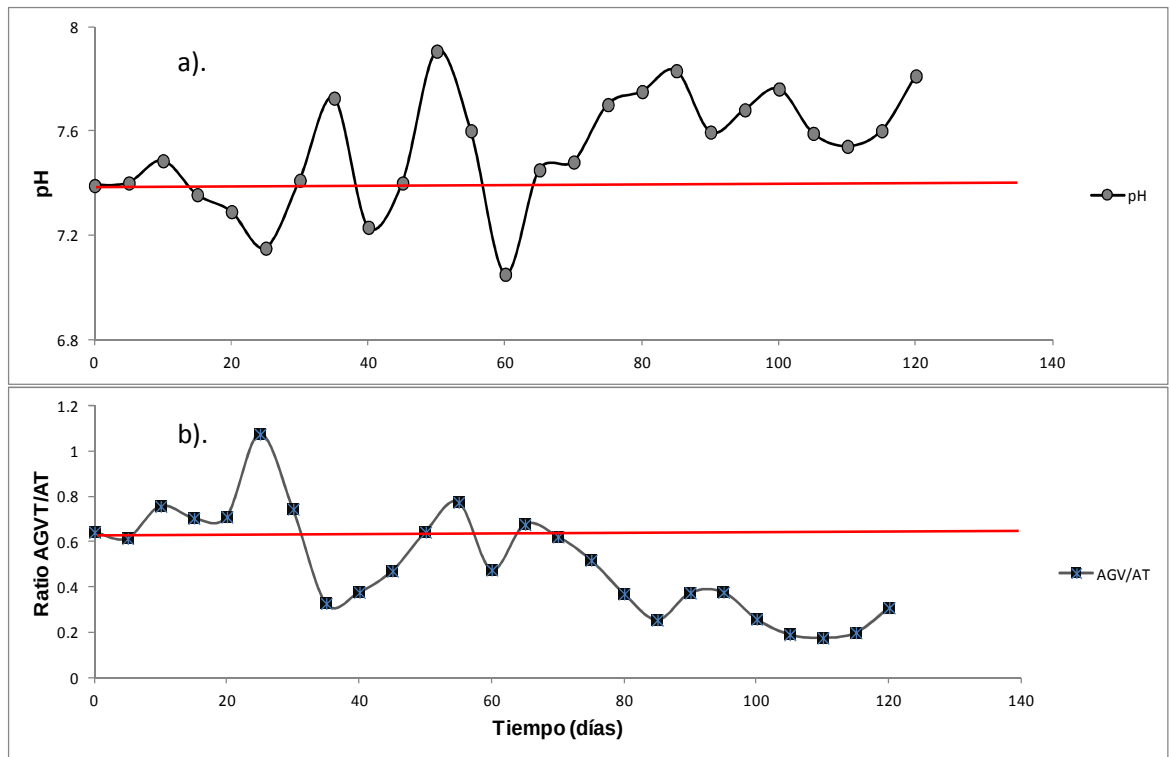


Figura 2.9 a) Variación del pH durante el tiempo de digestión; b) Variación del ratio AGVT/AT durante el tiempo de digestión

Fuente: El Autor

2.3.3.3 Dinámica crecimiento microbiano para la digestión anaerobia del bagazo de fique

En la Figura 2.10 se presenta el crecimiento microbiano de bacterias anaerobias estrictas dentro del reactor durante el tiempo de operación en continuo. Se observan dos puntos mínimos en los días 36 y 66, este comportamiento pudo deberse a un desbalance dentro del reactor, ocasionando unas condiciones en el medio inapropiadas para el crecimiento microbiano. Sin embargo, este desbalance no es significativo, debido a que durante el tiempo de operación se mantuvo una

densidad microbiana de anaerobias estrictas promedio de 1.8×10^8 UFC/ml, favoreciendo la tasa de conversión del bagazo de fique. En la Figura se observa crecimiento microbiano constante debido a la recirculación diaria de biomasa celular.

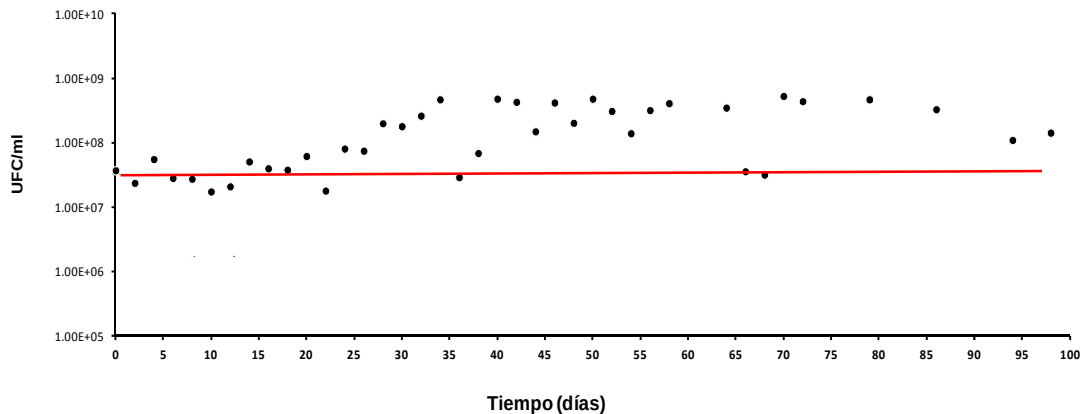


Figura 2.10 Dinámica del crecimiento microbiano en operación continua

Fuente: El Autor

2.3.3.4 Rendimiento del biogás producido a partir del BF

En la mayoría de digestiones anaerobias donde se lleva a cabo operación continua, los reactores pueden presentar incrustaciones debido a que el material no degradado forma una corteza en la parte superior del reactor disminuyendo los rendimientos de producción de biogás, especialmente a escala industrial (Lehtomäki, 2006). El bagazo de fique tiene un tamaño de partícula promedio de 5mm, durante la operación en continuo no se observó acumulación de material no degradado, favoreciendo la alimentación del reactor con una carga orgánica alta ($23.84 \text{ kg SV/m}^3\cdot\text{día}$), además de la alta eficiencia del reactor.

De acuerdo con la Figura 2.11 la digestión anaerobia del bagazo de fique genera en promedio $1.30 \text{ m}^3 \text{ Biogás/m}^3 \text{ reactor}\cdot\text{día}$ que equivalen a 1.90 kwh de electricidad, con una composición de 65% CH_4 , 30% CO_2 y 5% otros gases.

Los resultados alcanzados en este capítulo corroboran que la producción de biogás es una de las tecnologías que puede ser utilizada para disminuir los problemas de calentamiento global, producción de energía renovable y valor agregado a los residuos orgánicos (Asam *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Nges *et al.* (2011) durante la producción de biogás a partir de residuos agro industriales.

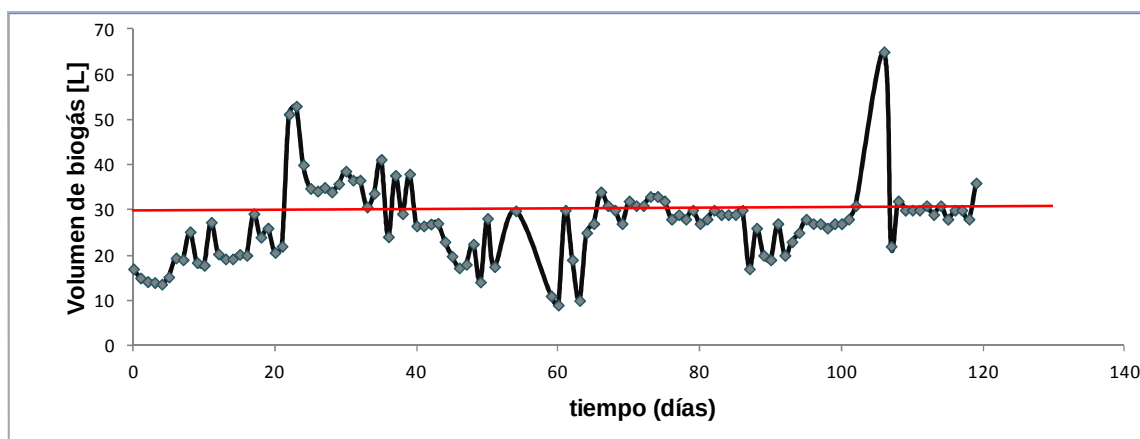


Figura 2.11 Volumen diario de biogás producido a partir del bagazo de fique

Fuente: El Autor

2.3.4 Configuración en una y dos fases

2.3.4.1 Reactor Acidogénico: Fase A

La AH para la configuración en dos fases fue de 0.14 g DQO/g SSV*día y para el reactor convencional fue de 0.11 g DQO/g SSV*día. Estos resultados representan un incremento del 27% en el rendimiento de la etapa hidrolítica en dos fases, comparado con el proceso de digestión anaerobia convencional. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros investigadores. Por ejemplo, Rubia *et*

al. 2009 obtuvieron incrementos de la etapa hidrolítica entre el 20-30% para la digestión anaerobia en dos fases a partir de aceite de girasol. Wei *et al.* 2007 alcanzaron incrementos del 37% en la remoción de DQO de la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia en dos fases de aguas residuales con alto contenido de sulfato.

Dado que la etapa hidrolítica es la limitante del proceso de digestión anaerobia, particularmente en residuos lignocelulósicos (Parawira *et al.*, 2008), el haber conseguido un mayor rendimiento. En la digestión del BF con LR, indica que la separación de fases es favorable para que los diferentes consorcios microbianos no sean inhibidos en sus metabolismos.

Teniendo en cuenta que el reactor acidogénico es operado a 21°C y el reactor convencional a 39°C, se puede inferir que los consorcios microbianos encargados de la etapa hidrolítica no son sensibles a cambios de temperatura, resultados similares fueron encontrados en la literatura (Mahmouda *et al.*, 2004).

Los resultados de AH, se correlacionan con la variación de los AGV, dado que las etapas hidrolítica y acidogénica son simultáneas un incremento en la AH representa un incremento en la concentración de los AGVT (Figura 2.12). La concentración de AGV para la configuración de dos fases se mantuvo en un intervalo entre 4.000-11.000 mg AGVT/L. En este estudio, el porcentaje de acidificación fue de 44%, indicando la conversión de materia soluble a AGVT. Los valores de AGVT obtenidos durante esta investigación, para la degradación de BF con LR, presentan similitud con los valores alcanzados al hidrolizar residuos de aceite de girasol y fracciones orgánicas urbanas con inóculos anaerobios de tratamiento de aguas residuales de cervecería y vino respectivamente (Argelier *et al.*, 1998; Rubia *et al.*, 2009).

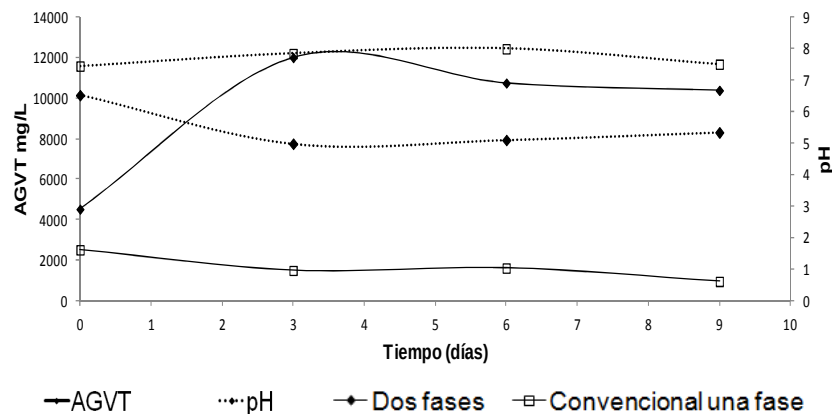


Figura 2.12 Variación de AGVT y pH para la fase A y para el proceso convencional

Fuente: El Autor

En cuanto al proceso convencional, la concentración de AGV se mantuvo estable (900-1600 mg AGV/L) durante el tiempo de fermentación, debido al consumo por parte de los microorganismos acetogénicos (Barrera *et al.*, 2009), corroborando que la mezcla LR-LEC es un inóculo adecuado para la degradación del BF.

En cuanto al comportamiento del pH (Figura 2.12), los valores se redujeron debido al inicio de la producción de AGV y se mantuvieron en un rango entre 6.5 y 5.3. Este intervalo inhibe a los microorganismos metanogénicos y favorece el metabolismo microbiano del consorcio acidogénico, garantizando la separación de fases del proceso (Solera *et al.*, 2002; Raposo *et al.*, 2006; Rubia *et al.*, 2009). En el proceso convencional el pH permaneció estable (aproximadamente 7.5) durante la digestión, lo cual es un comportamiento concordante de la digestión anaerobia en una sola fase.

Los comportamientos de cada uno de los procesos evaluados que se presentan en la Figura 2.12 demuestran un excelente desarrollo tanto para la fase A como para el proceso convencional. Estos resultados son comparables con los publicados por (Rubio & Noyola, 2010).

2.3.4.2 Reactor metanogénico: Fase B

En la Figura 2.13 se muestran los volúmenes de metano acumulado para el proceso realizado en dos fases y convencional.

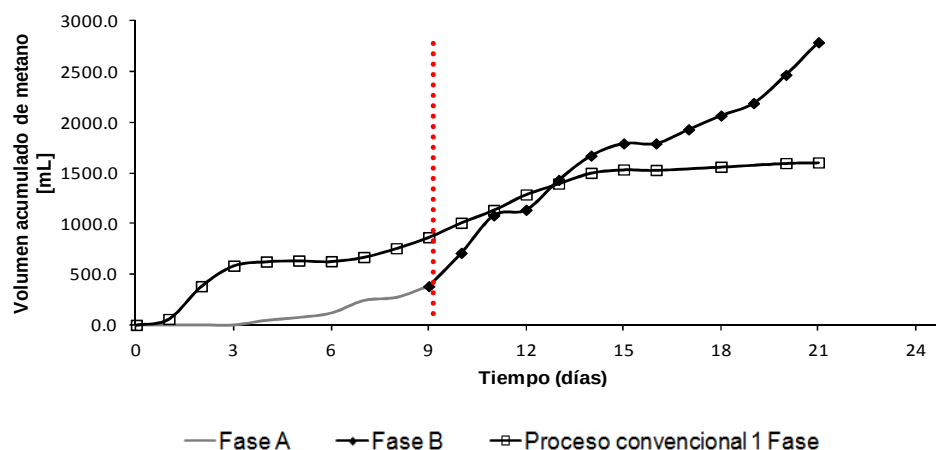


Figura 2.13 Producción de metano para cada uno de los reactores evaluados

Fuente: El Autor

La producción de metano para el proceso en dos fases, fue significativa a partir del arranque del RM (noveno día de operación), demostrando que fue posible desarrollar el proceso en dos fases, incrementando 74% el rendimiento de la producción de metano comparado con el proceso convencional. Los datos presentados en la Figura 2.13 se correlacionan con los alcanzados para el reactor acidogénico, mostrando la efectividad del LR para hidrolizar la materia orgánica lignocelulósica del BF, aprovechando el contenido de carbono del bagazo en la conversión a metano, aumentando la eficiencia del proceso. Estos resultados confirman que la digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos como el BF es más eficiente en un proceso en dos fases que en un proceso convencional.

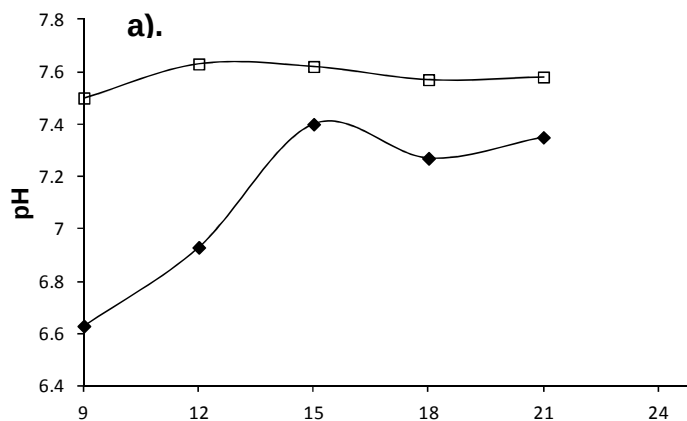
2.3.4.3 Estabilidad del reactor metanogénico: Fase B

La estabilidad de RM se evaluó con la variable control: pH (Figura 2.14 a) y la relación de AGV/AT (Figura 2.14 b).

Para la configuración en dos fases, el pH aumentó de 6 a 7.35, debido a la capacidad buffer del inóculo metanogénico (LEC) alcanzando las condiciones favorables para el consorcio metanogénico (Solera *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2007; Rubia *et al.*, 2009).

La relación AGVT/AT disminuyó como consecuencia del aumento de pH, y se mantuvo en un intervalo entre 0.5 y 1.8 indicando una posible inhibición por acidificación en el reactor disminuyendo los rendimientos de la producción de metano (Raposo *et al.*, 2006; Fezzani & Cheikh, 2010; Rubio & Noyola, 2010). Sin embargo, durante este estudio se comprobó que la producción de metano no disminuye, posiblemente porque la capacidad buffer del sistema compensa los efectos inhibitorios que puedan causar las altas concentraciones de AGVT, por lo anterior se infiere que no se presentó inhibición por acidificación.

Con respecto al proceso convencional, la relación AGVT/AT se conservó en un intervalo de 0,1-0,4, el cual es un rango adecuado para este tipo de sistemas (Dinsdale *et al.*, 2000 Raposo *et al.*, 2006; Rubia *et al.*, 2009).



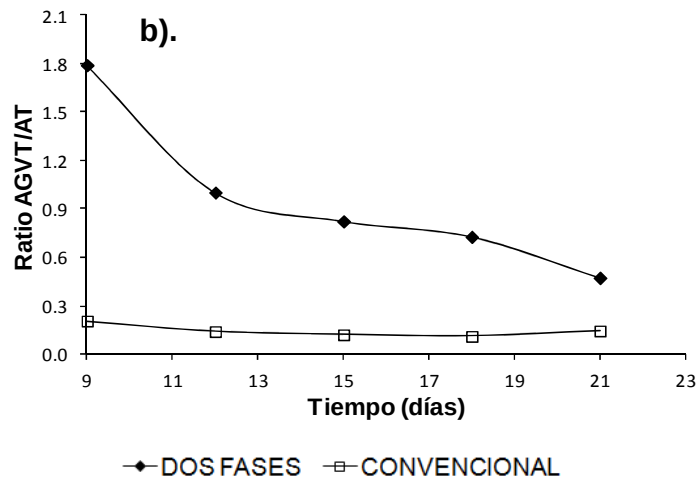


Figura 2.14 Evaluación de la estabilidad de los reactores fase B y convencional: a) pH ; b) Ratio AGV/AT

Fuente: El Autor

2.3.4.4 Influencia de la carga orgánica sobre el volumen de metano producido en dos fases comparado con una fase

En la Figura 2.15 se hace una comparación entre el proceso realizado en dos fases y el proceso convencional de una fase para diferentes cargas orgánicas evaluadas.

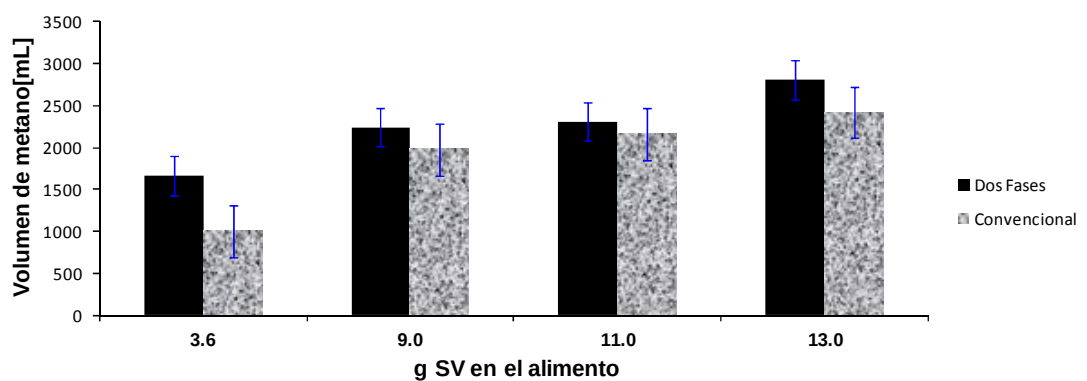


Figura 2.15 Comparación de la producción de metano en un proceso convencional y un proceso en dos fases

Fuente: El Autor

Según los resultados obtenidos, la digestión anaerobia en dos fases tiene la ventaja de tolerar mayores cargas orgánicas que el proceso convencional incrementando el volumen de metano. Sin embargo, la producción de metano en una fase es aceptable. La decisión de realizar el proceso de producción de biogás en una o dos fases depende no solo del rendimiento de metano sino también de criterios técnicos y económicos (Mata-Álvarez, 2003; Nizami & Murphy, 2010). Esta investigación se desarrolló a escala laboratorio y se obtuvieron resultados satisfactorios, que sirven como línea base para investigaciones futuras en la optimización del tratamiento de residuos lignocelulósicos.

2.4 CONCLUSIONES

La caracterización microbiológica del inóculo compuesto por LR+LEC demostró que la mezcla contiene un alto recuento de bacterias fermentativas de glucosa (27.61 NMP) indicando una mayor actividad enzimática durante las etapas hidrolítica y acidogénica del proceso. Esta característica del inóculo es favorable dado que la hidrólisis es la etapa limitante de la digestión anaerobia de los sustratos lignocelulósicos como el bagazo de fique. El máximo potencial de biometanización del bagazo de fique ($0.30 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ adicionados) se obtuvo cuando el proceso se llevó a cabo a una RIS de 1.3 en rango mesófilo en una configuración de una fase.

Se consiguió adaptar al inóculo a temperatura ambiente (21°C) para obtener una conversión del bagazo de fique a metano equivalente a 1.90 kw electricidad/l reactor*día. La digestión anaerobia del bagazo de fique en una configuración en dos fases se ve favorecida al emplear inóculos diferentes en cada fase, aprovechando las propiedades de los consorcios: alta actividad hidrolítica en el caso del líquido ruminal para la fase A y alta actividad metanogénica del lodo estiércol de cerdo en la fase B, alcanzando un incremento de 16% en el volumen de metano con respecto al proceso convencional.

2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO V.; GÓMEZ L.; GARCÍA H.; Rodríguez M. *Producción de biogás a partir de residuos vegetales (II): Biorreactores anaeróbicos*". Ingeniería química ISSN 0210-2064., 433, 2006, 124-128.

ANGELIDAKI I.; ALVES M.; BOLZONELLA D.; BORZACCONI L.; CAMPOS J.; GUWY A.; KALYUZHNYI S.; JENICEK P.; VAN LIER J. "Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays". Water Sci. Technol., 59, 2009, 927-934.

ANGELIDAKI I.; KARAKASHEV D.; BATSTONE D.J.; PLUGGE C.M.; STAMS A.J. "Biomethanation and Its Potential" En: *Methods in Methane Metabolism*. Editor Rosenzweig and Ragsdale. Editorial Elsevier Applied Science, Inglaterra, 2011, 328-347.

APPELS L.; BAEYENS J.; DEGRE`VE J.; DEWIL R. "Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge". Prog Energ Combust., 34, 2008, 755–781.

APHA - American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20th. Washington, USA.

ARCOS M.L.; OSSA F.; DÍAZ E.T. "Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*". Revista Corpoica. 5, 2004, 60-63.

ARGELIER S.; DELGENES J.-P.; MOLETTA R. "Design of acidogenic reactors for the anaerobic treatment of the organic fraction of solid food waste". Bioprocess Eng., 18, 1998, 309-315.

ASAM Z.; POULSEN T.; NIZAMI A.; RAFIQUE R.; KIELY G.; MURPHY J.D. "How can we improve biomethane production per unit of feedstock in biogas plants?". *Applied energ.*, 88, 2011, 2013-2018.

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 fique". *Ion.*, 22, 2009, 21-25.

BORJA R.; RINCÓN B.; RAPOSO F.; ALBA J.; MARTÍN A. "Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste". *Biochem Eng J.*, 15, 2003, 139–145.

BOUALLAGUI H.; TOUHAMI Y.; BEN CHEIKH R.; HAMDY M. "Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes". *Process biochem.*, 40, 2005, 989–995.

BULOCK J.; KRISTLANSEN B. "Anaerobic digestion." En: *Basic Biotechnology*. Editor Hawakes F. y Hawakes D. Editorial Academic press, Inglaterra, 1989, 337-358.

CARDENAS R.; FUENTES E. "Efecto de la Agitación sobre el Proceso de producción de biogás a partir del bagazo de fique a diferentes escalas". Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2011.

CHAVES M.; DÍAZ M. "Evaluación de la toxicidad de un efluente cervecero mediante ensayos de inhibición de la actividad metanogénica". *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 5, 2003, 23-31.

CHEN T.; HASHIMOTO A.G. "Effects of pH and substrate:Inoculum ratio on batch methane fermentation". *Bioresource Technol.*, 56, 1996, 179-186.

CHU L.B.; YANG F.L.; ZHANH X.W. "*Anaerobic treatment of domestic wastewater in a membrane-coupled expended granular sludge bed (EGSB) reactor under moderate to low temperature*". *Process Biochem.*, 40, 2005, 1063–1070.

DEMIRER G.; CHEN S. "*Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure*". *Process Biochem.*, 40, 2005, 3542-3549.

DÍAZ M.C.; ESPITIA S.E.; MOLINA F. *Digestión Anaerobia: Una aproximación a la tecnología*. Editorial Universidad Nacional de Colombia UNIBIBLOS, Colombia, 2002, 43-45.

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*" *Bioresource. Technol.*, 72, 2000, 159-168.

DINUCCIO E.; BALSARI P.; GIOELLI F.; MENARDO S. "*Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses*". *Bioresource Technol.*, 101, 2010, 3780–3783.

FEZZANI B.; BEN R. "*Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature*" *Bioresource Technol.*, 101, 2010, 1628-1634.

FORERO W.; ZÚÑIGA J.M. "*Evaluación de la actividad metanogénica de lodos*" Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2003.

GERARDI M. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. Editorial Wiley Interscience, Estados Unidos, 2003. 81-117.

GUNASEELAN N.V. "*Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks*" Biomass and Bioenergy., 2004, 389-399.

HANSEN K.; ANGELIDAKI I.; AHRING B. "*Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by Ammonia*". Wat. Res., 32, 1998, 5-12.

HILL D.T.; TAYLOR S.E.; GRIFT T.E. "*Simulation of low temperature anaerobic digestion of dairy and swine manure*" Bioresource Technol., 78, 2001, 127-131.

HU Z.; YU H. "*Anaerobic digestion of cattail by rumen cultures*". Waste Managment., 26, 2006, 1222-1228.

HUNGATE R.E. En: "*A roll tube method for cultivation of strict anaerobes*" Editor: Wolfgang K. Joklik. Editorial ASM press, USA, 1970, 117-132.

KABOURIS J.C.; TEZEL U.; PAVLOSTATHIS S.G.; ENGELMANN M.; DULANEY J.; GILLETTE R.A.; TODD A.C. "*Methane recovery from the anaerobic codigestion of municipal sludge and FOG*". Bioresource Technol., 100, 2009, 3701-3705.

KANWAR S.S.; GULERI R.L. "*Performance evaluation of a family size rubber balloon biogas plant under hilly conditions*". Bioresource Technol., 50, 1994, 119–121.

KAPARAJU P.; ELLEGAARD L.; ANGELIDAKI I. "*Optimisation of biogas production from manure through serial digestion: Lab-scale and pilot-scale studies*". Bioresource Technol., 100, 2009, 701-709.

KASHYAP D.R.; DADHICH K.S.; SHARMA S.K. "*Biomethanation under psychrophilic conditions: a review*" Bioresource Technol., 87, 2003, 147–153.

KUMAR S. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications*. Editorial Blackwell Publishing, Estados Unidos, 2008, 29-63.

LEHTOMÄKI A. *Biogas production from energy crops and crop residue*. Editorial Board, Finlandia, 2006, 70-73.

LI Y.; PARK S.Y; ZHU J. "Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste". *Renew sust energ rev.*, 15, 2011, 821–826.

LIU G.; ZHANG R.; EL-MASHAD H.M.; DONG R. "Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes". *Bioresource Technol.*, 100, 2009, 5103–5108.

MADIGAN MT.; MARTINKO J.M.; PARKER J. "Brock biología de los microorganismos". Pearson Prentice Hall., 10, 2006, 151-159.

MAHMOUDA N.; ZEEMANA G.; GIJZEN H.; LETTINGA G. "Anaerobic stabilisation and conversion of biopolymers in primary sludge—effect of temperature and sludge retention time". *Water Res.*, 38, 2004, 983–991.

MATA-ALVAREZ J. "Some fundamentals of the anaerobic digestion process" En: *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. Editorial IWA, España, 2003, 5-20.

MILLER G. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Anal. Chem.*, 31, 1959, 426-428.

MSHANDETE A.; BJÖRNSSON L.; KIVAISI A.; RUBINDAMAYUGI ST; MATTIASSON B. "Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment". *Water Research.*, 39, 2005, 1569–1575.

MSHANDETE A.; KIVAIISI A.; MUGASSA R.; BO M. "*Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes*". Bioresource Technol., 951, 2004, 19-24.

MYINT M.; NIRMALAKHANDAN N.; SPEECE R.E. "*Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogénesis*". Water Research., 41, 2007, 323 – 332.

NEVES L.; OLIVEIRA R.; ALVES M.M. "*Influence of inoculums activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculums ratios*". Process Biochem., 39, 2004, 2019-2024.

NGES I.A.; ESCOBAR F.; FU X.; BJÖRNSSON L. "*Benefits of supplementing an industrial waste anaerobic digester with energy*". Waste Managent. XXX, 2011, 1-7.

NIZAMI A.; MURPHY J.D. "*What type of digester configurations should be employed to produce biomethane from grass silage?*". Renew Sust Energ Rev., 14, 2010 1558–1568.

PARAWIRA R.; READ J.; MATTIASON B.; BJÖRNSSON L. "*Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion*". Biomass Bioenerg., 32, 2008, 44-50.

PARK M.J.; HYE J.J.; PARK D.; SUNG L.D.; MOON P.J. "*Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses*". Int J Hydrogen Energ., 35, 2010, 6194-6202.

PAVLOSTATHIS S. G.; GIRALDO-GOMEZ E. *"Kinetics of anaerobic treatment: A critical review"*. Crit. Rev. Environ. Control., 21, 1991, 411–490.

PROCHNOW A.; HEIERMANN M.; PLÖCHL M.; LINKE B.; IDLER C.; AMON T.; HOBBS P.J. *"Bioenergy from permanent grassland-A review: 1. Biogas"*. Bioresource Technol., 100, 2009, 4931–494.

QUINTERO M.; CASTRO L.; ORTIZ C.; GÚZMAN C.; ESCALANTE H. *"Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example"*. Bioresource Technol. DOI 10.1016/j.biortech., 12, 2011, 052.

RAPOSO F.; BANKS C.J.; SIEGERT I.; HEAVEN S.; BORJA R. *"Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests"*. Process biochem., 41, 2006, 444–1450.

RAPOSO F.; BORJA R.; MARTÍN M.A.; MARTÍN A.; DE LA RUBIA M.A.; RINCÓN B. *"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, 2009, 70-77.

RAPPORT J.; ZHANG R.; JENKINS B.; WILLIAMS R. California Environmental Protection Agency. *"Current anaerobic digestion technologies used for treatment of municipal organic solid waste"*, California, Estados Unidos, 2008. Disponible: <http://www.calrecycle.ca.gov/Publications/Organics/2008011.pdf>.

RUBIA M.A.; RAPOSO F.; RINCÓN B.; BORJA R. *"Evaluation of the hydrolytic–acidogenic step of a two-stage mesophilic anaerobic digestion process of sunflower oil cake"*. Bioresource Technol., 100, 2009, 4133–4138.

RUBIO-LOZA L.; NOYOLA A. *"Two-phase (acidogenic-methanogenic) anaerobic thermophilic/mesophilic digestion system for producing Class A biosolids from municipal sludge"*. Bioresource Technol., 101, 2010, 576-585.

RUEDA M.F.; SANABRIA N. *"Producción de biogás a partir del bagazo de fique en un bioproceso configurado en dos fases"*. Trabajo de grado de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2011.

SANDOVAL C.J.; VERGARA M.; CARREÑO M.; CASTILLO E.F. *"Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment"*. Waste Manage., 29, 2009, 704-711.

SCHINK B.; ZEIKUS G. *"Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments"*. J General microbiol., 128, 1982, 393-404.

SILVA W.; DUARTE V.; PRASAD S. *"Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste"*. Bioresource Technol., 94, 2004, 261-266.

SOLERA R.; ROMERO L.; SALES D. *"The Evolution of Biomass in a Two-phase Anaerobic Treatment Process During Start-up"* Chem. Biochem. Eng., 16, 2002, 25-29.

TRICASE C.; LOMBARDI M. *"Review: State of the art and prospects of Italian biogas production from animal sewage: Technical-economic considerations"*. Renew energ., 34, 2009, 477-485.

VALDEZ-VAZQUEZ I.; POGGI-VARALDO H. *"Hydrogen production by fermentative consortia"*. Renew Sust Energ Rev., 13, 2009, 1000–1013.

VAVILIN V.A.; FERNANDEZ B.; PALATSI J.; FLOTATS X. "*Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview*". Waste Managment., 28, 2008, 939–951.

WANG L.; PEREIRAN N.; HUNG Y. Biological treatment processes. Editorial Humana press, Estados Unidos, 2009, 591-596.

WARD A.J.; HOBBS P.J.; HOLLIMAN P.J.; JONES D.L. "*Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources*". Bioresource Technol., 99, 2008, 7928–7940.

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*". J Environ Sci., 19, 2007, 264-270.

XIE S.; LAWLOR P.G.; FROST J.P.; HU Z.; ZHAN X. "*Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage*". Bioresource Technol., 102, 2011, 5728-5733.

YANG S.; LI J.; ZHENG Z.; MENG Z.. "*Lignocellulosic structural changes of *Spartina alterniflora* after anaerobic mono- and co-digestion*". Int Biodeter biodegr., 63, 2009, 569-575.

YUE Z.; YU H.; HARADA H.; LI Y. "*Optimization of anaerobic acidogenesis of an aquatic plant, *Canna indica* L., by rumen cultures*". Water Research., 41, 2007, 2361 – 2370.

ZENG S.; YUAN X.; SHI X.; QIU Y. "*Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp*". J Hazard mater., 178, 2010, 89-93.

III. CAPITULO: PRE-TRATAMIENTOS DEL BF PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

Una de las alternativas para mejorar la producción de biogás a partir de residuos lignocelulósicos es mediante pre tratamientos al sustrato con el objeto de romper las cadenas de polímeros haciendo más accesible los compuestos solubles. Un pre-tratamiento ideal es aquel que logra incrementar el área superficial y reduce el contenido de lignina y cristalinidad de la celulosa (Mata-Alvarez *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 2007).

Los pre-tratamientos se clasifican en tres categorías: a) físicos que consisten en someter la biomasa a la reducción del tamaño de partícula mediante molienda, temperatura, radiación, vapor, secado y/o humectación, b) químicos, donde la biomasa es sometida a la acción de H_2SO_4 y $NaOH$, H_2O_2 , con el fin de alterar la estructura del material y c) biológicos, mediante los cuales un cultivo de microorganismos actúa sobre la biomasa y produce enzimas requeridas para degradar la lignina. Así mismo se pueden combinar los tratamientos para alcanzar una mayor efectividad (Zheng *et al.*, 2009; Harmsen *et al.*, 2010).

Mientras que los pre tratamientos han sido ampliamente estudiados para facilitar la hidrólisis enzimática y consecuentemente la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos (Sun & Cheng, 2002), el efecto de los pre-tratamientos sobre el potencial de biometanización de residuos lignocelulósicos no ha sido suficientemente investigado.

Para el presente estudio, el bagazo de fique fue tratado mediante diferentes métodos con el objetivo de incrementar el potencial de biometanización. Se evaluaron los siguientes tratamientos: reducción de tamaño de partícula (mecánico), hidrotérmico y oxidativo. Estos tratamientos fueron considerados debido a su bajo requerimiento energético.

3.1. ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica está compuesta por celulosa, hemicelulosa (que en conjunto se les llama holocelulosa) y lignina; asociadas entre sí, proveen soporte estructural a la pared celular (Hendriks & Zeeman, 2009). Estas fracciones varían cualitativa y cuantitativamente de acuerdo al tipo de biomasa (Fernandes *et al.*, 2009). Por ejemplo, las maderas duras contienen una mayor cantidad de lignina que la paja. Estas diferencias se observan en la tabla 3.1. En adición a estos compuestos, los sustratos lignocelulósicos pueden contener carbohidratos no estructurales (glucosa, fructosa y sucrosa), proteínas, lípidos, extractivos (materiales orgánicos e inorgánicos que están presentes en la madera e influyen sobre las propiedades organolépticas del material) y pectinas (Sun & Chen, 2002).

Tabla 3.1 Composición de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos*.

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	%CELULOSA	%HEMICELULOSA	%LIGNINA
Tallos de maderas duras	40-55	24-40	18-25
Tallos de maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Mazorca	45	35	15
Paja de arroz	32.1	24	18
Bagazos	33.4	30	18.9
Bagazo de Fique	41.81	22.17	15.56
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Pasto	45	31.4	12
Papel	85-99	0	0-15
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Papel de desecho de pulpas químicas	60-70	10-20	5-10
Sólidos primarios de aguas de desecho	8-15	ND	24-29
Desechos de cerdos	6	28	ND
Estiércol sólido de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7

*Fuente: Sun & Chen, 2002; Quintero *et al.*, 2011

La principal fracción polimérica del bagazo de fique y que se encuentra en mayor proporción es la celulosa; este polisacárido (carbohidrato no reductor) es insoluble en agua, insípido y posee un peso molecular altamente elevado. La celulosa está compuesta por unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos β -1,4. Estructuralmente consta de una parte cristalina (organizada), y otra amorfa (Hendriks & Zeeman, 2009). La parte cristalina de la celulosa confiere protección a la célula y constituye un impedimento estérico al ataque de reactivos; no ocurre lo mismo con la celulosa amorfa que es más susceptible de ser atacada.

Las hemicelulosas son carbohidratos que forman una estructura polimérica compleja, ramificada que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares: pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares (Hendriks & Zeeman, 2009). La hemicelulosa suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa. La principal función de la hemicelulosa es servir como conexión entre las fibras de lignina y celulosa con el fin de brindar mayor rigidez a la estructura celulosa-hemicelulosa-lignina (Saha, 2003).

La lignina, es un polímero ramificado, amorfo y heterogéneo constituido por unidades de fenilpropano (p-cumarílico, coniferílico y alcohol sinapílico) unidos por diferentes clases de enlaces. Tiene función en el ámbito estructural, para mantener unidos la celulosa y las hemicelulosas entre sí (Mosier *et al.*, 2005). La lignina es un heteropolímero insoluble en agua y soluble en álcalis fuertes, ópticamente inactiva, extremadamente resistente a la acción de microorganismos y a la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular; lo anterior, hace difícil su degradación (Prasad *et al.*, 2009; Hendriks & Zeeman, 2009). Su función principal es proporcionar rigidez a la pared celular del material y evitar la acción de microorganismos (Sun *et al.*, 2000).

3.2. INCREMENTO DEL RENDIMIENTO DE BIOGÁS MEDIANTE PRE-TRATAMIENTOS

La digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos es un proceso biológico que combina la generación de energía renovable (sin afectar la disponibilidad de alimentos) con un adecuado tratamiento de los residuos. Por esta razón, se ha incrementado en los últimos años para el tratamiento de diversos sustratos lignocelulósicos. Sin embargo, los materiales lignocelulósicos son resistentes a la conversión en biogás por su compleja composición y estructura, siendo la hidrólisis la etapa limitante del bioproceso (Bruni-B *et al.*, 2010; Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

3.2.1. Tratamiento mecánico

El tratamiento mecánico (reducción de tamaño de partícula) incrementa el área disponible para el ataque enzimático y ofrece facilidades para ser aplicado a escala industrial, incrementando los rendimientos de metano hasta en un 25% (Bruni-A *et al.*, 2010). Aunque el tratamiento mecánico ha sido ampliamente investigado, los resultados reportados del efecto del tamaño de partícula sobre el PBM de materiales lignocelulósicos ha sido parcialmente inconsistentes. En ensayos *batch* empleando como sustratos pasto bermuda, paja de trigo y paja de arroz, se incrementa el PBM con la reducción del tamaño de partícula, pero no existen diferencias significativas de los rendimientos de metano entre los menores tamaños de partícula evaluados ($0.23 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV add}$ para un tamaño de 0.09 mm y $0.23 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV add}$ para partículas de 0.40 mm) (Sharma *et al.*, 1988). Investigaciones realizadas empleando como sustrato residuos de tomate con variación del tamaño de partícula en un rango entre 1.30 mm y 20 mm, señalaron que la producción de metano es inversamente proporcional a este parámetro (Hills & Nakano, 1984). Otros estudios reportaron incrementos del 20% en la producción de metano utilizando biofibras de estiércol macerado con tamaño de partícula de 0.35 mm comparados con los obtenidos en fibras de 2 mm y 5 mm, sin embargo,

no reportan diferencias significativas para tamaños de fibra mayores de 5 mm (Angelidaki & Ahring, 2000).

En el caso del sisal, la actividad hidrolítica aumenta significativamente con la reducción del tamaño del sustrato, mejorando la producción de metano de $0.18 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{Kg SV}$ a $0.22 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{Kg SV}$ (Mshandete *et al.*, 2006). Castro *et al.* (2010) comprobaron que la reducción de tamaño del bagazo de fique favorece los rendimientos en la producción de metano a temperatura ambiente (21°C). Por otra parte, se ha evaluado el efecto del tamaño de partícula sobre la cinética hidrolítica, empleando residuos de maíz como sustrato y se determinó una hidrólisis máxima del 95% para el menor tamaño de partícula correspondiente a 0.35 mm, comparada con un 92% y un 88% para fibras de 1.68 mm y fibras sin cortar respectivamente (Saldes *et al.*, 2005).

3.2.2. Tratamiento hidrotérmico

Teniendo en cuenta que la solubilización de los componentes de la hemicelulosa y de la lignina se lleva a cabo a una temperatura entre 150°C y 200°C en medio acuoso, el tratamiento hidrotérmico se presenta como una posibilidad de tratar la biomasa lignocelulósica (Garrote *et al.*, 1999). El proceso hidrotérmico incluye autohidrólisis, autoclave, hidrotermólisis, licuefacción y extracción acuosa (Carvalho *et al.*, 2008). Durante este pre tratamiento, ocurre una reacción de despolimerización de la hemicelulosa catalizada por los iones hidronio (Caparros *et al.*, 2006). En la autohidrólisis de la paja de trigo y de aserrín se encontró que temperaturas superiores a 200°C provocan cambios desfavorables en la composición del hidrolizado, y reduce el contenido de monosacáridos (Targonsky, 1985). En otros estudios donde se trataron astillas de arce de azúcar a una temperatura de 160°C y una relación biomasa/agua de 0.25 se consiguieron concentraciones de xilosa y glucosa de 28.84 g/L y 4.40 g/L, respectivamente (Xu Jian & Liu Shijie, 2009). Diferentes biomásas como cañabrava, tusa de mazorca,

cascarilla de arroz y fibra usada de cervecería fueron tratadas mediante procesos hidrotérmicos donde se observó una dependencia importante de la cinética de reacción en la temperatura. A mayor temperatura de tratamiento menor será el tiempo de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, sin embargo, no se aprecian diferencias significativas en la cantidad de biomasa hidrolizada a diferentes temperaturas, adicionalmente los investigadores señalan que la variación de la relación líquido/sólido no influye en el hidrolizado (Carvalho *et al.*, 2004; Caparros *et al.*, 2006; Garrote *et al.*, 2007).

En relación con el efecto del tratamiento hidrotérmico sobre la producción de metano, la literatura es limitada. Recientemente, Bruni-A *et al.* (2010) estudiaron la aplicación del tratamiento hidrotérmico a las fibras de estiércol digerido, alcanzando un incremento del 29% en la producción de metano con respecto a las fibras no tratadas. Una de las grandes ventajas que presentan el proceso hidrotérmico es que se trata de una tecnología amigable con el ambiente y puede ser utilizada para cualquier tipo de biomasa lignocelulósica (Garrote *et al.*, 1999).

3.2.3. Tratamiento Oxidativo

La adición de agentes oxidantes como peróxido H_2O_2 favorece la remoción de lignina. La efectiva deslignificación puede ser atribuida a la alta reactividad de los compuestos oxidantes con el anillo aromático, con este tratamiento el polímero de lignina puede ser convertido en ácido carboxílico (Harmsen *et al.*, 2010). Además de la remoción de la lignina, el tratamiento oxidativo puede afectar la fracción de hemicelulosas ocasionando pérdida de azúcares. Dentro de las ventajas de este tratamiento químico se encuentran la rápida velocidad de reacción a bajas temperaturas, viabilidad técnica y económica comparada con otros tratamientos como la explosión por vapor (Carvalho *et al.*, 2008).

3.3. EXPERIMENTACIÓN

3.3.1. Pre-tratamientos

Para los pre-tratamientos hidrotérmico y oxidativo se desarrolló un diseño factorial de experimentos con el objeto de determinar las mejores condiciones de operación del tratamiento. La actividad hidrolítica fue medida como variable de respuesta (datos no mostrados). Teniendo en cuenta los resultados del diseño de experimentos se realizaron los pre-tratamientos que se presentan a continuación. Para cada tratamiento se incluyó un experimento control (BF sin tratar). En el caso de los pre-tratamientos mecánico y oxidativo el BF fue secado al sol durante 36 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.1.1. Hidrotérmico

El tratamiento hidrotérmico se llevó a cabo en reactores herméticos (agrafados con corchos de butilo) de 0.5 l, los cuales contenían BF y agua destilada a una relación 10 ml H₂O/g SV BF. El calentamiento de los reactores se realizó en un autoclave (con agua saturada a 121°C) durante 30 minutos. Se incluyó un experimento control (BF sin tratar).

3.3.1.2. Oxidativo

El bagazo de fique seco fue tratado con una solución de peróxido de hidrógeno a una concentración de 2% v/v (de acuerdo con los resultados obtenidos del diseño de experimentos). Esta solución fue alcalinizada con NaOH hasta llevarla a un pH de 11.5, con el fin de optimizar el rendimiento de carbohidratos disponibles obtenidos durante el tratamiento (Gould, 1989). Se utilizó una relación de solución de peróxido alcalinizado con bagazo de fique seco de 2.5 ml H₂O₂/g SV BF. El tratamiento oxidativo se llevó a cabo durante 3 horas en un reactor de 3 l, con

agitación constante de 150 rpm, provisto de un baño termostatado para mantener la temperatura en 50°C. Se midió el pH durante el tiempo del pre-tratamiento. Transcurrido el tiempo de pre-tratamiento el hidrolizado se separó en una fracción sólida (bagazo hidrolizado para digestión) y una fracción líquida (licor-residuo). La fracción sólida se lavó con agua hasta alcanzar un pH de 7.0 y se secó al sol durante 36 horas.

3.3.1.3. Mecánico

El BF seco se redujo a tamaño de partícula de 0.8 mm y 2.36 mm por molienda empleando un molino de cuchillas *Willey-Mil*. Se diseñó un experimento control con bagazo de fique sin cortar (5mm aproximadamente).

3.3.2. Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa

La lignina, celulosa y hemicelulosa se calcularon a partir de la fibra detergente ácida, la fibra detergente neutra y la fibra de Kurschner (Ecuaciones 3.1-3.3) (Goering & Van Soest, 1970).

$$\text{Lignina} = ([\text{Fibra Detergente Ácida}] - 0.8*[\text{Proteína Cruda}] - 0.4*[\text{Extracto Etéreo}]) - [\text{FDK}] \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$\text{Hemicelulosa} = [\text{Fibra Detergente Neutra}] - [\text{Fibra Detergente Ácida}] - 0.4*([\text{Cenizas}] - [\text{Sílice}]) - 0.4*([\text{Extracto Etéreo}] - 0.1*[\text{Proteína Cruda}]) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$\text{Celulosa} = [\text{FDK}] - [\text{Sílice}] - 0.2*([\text{Cenizas}] - [\text{Sílice}]) \quad \text{Ecuación 3.3}$$

3.3.3. Análisis de difracción rayos x del BF

El índice de cristalinidad se determinó como medida de accesibilidad de los microorganismos sobre el sustrato (BF) tratado y sin tratar, usando el difractómetro *SIEMENS* modelo D500. Las muestras se maceraron en un mortero de ágata y el espécimen seleccionado de la muestra fue montado en un

portamuestra de aluminio mediante la técnica de llenado frontal. El análisis se realizó a 40 (Kv), con una corriente de 30 (mA), rendija de divergencia de longitud 0.15 mm, provisto de una fuente de Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Las muestras se corrieron en un rango de $2-70^\circ (2\theta)$ a $2^\circ/\text{min}$. Los resultados se compararon a través del cálculo del índice de cristalinidad de la muestra (Yang *et al.*, 2009).

$$CrI = 100 * \left(\frac{I_{002} - I_{amorfa}}{I_{002}} \right) \quad \text{Ecuación 3.4}$$

En donde:

I_{002} =intensidad del pico en el máximo de 2θ entre 22° y 23° .

I_{amorfa} = intensidad del pico en el mínimo de 2θ entre 18° y 19° .

3.3.4. Análisis micrográfico del BF

Las micrografías del BF tratado y sin tratar fueron realizadas utilizando un videomicroscopio HIROX KH. 7700 con un aumento de 50 x.

3.3.5. PBM del BF pre-tratado

En la Figura 3.1 se presenta un diagrama general del proceso para cada tratamiento evaluado.

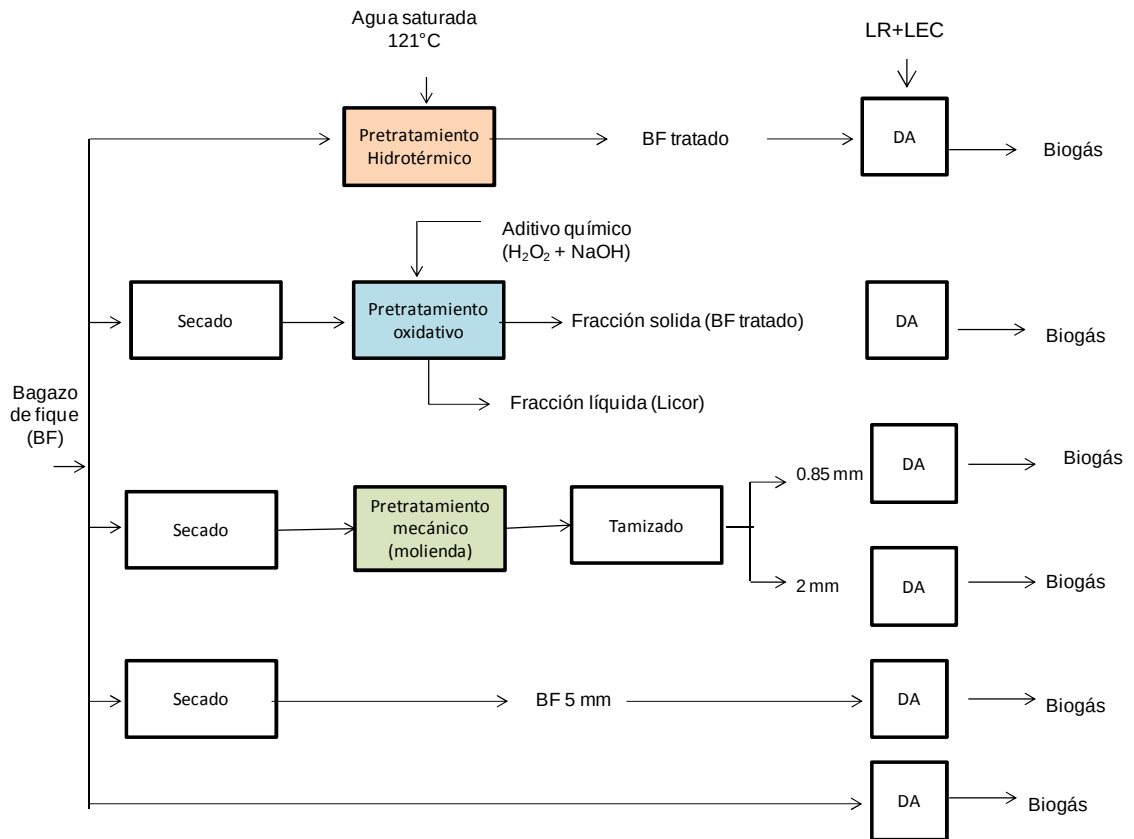


Figura 3.1 Diagrama general del proceso para cada pre-tratamiento evaluado

Fuente: El Autor

El potencial de biometanización fue determinado en reactores *batch* de 500 ml empleando como inóculo la mezcla de LR+LEC, con una RIS de 1.3 g SV/g SV, a $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 días de operación. Se procesó un blanco que contenía solo inóculo y un experimento control (BF sin tratar). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Como variables de control y estabilización del proceso se cuantificó la concentración de ART, AGVT, la variación de pH, la relación AGVT/AT, ST, SV y volumen diario de metano (condiciones estándar de presión y temperatura) según los protocolos descritos (Miller, 1959; APHA, 1998; Angelidaki *et al.*, 2009).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Efecto de los pre-tratamientos sobre la estructura lignocelulósica del BF

Los cambios en la composición porcentual de la estructura lignocelulósica del bagazo de fique se observan en la Figura 3.2.

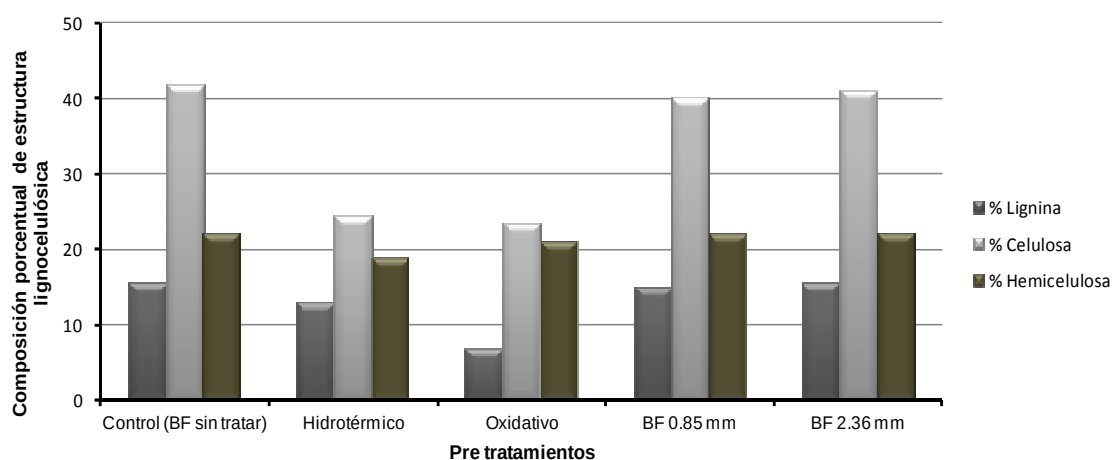


Figura 3.2 Composición porcentual de la estructura lignocelulósica del BF tratado y sin tratar

Fuente: El Autor

En los tratamientos hidrotérmico y oxidativo la lignina se redujo 16 y 56% respectivamente, en comparación al control. Estos resultados indican que los tratamientos lograron solubilizar la lignina a las condiciones aplicadas. La mayor remoción de lignina se alcanza durante el tratamiento oxidativo, por lo cual se puede inferir que el peróxido presentó una alta reactividad con los anillos aromáticos del polímero.

La literatura afirma que el pre-tratamiento con peróxido alcalinizado es más efectivo en biomásas lignocelulósicas provenientes de plantas monocotiledóneas como el bagazo de fique (Gould, 1985). Dado que la lignina es un polímero recalcitrante que impide el ataque enzimático, una reducción en la concentración

puede favorecer los rendimientos de la etapa hidrolítica durante la producción de biogás. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los alcanzados por Schmidt *et al.* (2002) quienes aplicaron tratamiento oxidativo a la paja de trigo y a la madera de haya con porcentajes de reducción de lignina entre 50 y 60 % para cada una de las biomásas tratadas.

Adicionalmente, se alcanzaron reducciones de celulosa y hemicelulosa durante los tratamientos hidrotérmico y oxidativo con respecto al BF sin tratar. Este comportamiento demuestra que los pre-tratamientos consiguen despolimerizar los polisacáridos, convirtiéndolos en materia orgánica soluble fácilmente degradable.

Por otra parte, estudios previos acerca del mecanismo de las reacciones de oxidación para la solubilización de la lignina, señalan que la reacción de deslignificación es fuertemente dependiente del pH con un valor óptimo de 11.5. De esta forma, una disminución de pH por debajo de 11.5 durante el pre tratamiento indica que la lignina ha sido solubilizada. Por ejemplo, la solubilización de la lignina contenida en la paja de trigo se alcanzó a las 6 horas de tratamiento con un pH de 11 (Gould , 1985). En la figura 3.3 se presenta el cambio de pH durante el tiempo de pre-tratamiento oxidativo. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, para el caso concreto del BF, la deslignificación ocurre a las dos horas de tratamiento, con un valor de pH de 10.5.

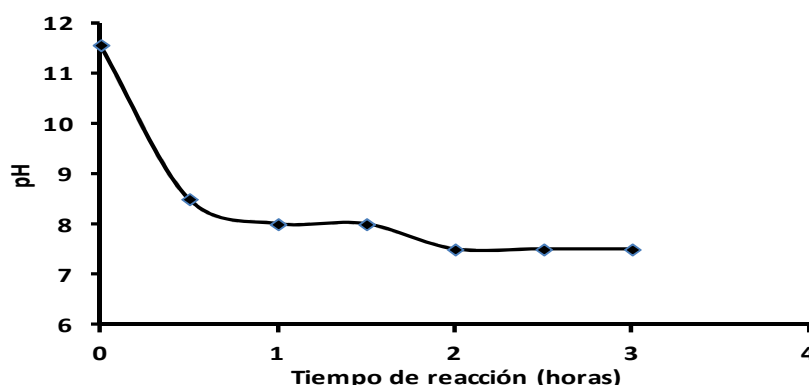


Figura 3.3 Cambio en el pH durante el tiempo de reacción del pre tratamiento oxidativo

Con respecto al tratamiento mecánico no se observan diferencias significativas en la composición del BF para ningún tamaño de partícula evaluado. Estudios de reducción de tamaño de partícula para la paja de trigo confirman los resultados presentados en esta investigación (Papatheofanous *et al.*, 1998).

3.4.2. Efecto de los pre-tratamientos sobre la cristalinidad del BF

Uno de los objetivos de los pre-tratamientos es reducir la cristalinidad de la celulosa (Hendriks & Zeeman, 2009). Este comportamiento se observó en los resultados obtenidos (Tabla 3.2 y Figura 3.4). Por experimentación preliminar se determinó que el tamaño de partícula con mejores rendimientos en el proceso de digestión fue 2.36 mm.

Tabla 3.2 Índice de cristalinidad (CrI) del BF tratado y sin tratar

Pre-tratamientos	Hidrotérmico	Oxidativo	Mecánico (2.36 mm)	Control (BF sin tratar)
CrI	0.44	0.46	0.47	0.49

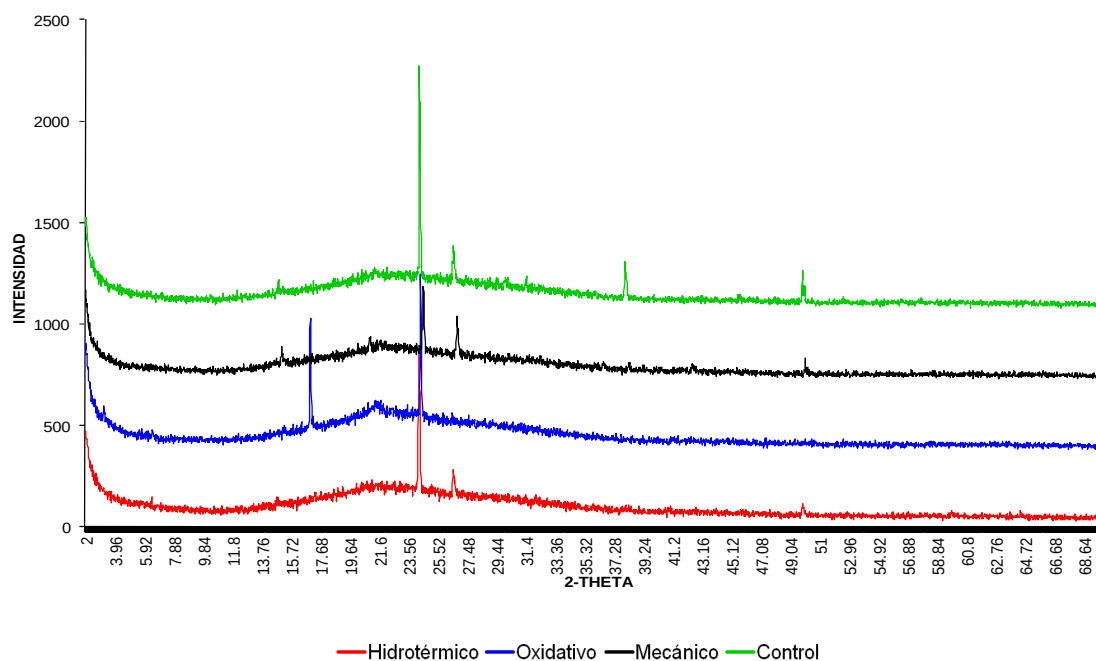


Figura 3.4 Difractograma rayos X del BF tratado y sin tratar

Fuente: El Autor

La cristalinidad del BF después de cada tratamiento disminuyó 10.3%, 6.4%, y 4.0 % para los pre-tratamientos hidrotérmico, oxidativo y mecánico, respectivamente. Esto significa que la aplicación de los pre-tratamientos dio lugar a transformaciones estructurales de la celulosa. El menor índice de cristalinidad (0.44) se alcanzó para el tratamiento hidrotérmico, por lo cual se puede concluir que este pre-tratamiento logró romper la matriz lignocelulósica del BF generando un mayor número de regiones amorfas, lo cual favorece el desarrollo de la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia. El pre-tratamiento oxidativo presentó un CrI mayor al tratamiento hidrotérmico, debido a que la adición de peróxido afecta particularmente la lignina.

Según la literatura, el tratamiento mecánico es el más efectivo para la reducción de la cristalinidad de la celulosa, sin embargo, los resultados de este estudio mostraron el menor efecto sobre la estructura cristalina de la celulosa por este método. Esto puede deberse a la composición del BF y a que la reducción de tamaño de partícula no es tan distante del tamaño natural del bagazo.

3.4.3. Resultado de los análisis de micrografías

Las fotografías microscópicas con la morfología del BF tratado y sin tratar se observan en la Figura 3.5.

En las micrografías se resalta el tratamiento con peróxido debido a que el BF sufre un blanqueamiento producto de las reacciones de deslignificación (Rosnah *et al.*, 2010). En la micrografía se aprecia una corteza que puede ser atribuida a la insuficiente penetración del peróxido. Con respecto al tratamiento mecánico y el BF sin tratar no se observan diferencias.

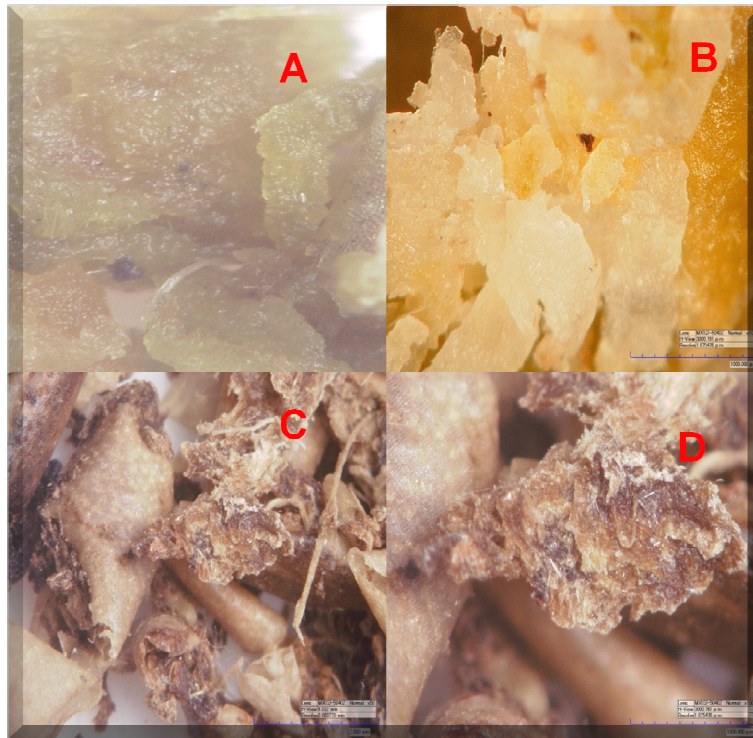


Figura 3.5 Micrografías del BF. A: Tratamiento hidrotérmico; B: Tratamiento oxidativo; C: Tratamiento mecánico; D: BF sin tratar

Fuente: El Autor

3.4.4. Efecto de los pre tratamientos sobre la digestión anaerobia del bagazo de fique

3.4.4.1. Efecto de los pre-tratamientos sobre las cinéticas de ART y AGVT

La actividad metabólica de los microorganismos acidogénicos se refleja en las cinéticas de consumo de ART (Figura 3.6).

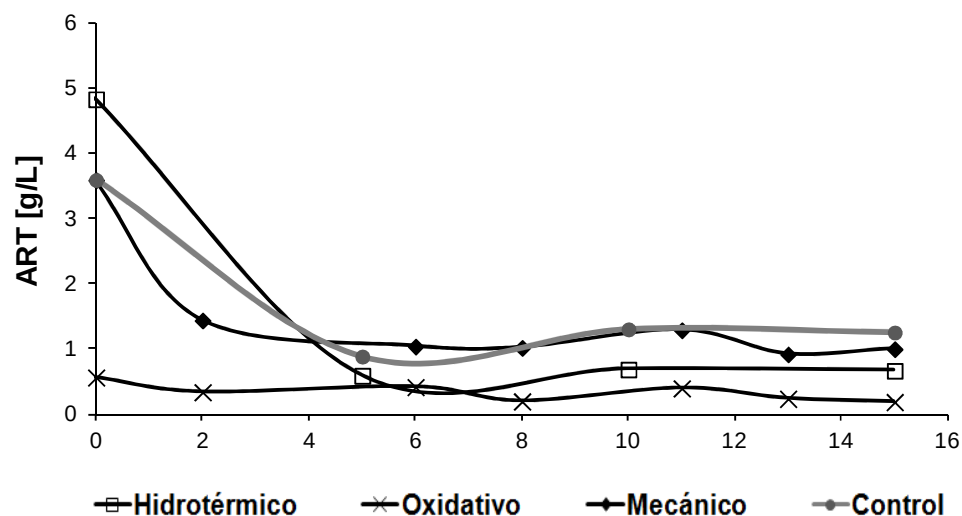


Figura 3.6 Efecto de los pre-tratamientos sobre las cinéticas de consumo de ART y AGVT.

Fuente: El Autor

El pre-tratamiento hidrotérmico logró un incremento en la concentración de azúcares del 34% al inicio de la digestión. Esta concentración mejora la accesibilidad de la biomasa hacia la degradación microbiana (Kaparaju & Felby, 2010).

En la figura 3.6 se observa que el tratamiento mecánico presenta una pendiente inferior a la del control, esto se debe a que un menor tamaño de partícula facilita al microorganismo la accesibilidad y disponibilidad al sustrato, mejorando los rendimientos de la etapa hidrolítica-acidogénica.

En el tratamiento oxidativo se presentó una reducción en la concentración de ART. Los azúcares liberados posiblemente quedaron incorporados en el licor resultante. A pesar de esto, la mínima concentración de ART garantizó el arranque del proceso anaerobio sin afectar el consumo de AGVT.

Todos los ensayos alcanzaron la estabilidad del proceso al decimo día de digestión. Lo anterior indica que el BF tratado contiene materia orgánica soluble y

fácilmente degradable, superando las limitaciones que se presentan en la etapa hidrolítica de la digestión.

A pesar de que el BF sin tratar presenta un menor consumo de la materia orgánica, el comportamiento presentado es conveniente para el proceso de digestión anaerobia del BF (Castro *et al.*, 2009). El pH durante el tiempo de digestión permaneció en un intervalo entre 6.8 y 7.8 para el bagazo tratado y sin tratar, de igual forma la relación de AGVT/AT varió entre 0.7 y 0.1 para los dos tipos de bagazo. Estos valores son adecuados para el buen desempeño de los reactores anaerobios, evidenciando la estabilidad del proceso sin riesgo de inhibición (Raposo *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2011).

3.4.4.2. Efecto de los pre-tratamientos sobre el potencial de biometanización del bagazo de fique

El tratamiento que presentó el mayor rendimiento en la producción de metano fue el hidrotérmico (Tabla 3.3), mostrando que el tiempo de tratamiento de 30 min y una relación ml H₂O/ g SV BF de 10 son condiciones adecuadas para llevar a cabo este tratamiento. Este rendimiento confirma resultados presentados previamente. El tratamiento hidrotérmico no presenta incrementos significativos en los rendimientos de metano a partir de pasto (Lehtomäki, 2006; Frigon & Serge, 2010). Sin embargo, en este estudio se demostró que este tratamiento físico es el mejor para el BF y evidencia que la efectividad de los tratamientos depende significativamente de la composición de la biomasa lignocelulósica.

El proceso hidrotérmico es una tecnología ambientalmente amigable que puede ser concebida como una primera etapa para la utilización química del BF. El bajo costo operacional y las modificaciones estructurales que provoca en la matriz lignocelulósica del bagazo son importantes ventajas de este pre-tratamiento.

Tabla 3.3 Efecto de los pre tratamientos sobre el PBM

Tratamiento	PBM [m ³ CH ₄ /kg SV]	%Cambio
Hidrotérmico	0.37	23
Oxidativo	0.36	20
Mecánico (2.36mm)	0.36	20
Control	0.30	

Fuente: El Autor

El rendimiento de metano del BF aplicando un tratamiento oxidativo fue favorable a pesar de la producción de compuestos tóxicos tipo furfural y HMF durante las reacciones de deslignificación (Fox & Noike, 2004). Estos resultados permiten corroborar que una concentración de ART de 0.5 g/L es suficiente para alcanzar rendimientos de metano iguales a los obtenidos por el tratamiento mecánico. El BF tratado con peróxido permite que los microorganismos accedan con facilidad, logrando aprovechar eficientemente la materia orgánica.

De acuerdo con las condiciones de operación evaluadas en esta investigación el pre-tratamiento oxidativo no requiere de altas concentraciones de químicos, el proceso se realiza a bajas temperaturas (50°C) haciéndolo económicamente factible. El licor resultante del pre-tratamiento (fracción líquida) contiene trazas de fenoles y bajas concentraciones de peróxido por lo cual su disposición no resulta un problema (Curreli *et al.*, 1997). Incrementos similares de la producción de metano empleando este tratamiento fueron encontrados en la literatura para la degradación anaerobia de residuos de papa, paja de trigo y cáscara de arroz (Taherzadeh & Keikhosro, 2008; Teghammar *et al.*, 2010).

El potencial de biometanización del BF se incrementó en un 20% (al igual que el tratamiento oxidativo) con la reducción de tamaño de partícula hasta 2.36 mm. Se puede inferir que el tratamiento mecánico incrementa el área superficial del sustrato permitiendo a los microorganismos absorber el BF. Estos resultados son similares a los encontrados para la degradación anaerobia del sisal (Familia

Agavaceae) donde los rendimientos de metano aumentaron de 0.18 m³ CH₄/kg SV (control) a 0.22 m³ CH₄/kg SV con un tamaño de partícula de 2 mm (Mshandete *et al.*, 2006). Es importante encontrar un tamaño de partícula adecuado que además de incrementar los rendimientos de metano además no requiera mayores gastos energéticos.

El tratamiento mecánico es un proceso sencillo que puede ser implementado en plantas productoras de biogás a gran escala, reduciendo el volumen del digester requerido (Yadvika *et al.*, 2004). Adicionalmente un balance energético y económico evalúa la viabilidad de este tratamiento (Bruni *et al.*, 2010; Lehtomäki, 2006).

3.5. CONCLUSIONES

La estructura lignocelulósica del bagazo de fique se modificó al aplicar los pre-tratamientos hidrotérmico y oxidativo. Los tratamientos oxidativo e hidrotérmico alcanzaron una reducción de la lignina del 56 y el 16% con respecto al bagazo sin tratar, además de una disminución del índice de cristalinidad de la celulosa.

Con respecto a la producción de metano, el mejor rendimiento se logró con el tratamiento hidrotérmico con un PBM de 0.37 m³ CH₄/kg SV adicionado, seguido de los pre-tratamientos oxidativo y reducción de tamaño de partícula que alcanzaron un porcentaje de cambio del 16% con respecto al control.

Análisis estadísticos indican que no existen diferencias significativas en el potencial de biometanización para los pre-tratamientos oxidativo y reducción de tamaño de partícula.

Los procesos identificados, caracterizados por su bajo costo operacional, bajo requerimiento energético, ambientalmente amigables favorecen la digestión anaerobia del bagazo de fique.

3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIDAKI I.; AHRING B. *"Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure"*. Water Sci Technol., 41, 2000, 189-194.

ANGELIDAKI I.; ALVES M.; BOLZONELLA D.; BORZACCONI L.; CAMPOS J.; GUWY A.; KALYUZHNYI S.; JENICEK P.; VAN LIER J. *"Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays"*. Water Sci. Technol., 59, 2009, 927-934.

APHA - American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20th. Washington, USA.

BRUNI E.A.; JENSEN P.A.; ANGELIDAKI I. *"Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production"* Bioresource Technol., 2010, 101, 8713-8717.

BRUNI E.B.; JENSEN P.A.; ANGELIDAKI I. *"Steam treatment of digested biofibers for increasing biogas production"* Bioresource. Technol., 101, 2010, 7668-7671.

CAPARROS S.; GARROTE G.; ARIZA J.; LÓPEZ F. *"Autohydrolysis of Arundo donax a kinetic assessment"* Ind. Eng. Chem. Res., 45, 2006, 8909-8920.

CARVALHEIRO F.; ESTEVES M.P.; PARAJO J.C.; PEREIRA H.; GÍRIO F.M. *"Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain"*. Bioresource Technol., 91, 2004, 93-100.

CARVALHEIRO F.; DUARTE L.C.; GÍRIO F. *"Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments"* Journal of Scientific & Industrial Research., 67, 2008, 849-864.

CASTRO L.; ESCALANTE H.M.; QUINTERO M.; ORTIZ C.; GUZMÁN C. *"Producción de Biogás a partir del bagazo de fique generado durante el beneficio de fique"*. 2009. Cuarto Simposio de química aplicada". SIQUIA. [Cuarto Simposio de química aplicada SIQUIA]. 2009. ISBN 978-958-8593-12-8

CASTRO L.; QUINTERO M.; VELÁSQUEZ A.; ORTIZ C.; GUZMÁN C.; ESCALANTE H. *"Influence of Particle Size and Temperature on Methane Production From Fique's Bagasse"*. 12th world congress on anaerobic digestion. México, 2010.

CURRELI N.; FADDA B.; RESCIGNO A.; RINALDI A.; SODDU G.; SOLLAI F.; VACCARGIU S.; SANJUST E.; RINALDI A. *"Mild alkaline/oxidative pre treatment of wheat straw"* Process Biochem., 32, 1997, 665-670.

FERNANDES T.; KLAASSE B.G.; ZEEMAN G.; SANDERS J.; VAN LIER J. *"Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass"*. Bioresource Technol., 100, 2009, 2575-2579.

FOX M.; NOIKE T. *"Wet oxidation pre treatment for the increase in anaerobic biodegradability of newspaper waste"* Bioresource Technol., 91, 2004, 273-281.

FRIGON J.; GUIOT S. *"Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review"*. Biofuels, Bioprod. Bioref., 4, 2010, 447–458.

GARROTE G.; DOMÍNGUEZ H.; PARAJO J.C. *"Hydrothermal processing of lignocellulosic materials"* Springer-Verlag., 57, 1999, 191-202.

GARROTE G.; FALQUÉ E.; DOMÍNGUEZ H.; PARAJO J.C. *"Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts"*. Bioresource Technol., 98, 2007, 1951-1957.

GOERING H.K.; VAN SOEST P.J. Forage Fibre Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook No. 379, ARS-USDA, Estados Unidos, 1970.

GOULD J.M. "*Alkaline peroxide treatment of agricultural by products*". Patente Nro. 4.806.475. Estados Unidos, 1989.

GOULD M.J." *Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide*". Biotechnol Bioeng., XXVII, 1985, 893-896.

HARMSSEN P.; HUIJGEN W.; BERMÚDEZ L.M. Energy Research Centre of the Netherlands. "*Literature review of physical and chemical pre treatment processes for lignocellulosic biomass*" Netherlands, 2010.

HENDRIKS A.T.W.M.; ZEEMAN G. "*Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*". Bioresource Technol., 100, 2009, 10-18.

HILLS D.; NAKANO K. "*Effects of Particle Size on Anaerobic Digestion of Tomato Solid Wastes*". Agr Wastes. 10, 1984, 285-295.

KAPARAJU P.; FELBY C. "*Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pre treatment processes of wheat straw and corn stover*". Bioresource Technol., 101, 2010, 3175–3181.

LEHTOMÄKI A. *Biogas production from energy crops and crop residue*. Editorial Board, Finlandia, 2006.

MATA-ALVAREZ J.; MACÉ S.; LLABRÉS P. "*Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives*". Bioresource. Technol., 74, 2000, 3-16.

MILLER G. *"Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar"*. Anal. Chem., 31, 1959, 426-428.

MOSIER N.; WYMAN C.; DALE B.; ELANDER R.; LEE Y.; HOLTZAPPLE M.; LADISCH M. *"Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass"*. Bioresource Technol., 96, 2005, 673–686.

MSHANDETE A.; BJÖRNSSON L.; KIVAISI A. *"Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste"*. Renew Energ., 31, 2006, 2395-2392.

PAPATHEOFANOUS M.G.; BILLA E.; KOULLAS D.P.; MONTIES B.; KOUKIOS E.G. *"Optimizing multisteps mechanical-chemical fractionation of wheat straw components"*. Ind crop prod., 7, 1998, 249-256.

PRASAD K.; SERRANO M.; THOMSEN A.; KONGJAN P.; ANGELIDAKI I. *"Bioethanol, Biohydrogen And Biogas Production From Wheat Straw In A Biorefinery Concept"*. Bioresource Technol., 100, 2009, 2562–2568.

PRASAD S.; SINGH A.; JOSHI H. *"Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues"*. Resources Conserv Recy., 50, 2007, 1–39.

QUINTERO M.L.; CASTRO L.; ORTIZ C.; GÚZMAN C.; ESCALANTE H. *"Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example"*. Bioresource Technol. DOI 10.1016/j.biortech.2011.12.052.

RAPOSO F.; BORJA R.; MARTÍN M.A.; MARTÍN A.; DE LA RUBIA M.A.; RINCÓN B. *"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, 2009, 70-77.

ROSNAH M.Y; GHAZALI W.D.; ROSLI W.; DERMAWAN Y.M. *"Influende of alkaline peroxide treatment duration on the pulpability of oil palm empty fruit bunch"* World applied sciences journal., 8, 2010, 185-192.

SAHA B. "Hemicellulose bioconversion". J Ind Microbiol Biot., 30, 2003, 279-291.

SALDES L.; CHAMY R.; RIVADENEIRA C. *"Estudio de la etapa hidrolítica de la degradación anaerobia de almidón en residuos de maíz"*, en: 29° congreso interamericano de ingeniería sanitaria y ambiental. San Juan, Puerto Rico. 2005.

SCHMIDT A.S.; MALLON S.; THOMSEN B.; HVILSTED S.; LAWTHOR J.M. *"Comparison of the chemical properties of wheat straw and beech fibers following alkaline wet oxidation and Laccase treatments"*. J wood chem technol., 25, 2002, 39-53.

SHARMA K.; MISHRA I.M.; SHARMA M.P.; SAINI J.S. *"Effect of particle size on biogas generation from biomass residues"*. Biomass y Bioenerg., 17, 1988, 251-263.

SUN R.; TOMKINSON J.; SUN X; WANG N. *"Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble lignins from fast-growing poplar wood"*. Polymer., 41, 2000, 8409–8417.

SUN Y.; CHENG J. *"Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review"*. Bioresource. Technol., 83, 2002, 1-11.

TAHERZADEH M.; KARIMI K. *"Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review"*. Int. J. Mol. Sci., 9, 2008, 1621-1651.

TARGONSKY Z.; *"Autohydrolysis Extraction Process as a Pretreatment of Lignocelluloses for their Enzymatic Hydrolysis"*. Acta Biotechnol., 5, 1985, 353-361.

TEGHAMMAR A.; YNGVESSON J.; LUNDIN M.; TAHERZADEH M.J.; HORVÁTH I.S. "*Pretreatment of paper tube residuals for improved biogas production*". Bioresource Technol., 101, 2010, 1206-1212.

XU J.; LIU S. "Optimization of ethanol production from hot-water extracts of sugar maple chips" Renew energ., 34, 2009, 2353-2356.

YADVIKA S.; SREEKRISHNAN T.R; KOHLI S.; RANA V. "*Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques—a review.*" Bioresource Technol., 95, 2004, 1-10.

YANG S.; LI J.; ZHENG Z.; MENG Z. "*Lignocellulosic structural changes of *Spartina alterniflora* after anaerobic mono and co-digestion*". Int Biodeter Biodegr., 63, 2009, 569-575.

ZHENG M.; LI X.; LI L.; YANG X.; HE Y. "*Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment*". Bioresource Technol., 100, 2009, 5140–5145.

IV. CAPITULO ALTERNATIVAS PARA EL APROVECHAMIENTO DEL SUBPRODUCTO GENERADO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE

4.1. INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia de BF, utilizando como inóculo la mezcla de líquido ruminal y lodo de cerdo, genera en promedio 0.30 m³ CH₄/kg de Sólidos Volátiles (SV) y un lodo efluente (LE) como subproducto (Castro *et al.*, 2009).

En Colombia se generan 4.5 t BF/ha sembrada anualmente. Si el proceso de digestión anaerobia de BF es implementado a nivel industrial se producirían aproximadamente 1150 m³ de LE/ha-año en Santander (Finagro, 2011). La inadecuada disposición del LE ocasionaría problemas ambientales en aguas subterráneas (por lixiviados) y en suelos, afectando el ecosistema del área donde se depositen.

Existen diversos estudios enfocados al tratamiento y uso de residuos como LE. Teniendo en cuenta la caracterización fisicoquímica y microbiológica de LE se encuentran técnicas para su disposición como: la incineración (Fytili & Zabaniotou, 2008; Wang *et al.*, 2008), vertido al mar (Nihoul, 1991; Velásquez *et al.*, 2008), aprovechamiento de lignina (Montero *et al.*, 2009), fabricación de ladrillos (Wenga *et al.*, 2003; Angerbauer *et al.*, 2008) producción de biodiesel (Song & Lee, 2010), compostaje (USEPA, 2000), acondicionamiento de suelos (Hwang *et al.*, 2008) y producción de alimento para animales (Houillon & Jolliet, 2005).

Estudios previos determinaron que la utilización del método AHP soportado con el *software Expert Choice* (versión 11.5, USA), teniendo en cuenta criterios ambientales, económicos, operacionales y sociales es una herramienta práctica para la jerarquización de tecnologías en el aprovechamiento de un residuo

industrial. Esta herramienta permitió establecer que el acondicionador de suelos es la alternativa tecnológica más apropiada para el aprovechamiento industrial del lodo efluente generado durante la digestión anaerobia del bagazo de fique (Plata & Rivera, 2011).

El uso de los lodos residuales en la rehabilitación del terreno, es cada vez más considerada una solución técnica para revertir la degradación ambiental y promover el restablecimiento de la cobertura vegetal (Navas *et al.*, 1998). La aplicación de lodos obtenidos en las plantas de tratamiento de aguas residual (PTAR) en actividades agrícolas y no agrícolas y su disposición final se ha investigado ampliamente, estableciéndose estrictas regulaciones estadounidenses y europeas, USEPA40 CFR 503 y CEE 86/278 respectivamente, destinadas al reciclaje seguro y mejoramiento de las características de estos materiales (Mantovi *et al.*, 2005; USEPA, 2003; CCE/86/278. 1986). La estabilización de lodos de PTAR mediante digestión anaerobia ha presentado indudables ventajas en su utilización en la agricultura, considerándose un material adecuado para la fertilización y restauración de suelos degradados (Oleszczuk & Hollert, 2011).

Según la USEPA, los lodos de PTAR que han sido tratados y cumplen con los estándares estatales y federales para su aplicación al suelo, son denominados biosólidos (USEPA, 2000). Entre los requisitos a cumplir están: a) la reducción de microorganismos patógenos (causantes de enfermedad) y b) la disminución de la atracción de vectores (roedores, aves, insectos y otros organismos que pueden transportar microorganismos patógenos) (USEPA, 2003).

La concentración de patógenos diferencia los biosólidos como Clase A y Clase B. En la Clase A, los tratamientos de estabilización (ejemplo: lodos tratados térmicamente) permiten una reducción microbiana (virus entéricos, coliformes fecales, *Salmonella*, y huevos viables de helmintos) por debajo de niveles detectables por los métodos de laboratorio. Los requisitos de la Clase B son

reducir los patógenos a niveles que no supongan una amenaza para la salud pública y el medio ambiente. Su aplicación al suelo sólo es permitida si los cultivos, el pastoreo de animales y el acceso público se limita durante determinados periodos de tiempo después de su aplicación hasta que factores ambientales (energía solar, desecación) reduzcan aún más los patógenos (USEPA, 2003). Se ha demostrado que la aplicación de biosólidos municipales clase B en terrenos dedicados a la producción de forrajes es benéfica, ya que la utilización de estos subproductos favoreció los procesos de mineralización del carbono y el incremento del contenido de nitrógeno en el suelo enmendado (Jin *et al.*, 2011).

Entre los procesos que permiten reducir significativamente el contenido de patógenos en lodos están: la digestión aerobia y anaerobia, el secado al aire, el compostaje y la estabilización alcalina (USEPA, 2003; Fytli & Zabaniotou, 2008).

En la digestión aerobia de lodos de PTAR, los microorganismos consumen el componente orgánico degradable, obteniéndose un producto biológicamente estable, al mismo tiempo que se reduce el volumen de los lodos (Bernard & Gray, 2000). Lodos residuales contaminados con 4-nonilfenol (sustancia de interés ambiental debido a su toxicidad para los sistemas biológicos), han sido tratados en condiciones aerobias termófilas. Durante el proceso se alcanzó una reducción de 66% de la sustancia tóxica, además de la destrucción del contenido biodegradable de los lodos (Banat *et al.*, 2000). Como aspecto negativo, en la digestión aerobia no hay recuperación de la energía y el proceso tiende a ser costoso debido al consumo de energía asociado con la aireación continua (Bernard & Gray, 2000).

El tratamiento anaerobio de los biosólidos permite recuperar la energía en forma de metano y obtener un residuo que puede utilizarse en el acondicionamiento del suelo. La digestión anaerobia en dos etapas (55 °C en la primera y 35 °C en la segunda etapa), es uno de los procesos implementados para cumplir con los requisitos de reducción de coliformes fecales en los biosólidos Clase A (Harikishan &

Sung S, 2003). En comparación con el proceso de una etapa, se garantiza un mejor desempeño en términos de reducción de sólidos volátiles (SV), producción de biogás y deshidratación del residuo (Panyue *et al.*, 2008). No obstante, cuando los lodos residuales se someten a digestión anaerobia en dos etapas a gran escala, se pueden presentar problemas técnicos relacionados con el exceso de ácidos grasos volátiles (AGV) y la inhibición por acumulación de propionato y butirato (Panyue *et al.*, 2008).

El secado al aire se utiliza como proceso final en la estabilización de lodos procedentes de digestión aerobia o anaerobia. En este tratamiento, se realiza la descomposición de la materia orgánica, se produce amoníaco, además, de la deshidratación y la reducción microbiana (USEPA, 2000). Mediante el secado en lechos de lodos de PTAR, se observó una reducción del 73% en la concentración de SV, obteniéndose un producto final con contenido de nutrientes, metales pesados y microorganismos fecales convenientes para su utilización como fertilizante en la agricultura (Uggetti *et al.*, 2009). Los lechos de secado son una alternativa de bajo consumo de energía, bajos costos de operación y mantenimiento, y de poco impacto ambiental (Stefanakis & Tsihrintzis, 2011).

El compostaje de lodos de PTAR involucra mezclar el residuo con un material de soporte; el cual proporciona porosidad, permite la circulación de aire y disminuye la humedad. Durante el proceso de compostaje se alcanzan condiciones termófilas que permiten la reducción de patógenos (USEPA, 2003). Durante el compostaje de lodos residuales es necesario mantener condiciones de operación específicas, debido a que la temperatura y la humedad son factores determinantes para garantizar una excelente actividad microbiana que permita la descomposición de la materia orgánica (Liang *et al.*, 2003).

La estabilización alcalina, también conocido como “encalado”, es considerada uno de los procesos más empleados en la transformación de lodos. El encalado es una

tecnología simple que requiere de pocas especialidades para su implementación (USEPA, 1992). Materiales como cal (viva o hidratada), carbón, cenizas han sido empleados en la estabilización alcalina de lodos (Wong *et al.*, 2001). En el proceso, mediante la adición de un material alcalino, durante un determinado tiempo de contacto, se consigue elevar el pH a valores por encima de 12 lográndose la reducción del contenido de patógenos, así como de metales pesados (USEPA, 2000). Tres parámetros son considerados importantes: el monitoreo de los cambios en el pH, el tiempo de contacto y la dosis de álcali utilizada, debido a la relación directa que existe entre estos parámetros y la inactivación de los microorganismos patógenos (Wang *et al.*, 2008). Mediante estabilización con cal hidratada, han sido tratados lodos primarios de PTAR, consiguiéndose la inactivación de microorganismos patógenos y el mejoramiento de las características del residuo para su utilización en la fertilización periódica de suelos (Plachá *et al.*, 2008). Además de la reducción de patógenos, el encalado puede mejorar los beneficios agrícolas, al mismo tiempo que disminuye los riesgos ambientales asociados con la utilización de los biosólidos (USEPA, 2000).

En esta investigación, el lodo efluente de la digestión anaerobia del BF fue tratado mediante estabilización alcalina con hidróxido de calcio (Ca(OH)_2), dada la factibilidad de transferencia tecnológica en las comunidades rurales dedicadas a la actividad fiquera, además de los pocos requerimientos de equipos para su implementación y la simplicidad del proceso (USEPA, 2003). El objetivo del presente trabajo fue producir un biosólido estabilizado y evaluar el efecto remediador en un suelo franco-arenoso de Mogotes – Santander.

4.2. EXPERIMENTACIÓN

En la figura 4.1 se presentan las etapas metodológicas para el aprovechamiento del lodo efluente (LE).

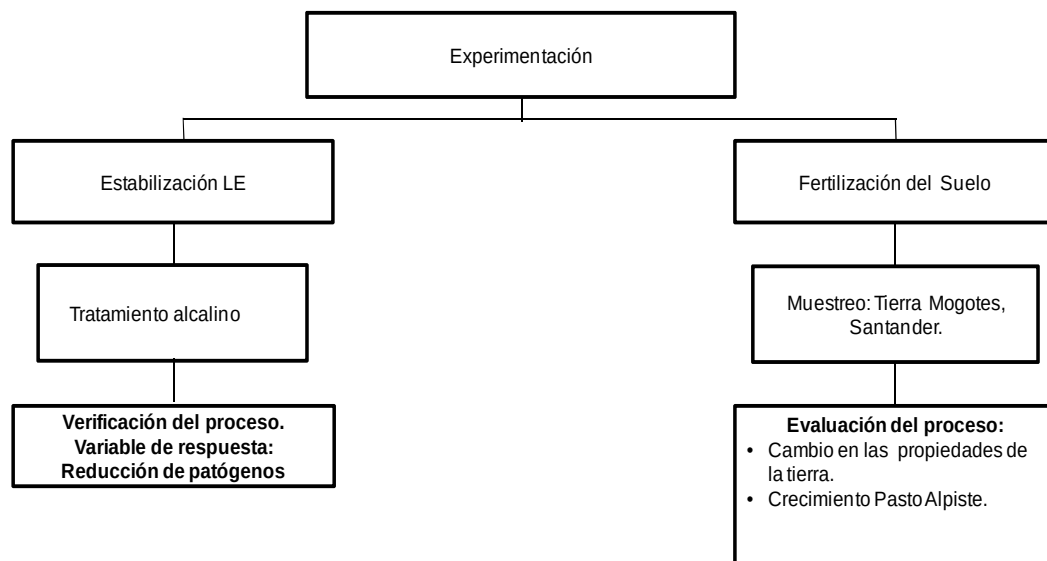


Figura 4.1 Etapas metodológicas para el aprovechamiento del lodo efluente

Fuente: El Autor

4.2.1. Características microbiológicas y fisicoquímicas del LE

El lodo efluente se obtuvo del proceso de fermentación anaerobia del BF en reactores “*batch*” operados a 21 °C y un tiempo de operación de 20 días (Castro *et al.*, 2009). Como inóculo, se utilizó una mezcla de líquido ruminal y lodo de estiércol de cerdo.

La cuantificación de indicadores de contaminación de origen fecal en el LE: coliformes totales y fecales, *Salmonella sp.* y huevos de helminto, se realizó por técnicas estandarizadas (Fermentación en tubos múltiples; aislamiento no selectivo y diferencial e identificación serológica; y técnicas de decantación y flotación con ZnSO₄, respectivamente) (APHA, 2001; FDA, 1995; NOM-001-ECOL. Norma Oficial Mexicana, 1996). El lodo efluente fue clasificado como un biosólido clase B (Tabla 4.1) lo que evidencia la necesidad de estabilizarlo antes de ser vertido a suelos de cultivo.

Tabla 4.1 Caracterización microbiológica del LE

Microorganismo Patógeno	Unidad	Valor	Técnica de medición
Coliformes Totales	NMP/g ST	5.1×10^9	NMP en caldo LMX Fluorocult
Coliformes Fecales	NMP/g ST	7.1×10^5	NMP en caldo LMX Fluorocult
<i>Salmonella spp.</i>	Presencia - Ausencia/ 2 g ST	Ausente	Pruebas Bioquímicas e identificación serológica
Huevos de Helmintos	HH/ 4 g ST	<Límite de detección	Decantación - Flotación en $ZnSO_4$.

Fuente: El Autor

La caracterización fisicoquímica de LE incluyó la determinación de pH, contenido de macro y micronutrientes, mediante un reporte fisicoquímico en base húmeda (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Características fisicoquímicas del LE

Parámetro	Unidad	Valor	Método analítico
pH	-	7.2	LBC 44 Potenciometría
Nitrógeno	%	2.38	Suma de Nitrógenos
Potasio	%	1.11	NTC 202 Emisión
Fósforo	g/L	3.70	NTC 234 Colorimetría
P ₂ O ₅	g/L	8.50	NTC 234 Colorimetría
Azufre	g/L	1.00	NTC 1154 Turbidimetría
Cobre	g/L	0.08	NTC 1369 A. Atómica
Zinc	g/L	0.15	NTC 1369 A. Atómica
Calcio	%	2.96	NTC 1369 A. Atómica
Magnesio	%	2.44	NTC 1369 A. Atómica
Carbono orgánico oxidable	g/L	45.80	NTC 5167 Walkey Black

Fuente: El Autor

El contenido de nitrógeno, potasio y fósforo en el LE resaltan su potencial uso en suelos destinados a cultivos. Los nutrientes presentes (Tabla 4.2) son similares a los reportados para lodos de depuradora, usados como fertilizantes en suelos mediterráneos, los cuales contribuyeron al crecimiento de las plántulas (Valdecantos *et al.*, 2011).

4.2.2. Proceso de estabilización del LE

Para la estabilización de LE se utilizó cal hidratada (Ca(OH)_2). Se desarrollaron una serie de tres experimentos con diferentes concentraciones de cal adicionada al residuo (Tabla 4.3); las relaciones D-1, D-2 y D-3 fueron seleccionados de acuerdo con las recomendaciones para la estabilización alcalina de lodos anaerobios (Wang *et al.*, 2008). El experimento control (D-0), correspondió a una muestra de LE sin adición de álcali.

Tabla 4.3. Dosificación de Ca(OH)_2 para la estabilización de LE

Ensayo	(kg Ca(OH)_2 /kg sólidos totales)
D-0	0
D-1	0.14
D-2	0.19
D-3	0.25

Fuente: El Autor

Se seleccionó una muestra representativa de un litro de LE para cada dosis de Ca(OH)_2 . La cal hidratada fue adicionada en forma gradual a las muestras de LE y para garantizar la homogeneidad, la mezcla fue continuamente agitada con una batidora plástica manual. El pH fue monitoreado diariamente por 10 días. Una vez concluido el tiempo de operación se determinó nuevamente la concentración microbiológica y la caracterización fisicoquímica.

4.2.3. Fertilización del suelo

Las muestras de tierra fueron colectadas en un suelo dedicado al cultivo del fique del municipio de Mogotes – Santander. Las principales características fisicoquímicas de la muestra son: textura franco-arenosa, pH ácido, presencia de macronutrientes como fósforo, calcio, magnesio, potasio, azufre, además de algunos micronutrientes, y una Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) media proporcional a su contenido de materia orgánica (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Características de la tierra utilizada en el experimento

Parámetro	Unidad	Valor	Método Analítico
Textura	-	Franco -arenoso	Bouyoucous
pH	-	5.3	LBC 44 Potenciometría
Carbono	%	3.25	Colorimétrico
Fósforo disponible	ppm	110	NTC 234 Colorimetría
Calcio	meq/100 g	5.58	NTC 1369 A. Atómica
Magnesio	meq/100 g	0.75	NTC 1369 A. Atómica
Sodio	meq/100 g	0.15	NTC 1369 A. Atómica
Potasio	meq/100 g	ND*	NTC 1369 A. Atómica
Aluminio intercambiable	meq/100 g	ND *	Valoración: Extracción KCl
Azufre	ppm	7.05	NTC 1154 Turbidimetría
Boro	ppm	0.21	Colorimétrico
Hierro	ppm	133	NTC 234 Colorimetría
Manganeso	ppm	3.44	NTC 1369 A. Atómica
Cobre	ppm	1.64	NTC 1369 A. Atómica
Zinc	ppm	9.0	NTC 1369 A. Atómica
CIC	meq/100 g	13.4	Extracción acetato de amonio

*No Detectable

Fuente: El Autor

El biosólido mezclado con el suelo a enmendar fue estabilizado durante ocho días antes de la fertilización. Semillas de pasto alpiste (*Phalaris canariensis*, marca Piamontina) fueron cultivadas en 2 Kg de tierra colocados en materas de vinilo (11 cm de profundidad, 20 cm de ancho y 15 cm de largo) provistas de bandejas para la recolección de lixiviados. En cada matera se colocó una muestra de suelo y biosólido de acuerdo con las relaciones especificadas en la Tabla 4.5. Luego de la siembra de 40 semillas en cada matera, los ensayos fueron regados diariamente con 80 ml de agua y expuestos a la luz solar con un promedio de 12 horas diarias.

Tabla 4.5. Dosis de “biosólido” aplicada a un suelo destinado a cultivo de pasto alpiste.

Ensayo	Dosis (L biosólido/ m ²)
E- 1	0.00
E- 2	0.25
E- 3	0.50
E- 4	1.00

Fuente: El Autor

Después de 30 días de cultivo, se evaluó la calidad del suelo fertilizado mediante los cambios en la concentración de nutrientes del suelo tratado, el grado de

germinación y la altura de las plántulas. Para cuantificar el crecimiento del cultivo, se midió la longitud del tallo de pasto alpiste en cada matera a los 7,14, 21 y 30 días después de la siembra.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el *software StatGraphics plus 5.1, StatPoint Inc.* (Virginia, EE.UU). Las diferencias fueron consideradas significativas en un intervalo del 95% de confianza cuando $p < 0.05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Estabilización del LE

De acuerdo con USEPA, durante el proceso de estabilización se debe elevar el pH a un valor superior a 12 y mantenerlo por 72 h (USEPA, 2003). La adición de Ca(OH)_2 / kg de lodo seco al LE, elevó el pH de los ensayos de 7.45 a 12.08 (D-1); 12.12 (D-2) y 12.86 (D-3) en un tiempo de tratamiento de 12 horas. Con 0.14 kg de Ca(OH)_2 / kg de lodo seco (ensayo D-1) el pH disminuyó progresivamente durante los 10 días del proceso (Figura 4.2).

La adición de 0.25 kg de Ca(OH)_2 / kg de lodo seco (D-3) mantuvo el pH entre 12 y 13, durante los diez días de experimentación. Teniendo en cuenta que la dosis de 0.19 kg de Ca(OH)_2 / kg de lodo seco (D-2) alcanzó valores de pH suficientes para estabilizar la materia orgánica, se seleccionó esta última concentración.

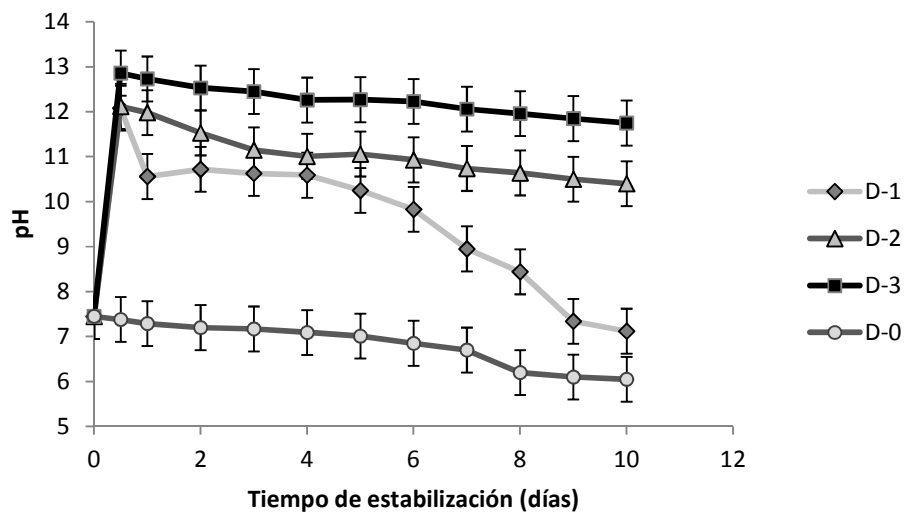


Figura 4.2. Variación del pH durante la Estabilización Alcalina de LE

Fuente: El Autor

En relación con el análisis microbiológico del ensayo D-2, los resultados indican la reducción microbiana de coliformes totales y fecales por debajo de los límites de detección del método. La ausencia de *Salmonella sp.* en el lodo estabilizado demuestra que no hubo recrecimiento en la biomasa residual. La no detección de huevos de helminto evidencia un margen de seguridad en cuanto a su utilización. Los niveles de colifagos somáticos fueron inferiores al límite de detección del método (ISO 10705-2. 2000). Dado que los colifagos son indicadores de la presencia de enterovirus, se puede inferir una clasificación del biosólido como “A” y su aplicación en procesos agrícolas con las debidas restricciones de uso. Lo anterior, se correlaciona con los resultados obtenidos por Wong *et al.* (2009) durante la reducción de patógenos del lodo efluente de la digestión anaerobia del estiércol de cerdo.

En la Tabla 4.6 se encuentra el análisis fisicoquímico del LE y el biosólido D-2. Los valores de nutrientes y micronutrientes en las matrices analizadas aseguran su aprovechamiento en el acondicionamiento del suelo.

Tabla 4.6. Comparación de las características fisicoquímicas del LE y biosólido

Parámetro	Unidad	Valor	
		LE	Biosólido
pH		7.2	10.40
Nitrógeno	%	2.38	2.04
Potasio	%	1.11	1.11
Fósforo	g/L	3.70	4.20
P ₂ O ₅	g/L	8.50	9.60
Azufre	g/L	1.00	0.83
Cobre	g/L	0.08	0.08
Zinc	g/L	0.15	0.17
Calcio	g/L	2.96	9.90
Magnesio	g/L	2.44	2.40
Carbono orgánico oxidable	g/L	45.80	32.30
Sólidos Totales	g/L	64.60	182.54

Fuente: El Autor

La concentración de nutrientes de LE no se ve afectada por el proceso de estabilización alcalina. Se observó una reducción del nitrógeno en un 14% debido posiblemente al cambio de pH y a fenómenos de volatilización asociados (Franco Hernández *et al.*, 2003; Topaç *et al.*, 2008). Tanto en el LE como en el biosólido las concentraciones de Cu y Zn son bajas evitando generar contaminación en el ambiente por metales pesados como lo afirma Kuai *et al.* (2000).

Las reacciones de los cationes de calcio con azufre favorecen el proceso de estabilización del lodo reduciendo el impacto ambiental (Azeez *et al.*, 2010). En este estudio, la disminución de la concentración de azufre (1g/L a 0.83 g/L) minimiza la generación de olores en el biosólido.

Durante el encalado, el cambio del pH hasta valores altamente alcalinos degrada la materia orgánica del residuo metabolizado. En la Tabla 4.7 se corrobora la

eficiencia del tratamiento alcalino como proceso de estabilización de la materia teniendo como parámetro de referencia los valores de DQO y DBO.

La reducción del contenido de sólidos volátiles es atribuida a la desactivación de la carga microbiana, a causa de los valores de pH altamente alcalino. En este estudio se observó una reducción del 15% en el valor de SV, disminuyendo la atracción de vectores. Reducciones entre el 15 y el 25% fueron alcanzadas por otros investigadores durante la estabilización alcalina del lodo efluente generado de la digestión anaerobia del estiércol de ganado (Azeez et al., 2010).

Tabla 4.7. Indicadores de degradación de la materia orgánica.

Parámetro	Unidades	LE	Biosólido	Porcentaje de disminución
DBO	mg O ₂ /l	10833	3525	32.54
DQO	mg/l O ₂	65944	16800	25.48
SV	% p/p	2848	430	15.10

Fuente: El Autor

4.3.2. Capacidad del biosólido como fertilizante de suelos

En la tabla 4.8 se presenta el avance en la germinación de plantas de pasto alpiste, sembradas con suelo abonado con diferentes dosis de biosólido. La adición de biosólido a la tierra de siembra favoreció el desarrollo de las plantas aportando los nutrientes necesarios.

El mayor porcentaje de germinación se obtuvo con el experimento E-3 (33 plantas/maceta). Se pudo evidenciar que una carga alta de biosólido (1 l/m²) no es favorable para la germinación de las semillas; adicionalmente, se observó una obstrucción física del terreno por sequedad. Estos resultados han sido observados por otros investigadores con concentraciones similares (Domínguez-Caraveo et al., 2010).

Tabla 4.8. Germinación de las plántulas de pasto alpiste

Experimento	Dosis [l biosólido/ m ²]	Plántulas Germinadas	Porcentaje de Germinación
E-1	0.0	29	72.5
E-2	0.25	31	77.5
E-3	0.50	33	82.5
E-4	1.00	25	62.5

Fuente: El Autor

La adición de biosólido, ocho días antes de la siembra, contribuyó a la degradación química, biodegradación y volatilización de los compuestos que podrían resultar tóxicos para las plántulas a germinar reduciendo el riesgo de fitotoxicidad. (Epstein, 2003).

En los diferentes ensayos se evidenció cambios significativos en la longitud de los tallos de las plantas de pasto alpiste, durante los primeros 15 días de experimentación. El menor crecimiento de las plantas se observó en el ensayo control (E-1) (Figura 4.3).

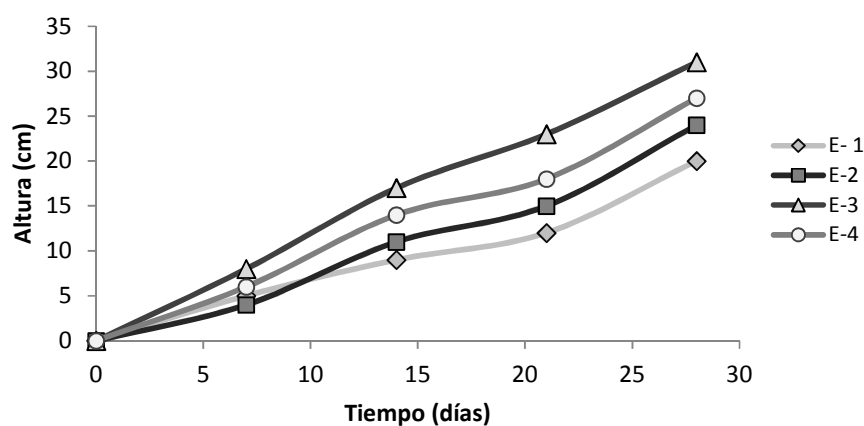


Figura 4.3. Crecimiento de plántulas de pasto alpiste en tierra abonada con Biosólido

Fuente: El Autor

Los valores más altos de crecimiento de las plantas se obtuvieron en el suelo tratado con 0,5 l / m² (E-3), con una media total de 19,58 ± 2,5 cm durante el ensayo.

En la Figura 4.4 se muestra la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para la evaluación del biosólido como fertilizante. Existen diferencias significativas entre el crecimiento alcanzado del pasto alpiste para cada uno de los ensayos, con un índice de confianza de 95% y un valor $p = 0.0001$.

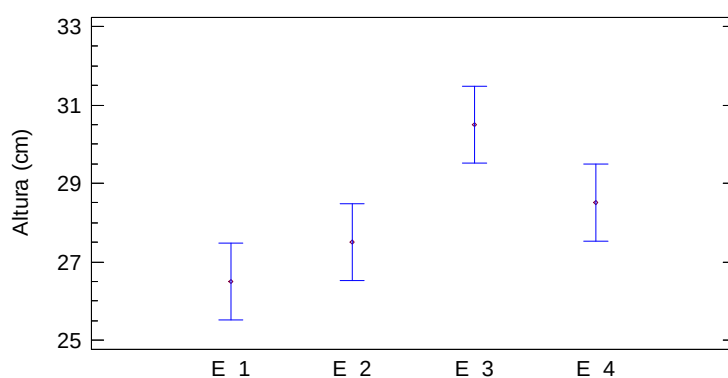


Figura 4.4. Distribución de medias para el crecimiento de las plantas durante el ensayo.

Fuente: El Autor

4.3.3. Cambios fisicoquímicos del suelo tratado con biosólido

En la tabla 4.9 se presenta la caracterización del suelo antes y después de la aplicación del biosólido, de acuerdo a la dosificación del experimento E-3. Se observa que la aplicación del biosólido modificó significativamente las características ácidas del terreno, debido a que se incrementó el valor del pH, ventaja importante asociada con la estabilización de lodos residuales mediante el encalado (Adegbidia *et al.*, 2003).

Tabla 4.9. Cambios fisicoquímicos del suelo tratado con biosólido

Parámetro	Unidad	E-1 (0 l biosólido/m ²)	E-3 (0.5 l biosólido/m ²)
Textura		Franco -arenoso	Franco –arenoso
pH		5.3	6.2
Carbono orgánico	%	3.25	3.19
Fosforo	ppm	110	245
Calcio	meq/100 g	5.58	6.88
Magnesio	meq/100 g	0.75	2.12
Sodio	meq/100 g	0.15	0.35
Potasio	meq/100 g	ND*	0.35
Aluminio	meq/100 g	ND	ND
Azufre	meq/100 g	7.05	34.5
Boro	meq/100 g	0.21	0.55
Hierro	meq/100 g	133	93.6
Manganeso	meq/100 g	3.44	3.32
Cobre	meq/100 g	1.64	4.52
Zinc	meq/100 g	9.0	22.4
CIC	meq/100 g	13.4	18.0

*ND: No Disponible *CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico

Fuente: El Autor

El contenido de materia orgánica en el biosólido es de fácil descomposición, lo que contribuyó a la mineralización del nitrógeno inorgánico (Valdez-Pérez et al., 2001).

La aplicación del biosólido consiguió en el terreno: a) mantener el contenido de materia orgánica, aspecto que se evidencia mediante el aumento de la CIC, b) aumentar los niveles de nutrientes (principalmente, P y K) y de micronutrientes. La ausencia de K en E1 está asociada con la necrosis foliar de las plantas en experimentación (Crush et al., 2006).

La enmienda del suelo facilitó la recuperación del terreno degradado a causa del cultivo de fique, dada la retención de minerales por la planta. Estos procesos de recuperación disminuyen el lavado de cationes hacia aguas subterráneas (Mantovi *et al.*, 2005).

Los resultados de este trabajo coinciden con los reportados en otro estudio, donde se ha demostrado que la aplicación de un biosólido modifica favorablemente las características fisicoquímicas del suelo, debido a que se mejora la actividad microbiana del suelo y por ende se incrementa la fertilidad del terreno tratado (Antolín *et al.*, 2010).

4.4. CONCLUSIONES

El encalado del LE, subproducto de la digestión anaerobia del bagazo de fique, mediante Ca(OH)_2 , produce un biosólido sin riesgo biológico constituyéndose en una alternativa tecnológica viable para la disposición de este residuo.

El biosólido puede utilizarse para la recuperación y acondicionamiento de suelos estériles; degradados a causa del cultivo de fique.

La aplicación del biosólido estabilizado, en las actividades agrícolas, contribuye a la enmienda de suelos ácidos y a la reducción de un problema de contaminación ambiental.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBIDIA H.G.; BRIGGS R.D.; VOLKB T.A.; WHITEB E.H.; P. ABRAHAMSON L.P. "*Effect of organic amendments and slow-release nitrogen fertilizer on willow biomass production and soil chemical characteristics*". Biomass Bioenerg., 25, 2003, 389 – 398

ANGERBAUER C.; SIEBENHOFER M.; MITTELBAACH M.; GUEBITZ G. "*Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel productionn*". Bioresource Technol., 99, 2008, 3051–3056.

ANTOLÍN M.C.; MURO I.; SÁNCHEZ-DÍAZ M. "*Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions*". Environ Exp Bot., 68, 2010, 75–82.

APHA-AWWA-WPCF, 2001. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

AZEEZ J. O.; VAN AVERBEKE W. "*Fate of manure phosphorus in a weathered sandy clay loam soil amended with three animal manures*". Bioresource Technol., 101, 2010, 6584–6588

BANAT F.A.; PRECHTL S.; BISCHOF F. "*Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge contaminated with 4-nonylphenol*". Chemosphere., 41, 2000, , 297- 302

BERNARD S.; GRAY N.F. "*Aerobic digestion of pharmaceutical and domestic wastewater sludges at ambient temperature*". Water Research, Res., 34, 2000, 725 -734.

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"*. 2009. Cuarto Simposio de química aplicada. SIQUIA. [Cuarto Simposio de química aplicada SIQUIA]. 2009. ISBN 978-958-8593-12-8

CCE/86/278. 1986. Council directive on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Official Journal of the European Communities. L181, 6–12

CRUSH J.R.; SARATHCHANDRA U.; DONNISON A. *"Effect of plant growth on dehydration rates and microbial populations in sewage biosólidos"*. Bioresource Technol., 97, 2006, 2447–2452.

DOMÍNGUEZ-CARAVEO H.; JURADO P.; MELGOZA-CASTILLO A. *"Emergence and survival of blue grama with biosólidos under greenhouse conditions"*. J Arid Environ., 74, .2010, 87–92.

EPSTEIN E. 2003. Land Application of Sewage Sludge and Biosólidos. Chapter 5. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

FDA. 1995. Bacteriological analytical manual. *Salmonella*. Chapter 5. 8th edition. United States.

Finagro. "Fique. Producción y zonas de producción". Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Diciembre 1 de 2011, Disponible: http://www.finagro.com.co/html/l_portals/index.php.

FRANCO-HERNÁNDEZ O.; MCKELLIGAN-GONZALEZ A.M.; LOPEZ-OLGUIN F.; ESPINOSA-CERON E.; ESCAMILLA-SILVA L. *"Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus in soil amended with irradiated, pasteurized and limed biosólidos"*. Bioresource Technol., 8, 2003, 93–102.

FYTILI D.; ZABANIOTOU A. *“Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods—A review”*. Renew Sust Energ Rev., 12, 2008, 116-140.

HARIKISHAN S.; SUNG S. *“Cattle waste treatment and Class A biosólidoid production using temperature-phased anaerobic digester”*. Adv Environ Res., 7, 2003, 701–706.

HOUILLON G.; JOLLIET O. *“Life cycle assessment of processes for the treatment of wastewater urban sludge”*. J Clean Prod., 13, 2005, 287–299

HWANG J.; ZHANG L.; SEO S.; LEE Y-W.; JAHNG D. *“Protein recovery from excess sludge for its use as animal feed”*. Bioresource Technol., 99, 2008, 8949–8954.

ISO 10705-2. 2000. Water quality – detection and enumeration of bacteriophages, Part 2. Enumeration of somatic coliphages. International Organization for standardization. Geneva. Switzerland

JIN V.L.; JOHNSON M.; HANEY R.; ARNOLD J. *“Potential carbon and nitrogen mineralization in soils from a perennial forage production system amended with class B biosólidos”*. Agr Ecosyst and Environ., 141, 2011, 461– 465.

KUAI L.; DOULAMI F.; VERSTRAETE W. *“Sludge treatment and reuse as soil conditioner for small rural communities”*. Bioresource Technol., 73, 2000, 213-219

LIANG C.; DAS K.C.; MCCLENDON R.W. *“The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosólidoids composting blend”*. Bioresource Technol, 86, 2003, 131–137.

MANTOVI P.; BALDONI G.; TODERI G. *“Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop”*. Water Res., 39, 2005, 289–296

MONTERO M.; JORDÁN M.; HERNÁNDEZ-CRESPO M.; SANFELIU T. "*The use of sewage sludge and marble residues in the manufacture of ceramic tile bodies*". Appl. Clay sci., 46, 2009, 404–408

NAVAS A.; BERMÚDEZ F.; MACHÍN J. "*Influence of sewage sludge application on physical and chemical properties of Gypsisols*". Geoderma., 87, 1998, 123–135.

NIHOUL C. *Dumping at sea*. Ocean and Shoreline Management. . 16, 1991, 313-326

NOM-001-ECOL. 1996. Norma Oficial Mexicana. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de agua residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos naturales y pesca. México.

OLESZCZUK P.H. "*Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils*". Chemosphere., 83, 2011 502–509.

PANYUE P.; ZENGA G.; ZHANGB G.; LIA Y.; ZHANGA B.; FAN M. "*Anaerobic co-digestion of biosólidoids and organic fraction of municipal solid waste by sequencing batch process*". Fuel process technol., 89, 2008, 485-489.

PLACHÁ I.; VENGLOVSKY J.; MAKOVÁ Z.; MARTÍNEZ J. "*The elimination of Salmonella typhimurium in sewage sludge by aerobic mesophilic stabilization and lime hydrated stabilization*". Bioresource Technol., 99, 2008, 4269–4274.

PLATA L.; RIVERA D. "Alternativas para el aprovechamiento del subproducto generado en la digestión anaerobia del bagazo de fique". Trabajo de grado de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2011.

SONG U.; LEE E. "*Environmental and economical assessment of sewage sludge compost application on soil and plants in a landfill*". Resources Conserv. Recycling., 54, 2010, 1109–1116.

STEFANAKIS A.I.; TSIHRINTZIS V.A. *"Dewatering mechanisms in pilot-scale sludge drying reed beds: Effect of design and operational parameters"*. Chem Eng J., 172, 2011, 430-443.

TOPAÇ F.O.; BAKAYA H.S.; ALKAN U. *"The effects of fly ash incorporation on some available nutrient contents of wastewater sludges"*. Bioresource Techno., 99, 2008, 1057–1065.

UGGETTI E.; LLORENS E.; PEDESCOLL A.; FERRER I.; CASTELLNOU R.; GARCÍA J. *"Sludge dewatering and stabilization in drying reed beds: Characterization of three full-scale systems in Catalonia, Spain"*. Bioresource Technol., 100, 2009, 3882–3890.

USEPA/625/R-92/013. 2003. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.

USEPA/822/R-93/004. 1992. Technical support document for reduction of pathogens and vector attraction in sewage sludge. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.

USEPA/832-F-00-064. 2000. Biosólidos Technology Fact Sheet. Land Application of biosólidos. Office of water. Washington, DC.

VALDECANTOS A.; CORTINA J.; VALLEJO R. *"Differential field response of two Mediterranean tree species to inputs of sewage sludge at the seedling stage"*. Ecol Eng., 37, 2011, 1350– 1359.

VALDEZ-PÉREZ M.A.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO F.; FRANCO-HERNÁNDEZ O.; FLORES COTERA L.B.; DENDOOVEN L. *"Cultivation of beans (Phaseolus vulgaris L.) in limed or unlimed wastewater sludge, vermicompost or inorganic amended soil"*, Sci Hortic-Amsterdam., 128, 2001, 380–387.

VELÁSQUEZ J.; FERRANDO F.; SALVADO J. *"Effects of kraft lignin addition in the production of binderless fiberboard from steam exploded Miscanthus sinensis"*. Ind. Crop Prod., 18, 2008, 17-23.

WANG L.; SHAMMAS W.; HUNG Y. *"Biosólids Treatment Processes"* Handbook of Environmental Engineering., 7, 2008, 443-477.

WENGA C-H.; LIN D-F.; CHIANG P-C. *"Utilization of sludge as brick materials"*. Adv Environ Res., 7, 2003, 679–685

WONG J.W.C.; FANG M.; JIANG R. *"Persistency of bacterial indicators in biosólids stabilization with coal fly ash and lime"*. Water Environ Res., 73, 2001, 607–611.

WONG J. W. C.; Ammaiyappan S. *"Reduction of indicator and pathogenic microorganism in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization"* J. Hazard Mater., 169, 2009, 882-889.

V. CAPITULO MODELO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS DEL BAGAZO FIQUE

En este capítulo se presenta el modelo cinético que permite describir el proceso de DA para el bagazo de fique. El modelo se desarrolló con base en los principios propuestos por Galí *et al.*, (2009), para el proceso de digestión anaerobia de residuos agropecuarios. La caracterización fisicoquímica del bagazo de fique permitió clasificar este residuo como lignocelulósico y dado que este compuesto afecta la DA, se profundizó en el desarrollo del modelo incluyendo el efecto de los pre-tratamientos. Teniendo en cuenta que el bagazo de fique puede estar impregnado de saponinas (presentes en el jugo residual del proceso de beneficio), en este modelo se estudió el efecto inhibitorio causado por saponinas esteroidales (*Furcraea ssp*) sobre la etapa metanogénica usando las funciones de inhibición propuestas por el ADM y modificadas para compuestos farmacéuticos (Fountoulakis *et al.*, 2008).

5.1. EVOLUCIÓN DE LOS MODELOS CINÉTICOS DE LA DA

Actualmente existen más de 2200 reactores implementados en todo el mundo para el tratamiento de diferentes tipos de desechos y aguas residuales (Van Lier, 2008). El auge que ha tenido la producción de biogás a partir de los residuos agroindustriales y los “cultivos energéticos” hace de la digestión anaerobia una tecnología madura y consolidada a nivel mundial (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Sin embargo, la DA de residuos lignocelulósicos presenta limitaciones que pueden causar baja eficiencia del proceso. Por una parte, la estructura y composición de los materiales lignocelulósicos hace que la hidrólisis sea la etapa más lenta del proceso (Vavilin *et al.*, 2008; Hendriks & Zeeman, 2009); por otra parte algunos compuestos pueden causar inhibición sobre la actividad metabólica de los microorganismos,

reduciendo la producción de metano (Patra & Saxena, 2010). Estas limitaciones pueden causar complejidad para incorporar el proceso a nivel industrial. Por consiguiente, el desarrollo y uso de modelos cinéticos puede reducir estos inconvenientes, además de ahorrar tiempo y dinero (Galí *et al.*, 2009).

El modelo matemático de la DA es una herramienta valiosa en el diseño, operación, control y optimización del proceso. La importancia de los modelos se encuentra en la capacidad de reproducir un comportamiento experimental en un simulador de una manera clara y cuantificable; donde las ecuaciones matemáticas son capaces de simular los procesos fisicoquímicos y biológicos de la DA (Mata-Alvarez, 2003; Esposito *et al.*, 2008; Galí *et al.*, 2009).

El ADM 1 (*Anaerobic digestion model* n° 1 por sus siglas en inglés) es el modelo más completo de DA, desarrollado por el grupo “*Task group for mathematical modelling of Anaerobic Digestion Processes*” (Batstone *et al.*, 2002). Este modelo describe sustratos complejos por sus principales componentes (carbohidratos, lípidos, proteínas, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos volátiles, etc), e incluye múltiples pasos que representan los procesos bioquímicos y fisicoquímicos que se desarrollan en la biodegradación anaerobia de compuestos orgánicos complejos (Batstone *et al.*, 2002).

El desarrollo de los modelos de la DA se inició con la descripción de la etapa limitante, la cual depende de las características del sustrato, carga orgánica y temperatura. Posteriormente los modelos se fueron haciendo más complejos, al incluir los efectos de las inhibiciones por la presencia de AGVT no ionizados, compuestos tóxicos, el pH y la concentración de iones amonio (Bozzini *et al.*, 1996; Gavala *et al.*, 1996; Kiely *et al.*, 1997). (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Ejemplos de modelos cinéticos de DA.

Modelo	Cinética	Grupo de Bacterias	Proceso	Etapas limitante	Inhibición incluida
Mosey et al., 1983	Monod	Bacterias acidogénicas	Acidogénesis		H ₂
	Monod	Bacterias que utilizan ácido propiónico	Acetogénesis	Acetogénesis	H ₂
	Monod	Bacterias que utilizan ácido butírico	Acetogénesis		H ₂
	Monod	Bacterias metanogénicas acetoclásticas	Metanogénesis		
	Monod	Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas	Metanogénesis		
Smith et al., 1988	Primer orden		Hidrólisis	Metanogénesis	
	Primer orden	Bacterias acidogénicas	Acidogénesis		AGVT
	Andrews	Bacterias metanogénicas	Metanogénesis		AGV no ionizados
Siegrist et al., 1993	Primer orden		Hidrólisis	Acetogénesis	H ₂ , acetato
	Monod	Bacterias acidogénicas	Fermentación de aminoácidos y azúcares		H ₂ , acetato
	Monod	Bacterias acetogénicas	Oxidación anaerobia de ácidos grasos		pH
	Monod	Bacterias acetogénicas	Oxidación anaerobia de propionato		NH ₃ Libre
	Monod	Bacterias metanogénicas acetoclásticas	Conversión de acetato a metano		pH
	Monod	Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas	Conversión de hidrógeno a metano		pH
Kiely et al., 1997	Monod		Hidrólisis/Acidogénesis		NH ₃ Libre
	Monod		Metanogénesis Acetoclástica		

*Fuente: Appels *et al.*, 2008

5.2 MODELO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA ADM

El ADM toma en cuenta que los procesos involucrados en la digestión anaerobia son catalizados por enzimas intra o extracelulares que degradan la materia orgánica (soluble o particulada). La Figura 5.1 y la Tabla 5.2 muestran los

procesos de DA considerados en el ADM y el número de variables, ecuaciones y otros parámetros del modelo respectivamente.

Las principales etapas de la digestión anaerobia descritas por el ADM son (Batstone *et al.*, 2002):

a) Desintegración: Proceso extracelular que convierte la materia orgánica compleja particulada en carbohidratos, lípidos y proteínas.

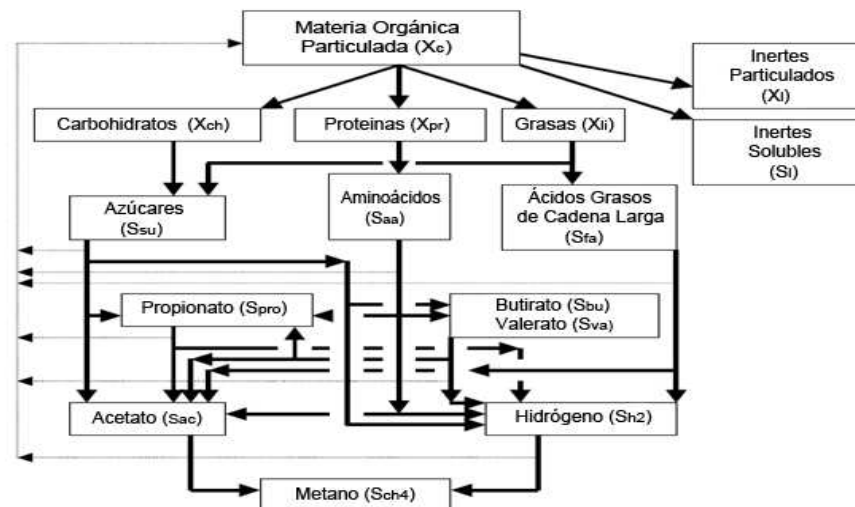
b) Hidrólisis: Proceso extracelular que convierte la materia particulada en monómeros solubles.

c) Acidogénesis: Conversión de monómeros en bicarbonatos, alcoholes, hidrógeno y ácidos orgánicos mediante fermentación.

d) Acetogénesis: Oxidación de alcoholes y ácidos orgánicos a hidrógeno y acetato.

e) Metanogénesis: Formación de metano a partir de hidrógeno y acetato. Además, se describe la inhibición de la digestión (para la inhibición por hidrógeno y amoníaco libre), consumo competitivo (para la competencia entre butirato y valerato) y la inhibición por pH (Batstone *et al.*, 2002). Su uso permite la simulación de la producción y composición del biogás producto de la digestión anaeróbica (Lubken *et al.*, 2007).

El modelo cinético ADM representa la desintegración, la hidrólisis y la muerte microbiana (el modelo considera siete grupos microbianos) mediante cinéticas de primer orden y la ecuación de monod para explicar el consumo de compuestos solubles y producción de biogás (Lubken *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Bollon *et al.*, 2011).



	Procesos	Inhibiciones	Variables
19 Bioquímicos	4 Para degradación de materia particulada	pH	12 Particuladas (X)
	8 Para degradación de materia soluble	Falta de nitrógeno inorgánico	18 Solubles (S _i)
	7 para concentración de biomasa celular	H ₂ para la degradación de ácidos grasos, H ₂ para la degradación de butirato/valerato, H ₂ para la degradación de propionato.	3 Gases
	6 Equilibrio ácido/base	NH ₃ para la degradación del acetato	
	3 Transferencia de gas		

Figura 5.1 Procesos bioquímicos de ADM (Parker, 2005)

Fuente: El Autor

El modelo ADM también ha sido extendido para la evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos farmacéuticos (Cloruro de propanolol, ofloxacina y diclofenaco de sodio) mediante una función de inhibición no competitiva modificada. La importancia de estos compuestos radica en que su baja biodegradabilidad y naturaleza hidrofóbica afectan las poblaciones microbianas particularmente las metanogénicas acetoclásticas (Fountoulakis *et al.*, 2008).

5.3 DESARROLLO DE LA ESTRUCTURA DEL MODELO

La Figura 5.2 presenta un algoritmo de las etapas que se tuvieron en cuenta para desarrollar, simular y validar el ADM para la digestión anaerobia del BF.

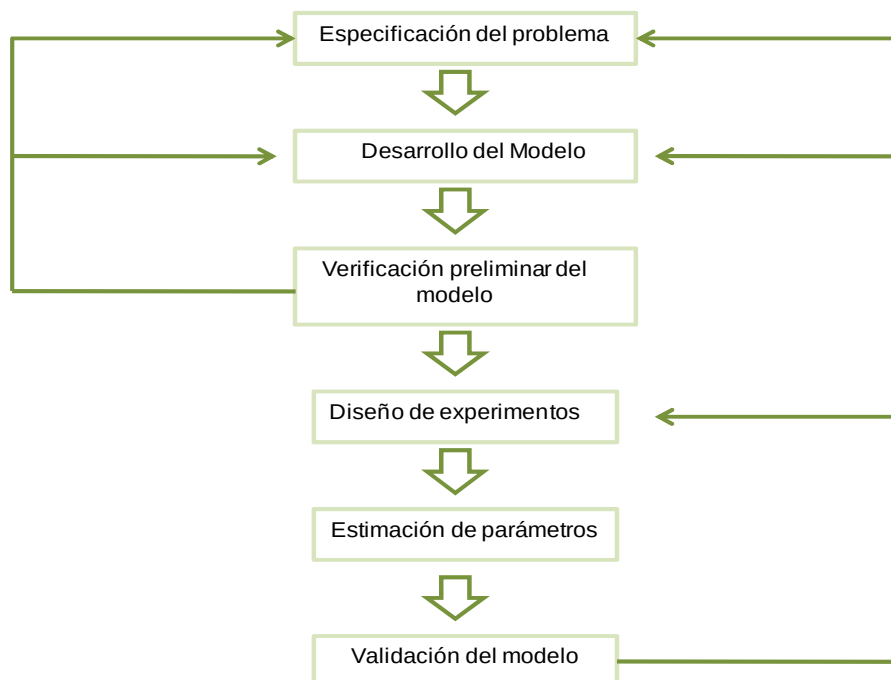


Figura 5.2 Algoritmo de desarrollo del modelo AMD para la DA del BF

Fuente: El Autor

5.4 Efecto de los pre-tratamientos hidrotérmico, oxidativo y mecánico sobre la cinética de la degradación anaerobia del BF

El ADM modificado por el grupo de investigación de Biotecnología Ambiental (BA) de la Universidad de Barcelona (España) (Galí *et al.*, 2009) fue adaptado para simular la degradación anaerobia del bagazo de fique. El ADM utilizado en este trabajo está compuesto de 32 procesos (19 procesos biológicos, 10 procesos de equilibrio y 4 procesos de transferencia de gases), 34 componentes solubles (S_i), 13 compuestos particulados (X_i) y 4 componentes gaseosos (G_i). La Tabla 5.2 presenta la matriz de Petersen donde todos los procesos y compuestos son detallados. En las tablas 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6 se describen las variables de estado, los parámetros estequiométricos, los parámetros cinéticos a condiciones mesófilicas y los términos de inhibición respectivamente.

Tabla 5.2 Matriz de Petersen

Componente → i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Rate (p _i , kg COD·m ⁻³ ·d ⁻¹)
j procesos ↓	S _{su}	S _{aa}	S _{fa}	S _{va}	S _{bu}	S _{pro}	S _{ac}	S _{h2}	S _{ch4}	S _{ic}	S _{in}	S _i	
1 Desintegración												$\int_{s_{L,xc}}$	$K_{dis} \cdot X_c$
2 Hidrólisis de carbohidratos	1												$K_{hyd,ch} \cdot X_{ch}$
3 Hidrólisis de proteínas		1											$K_{hyd,pr} \cdot X_{pr}$
4 Hidrólisis de lípidos	$1 - f_{fa,li}$		$f_{fa,li}$										$K_{hyd,li} \cdot X_{li}$
5 Consumo de azúcares	-1				$(1 - Y_{su}) \cdot f_{bu,su}$	$(1 - Y_{su}) \cdot f_{pro,su}$	$(1 - Y_{su}) \cdot f_{ac,su}$	$(1 - Y_{su}) \cdot f_{h2,su}$		$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i V_i \cdot 5$	$-(Y_{su}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_s + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_1$
6 Consumo de aminoácidos		-1		$(1 - Y_{aa}) \cdot f_{va,aa}$	$(1 - Y_{aa}) \cdot f_{bu,aa}$	$(1 - Y_{aa}) \cdot f_{pro,aa}$	$(1 - Y_{aa}) \cdot f_{ac,aa}$	$(1 - Y_{aa}) \cdot f_{h2,aa}$		$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i V_i \cdot 6$	$N_{aa} - (Y_{aa}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,aa} \cdot \frac{S_{aa}}{K_s + S_{aa}} \cdot X_{aa} \cdot I_1$
7 Consumo de LCFA			-1				$(1 - Y_{fa}) \cdot 0.7$	$(1 - Y_{fa}) \cdot 0.3$			$-(Y_{fa}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,fa} \cdot \frac{S_{fa}}{K_s + S_{fa}} \cdot X_{fa} \cdot I_2$
8 Consumo de Valerato				-1		$(1 - Y_{c4}) \cdot 0.54$	$(1 - Y_{c4}) \cdot 0.31$	$(1 - Y_{c4}) \cdot 0.15$			$-(Y_{c4}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,c4} \cdot \frac{S_{va}}{K_s + S_{va}} \cdot X_{c4} \cdot \frac{1}{1 + \frac{S_{bu}}{S_{va}}} \cdot I_2$
9 Consumo de Butirato					-1		$(1 - Y_{c4}) \cdot 0.8$	$(1 - Y_{c4}) \cdot 0.2$			$-(Y_{c4}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,c4} \cdot \frac{S_{bu}}{K_s + S_{bu}} \cdot X_{c4} \cdot \frac{1}{1 + \frac{S_{va}}{S_{bu}}} \cdot I_2$
10 Consumo de Propionato						-1	$(1 - Y_{pro}) \cdot 0.57$	$(1 - Y_{pro}) \cdot 0.43$		$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i V_i \cdot 10$	$-(Y_{pro}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,pr} \cdot \frac{S_{pro}}{K_s + S_{pro}} \cdot X_{pro} \cdot I_2$
11 Consumo de Acetato							-1		$(1 - Y_{ac})$	$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i V_i \cdot 11$	$-(Y_{ac}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,ac} \cdot \frac{S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \cdot X_{ac} \cdot I_3$
12 Consumo de Hidrógeno								-1	$(1 - Y_{h2})$	$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i V_i \cdot 12$	$-(Y_{h2}) \cdot N_{bac}$		$K_{m,h2} \cdot \frac{S_{h2}}{K_s + S_{h2}} \cdot X_{h2} \cdot I_1$
13 Muerte de X _{su}													$K_{dec,xsu} \cdot X_{su}$
14 Muerte de X _{aa}													$K_{dec,xaa} \cdot X_{aa}$
15 Muerte de X _{fa}													$K_{dec,xfa} \cdot X_{fa}$
16 Muerte de X _{c4}													$K_{dec,xc4} \cdot X_{c4}$
17 Muerte de X _{pro}													$K_{dec,xpro} \cdot X_{pro}$
18 Muerte de X _{ac}													$K_{dec,xac} \cdot X_{ac}$
19 Muerte de X _{h2}													$K_{dec,xh2} \cdot X_{h2}$
	Monosacáridos (kg COD·m ⁻³)	Aminoácidos (kg COD·m ⁻³)	Ácidos grasos de cadena larga (kg COD·m ⁻³)	Total Valerato (kg COD·m ⁻³)	Total Butirato (kg COD·m ⁻³)	Total Propionato (kg COD·m ⁻³)	Total Acetato (kg COD·m ⁻³)	Gas Hidrógeno (kg COD·m ⁻³)	Gas Metano (kg COD·m ⁻³)	Carbono Inorgánico (kg·mole C·m ⁻³)	Nitrógeno Inorgánico (kg·mole N·m ⁻³)	Inertes Solubles (kg COD·m ⁻³)	Factores de Inhibición $I_1 = I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$ $I_2 = I_{pH} \cdot I_{IN,lim} \cdot I_{h2}$ $I_3 = I_{pH} \cdot I_{IN,lim} \cdot I_{NH3,acc}$

Fuente: Galí *et al.*, 2009

Tabla 5.2 Matriz de Petersen

Componente → i		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Rate (p _i , kg COD·m ⁻³ ·d ⁻¹)
j	procesos ↓	X _c	X _{ch}	X _{pr}	X _{li}	X _{su}	X _{aa}	X _{fa}	X _{c4}	X _{pro}	X _{ac}	X _{h2}	X _i	
1	Desintegración	-1	$f_{ch,xc}$	$f_{pr,xc}$	$f_{li,xc}$								$f_{sl,xc}$	$K_{dis} \cdot X_c$
2	Hidrólisis de carbohidratos		-1											$K_{hyd,ch} \cdot X_{ch}$
3	Hidrólisis de proteínas			-1										$K_{hyd,pr} \cdot X_{pr}$
4	Hidrólisis de lípidos				-1									$K_{hyd,li} \cdot X_{li}$
5	Consumo de azúcares					Y _{su}								$K_{m, su} \cdot \frac{S_{su}}{K_s + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_1$
6	Consumo de aminoácidos						Y _{aa}							$K_{m, aa} \cdot \frac{S_{aa}}{K_s + S_{aa}} \cdot X_{aa} \cdot I_1$
7	Consumo de LCFA							Y _{fa}						$K_{m, fa} \cdot \frac{S_{fa}}{K_s + S_{fa}} \cdot X_{fa} \cdot I_2$
8	Consumo de Valerato								Y _{c4}					$K_{m, c4} \cdot \frac{S_{vc4}}{K_s + S_{vc4}} \cdot X_{c4} \cdot \frac{1}{1 + S_{bu} \cdot S_{vc4}} \cdot I_2$
9	Consumo de Butirato								Y _{c4}					$K_{m, c4} \cdot \frac{S_{bu}}{K_s + S_{bu}} \cdot X_{c4} \cdot \frac{1}{1 + S_{vc4} \cdot S_{bu}} \cdot I_2$
10	Consumo de Propionato									Y _{pro}				$K_{m, pr} \cdot \frac{S_{pro}}{K_s + S_{pro}} \cdot X_{pro} \cdot I_2$
11	Consumo de Acetato										Y _{ac}			$K_{m, ac} \cdot \frac{S_{ac}}{K_s + S_{ac}} \cdot X_{ac} \cdot I_3$
12	Consumo de Hidrógeno											Y _{h2}		$K_{m, h2} \cdot \frac{S_{h2}}{K_s + S_{h2}} \cdot X_{h2} \cdot I_1$
13	Muerte de X _{su}	1				-1								$K_{dec, su} \cdot X_{su}$
14	Muerte de X _{aa}	1					-1							$K_{dec, aa} \cdot X_{aa}$
15	Muerte de X _{fa}	1						-1						$K_{dec, fa} \cdot X_{fa}$
16	Muerte de X _{c4}	1							-1					$K_{dec, c4} \cdot X_{c4}$
17	Muerte de X _{pro}	1								-1				$K_{dec, pro} \cdot X_{pro}$
18	Muerte de X _{ac}	1									-1			$K_{dec, ac} \cdot X_{ac}$
19	Muerte de X _{h2}	1										-1		$K_{dec, h2} \cdot X_{h2}$
		Compuestos (kg COD·m ⁻³)	Carbohidratos (kg COD·m ⁻³)	Proteínas (kg COD·m ⁻³)	Lípidos (kg COD·m ⁻³)	Azúcar que se degrada (kg COD·m ⁻³)	Aminoácidos que se degradan (kg COD·m ⁻³)	LCFA que se degrada (kg COD·m ⁻³)	Valerato y butirato que se degrada (kg COD·m ⁻³)	Propionato que se degrada (kg COD·m ⁻³)	Acetato que se degrada (kg COD·m ⁻³)	Hidrógeno que se degrada (kg COD·m ⁻³)	Partículas inertes (kg COD·m ⁻³)	Factores de Inhibición $I_1 = I_{pH} \cdot I_{IN, lim}$ $I_2 = I_{pH} \cdot I_{IN, lim} \cdot I_{h2}$ $I_3 = I_{pH} \cdot I_{IN, lim} \cdot I_{NH3, Xac}$

Fuente: Fuente: Galí et al., 2009

Tabla 5.3 Variables de consideradas en el modelo

Variables	Unidad	Nombre
SH^+	kmol/m^3	Protón
SOH^-	kmol/m^3	Hidroxilo
SHPO_4^{-2}	kmol/m^3	Fosfato de hidrógeno
SH_2PO_4^-	kmol/m^3	Fosfato de di hidrógeno
SNH_4^+	kmol/m^3	Amonio
SNH_3	kmol/m^3	Amonio libre
SCO_2	kmol/m^3	Dióxido de carbono
SHCO_3^-	kmol/m^3	Bicarbonato
SH_2S	kmol/m^3	Ácido sulfúrico
SHS^-	kmol/m^3	Sulfuro de hidrógeno
Ssu	kg DQO/m^3	Azúcar soluble
Saa	kg DQO/m^3	Aminoácidos solubles
Sfa	kg DQO/m^3	AGVT de cadena larga solubles
Shva	kg DQO/m^3	Ácido Valérico
Sva $^-$	kg DQO/m^3	Valerato
Shbu	kg DQO/m^3	Ácido Butírico
Sbu $^-$	kg DQO/m^3	Butirato
Shpro	kg DQO/m^3	Ácido propiónico
Spro $^-$	kg DQO/m^3	Propionato
Shac	kg DQO/m^3	Ácido acético
Sac $^-$	kg DQO/m^3	Acetato
Sh $_2$	kg DQO/m^3	Hidrógeno
Sch $_4$	kg DQO/m^3	Metano
Si	kg DQO/m^3	Soluble inerte
Xc1	kg DQO/m^3	<i>Composite</i>
Xc2	kg DQO/m^3	Muerte de la biomasa celular <i>composite</i>
Xch	kg DQO/m^3	Carbohidratos
Xpr	kg DQO/m^3	Proteínas
Xli	kg DQO/m^3	Lípidos
Xsu	kg DQO/m^3	Biomasa celular (azúcar)
Xaa	kg DQO/m^3	Biomasa celular (aminoácidos)
Xfa	kg DQO/m^3	Biomasa celular (Ácidos de cadena larga)
Xc $_4$	kg DQO/m^3	Biomasa celular (valerato/Butirato)
Xpro	kg DQO/m^3	Biomasa celular (Propionato)
Xac	kg DQO/m^3	Biomasa celular (ácido acético)
Xh $_2$	kg DQO/m^3	Biomasa celular (Hidrógeno)
Xi	kg DQO/m^3	Partículas inertes
G _{co2}	kg mol/m^3	Dióxido de carbono
G _{h2}	kg DQO/m^3	Gas hidrógeno
G _{ch4}	kg DQO/m^3	Gas metano
G _{h2s}	kg DQO/m^3	Gas sulfuro

Fuente: Galí *et al.*, 2009

Tabla 5.4 Parámetros estequiométricos

Fracciones [$DQO_{\text{producto}}/DQO_{\text{sustrato}}$]	Nomenclatura	Valor
Inerte soluble del residuo inicial	fsixc1	variable
Inerte particulada del residuo inicial	fxixc1	variable
Carbohidratos del residuo inicial	fchxc1	variable
Proteínas del residuo inicial	fprxc1	variable
Lípidos del residuo inicial	flixc1	variable
Inertes solubles de la muerte de la biomasa	fsixc2	0.1
Inertes particulados de la muerte de la biomasa	fxixc2	0.1
Carbohidratos de la muerte de la biomasa	fchxc2	0.1
Proteínas de la muerte de la biomasa	fprxc2	0.67
Lípidos de la muerte de la biomasa	flixc2	0.033
Ácidos grasos de cadena larga de lípidos	ffali	0.95
H ₂ de azúcares	fh2su	0.19
Ácido butírico de azúcares	fbusu	0.13
Ácido propionico de azúcares	fprsu	0.27
Ácido acético de azúcares	facsu	0.41
H ₂ de aminoácidos	fh2aa	0.06
Valerato de aminoácidos	fvaaa	0.23
ácido butírico de aminoácidos	fbuaa	0.26
Propionico de aminoácidos	fpraa	0.05
Acético de aminoácidos	faca	0.4
Rendimientos [DQO_i/DQO]	Nomenclatura	Valor
Rendimiento degradación de azúcar	Ysu	0.1
Rendimiento degradación de aminoácidos	Yaa	0.08
Rendimiento degradación de ácidos de cadena larga	Yfa	0.06
Rendimiento degradación de valerato y propionato	Yc4	0.06
Rendimiento degradación de propionato	Ypro	0.04
Rendimiento degradación del ácido acetico	Yac	0.05
Rendimiento en la degradación de h2	Yh2	0.06

Fuente: Batstone et al., 2002

Tabla 5.5 Parámetros cinéticos a condiciones mesófilicas

Constante	Unidades	Valor
Hidrólisis		
Kdis 1	d ⁻¹	variable
Kdis 2	d ⁻¹	0.15
Kh_xch	d ⁻¹	10
kh_xpr	d ⁻¹	10
kh_xli	d ⁻¹	10
Degradación		
Km_su	DQO/DQO/d	30
Km_aa	DQO/DQO/d	50
Km_fa	DQO/DQO/d	6
Km_c4	DQO/DQO/d	20
Km_pr	DQO/DQO/d	13
Km_ac	DQO/DQO/d	8
Km_h2	DQO/DQO/d	35
Constantes de saturación media		
Ks_su	Kg/m ³	0.5
Ks_aa	Kg/m ³	0.3
Ks_fa	Kg/m ³	0.4
Ks_c4	Kg/m ³	0.2
Ks_pr	Kg/m ³	0.1
Ks_ac	Kg/m ³	0.15
Ks_h2	Kg/m ³	7.00 e -06
Muerte microbiana		
Kdec_xsu	d ⁻¹	0.02
Kdec_xaa	d ⁻¹	0.02
Kdec_xfa	d ⁻¹	0.02
Kdec_xc4	d ⁻¹	0.02
Kdec_xpr	d ⁻¹	0.02
Kdec_ac	d ⁻¹	0.02
Kdec_h2		0.02
Constantes de inhibición		
KI_h2s	Kg/m ³	0.64
KI_h2pro	Kg/m ³	3.5 e -06
KI_h2fa	Kg/m ³	5.00 e -06
KI_h2c4	Kg/m ³	1.00 e -05
KI_in	kg mol/ m ³	1.00 e -04
KI_nh ₃	kg mol/ m ³	0.0018
Límites inhibición por pH		
pH LIaa		4
pH LIaa		5.5
pH LLxh2		5
pH LLxh2		6
pH LIxac		6
pHLLxac		7
Parámetros equilibrio ácido/base		
KaacidIC	k mol H/ m ³	4.94E-07
KaacidIN	k mol H/ m ³	1.09 E-09
KaacidAC	k mol H/ m ³	1.74E-05
KaacidPRO	k mol H/ m ³	1.32 E-05
KaacidBU	k mol H/ m ³	1.50 E-05
KaacidVA	k mol H/ m ³	1.38E-05
KaacidIP	k mol H/ m ³	6.60 E-08
KaacidH ₂ S	k mol H/ m ³	8.90E-08
Coefficientes de rata másica		
Kla_h2	d ⁻¹	195
Kla_ch4	d ⁻¹	184
Kla_co2	d ⁻¹	163
Kla_h2s	d ⁻¹	150
Kh_h2	k mol DQO/m ³ /Bar	0.000738
Kh_ch4	k mol DQO/m ³ /Bar	0.00116
Kh_co2	k mol C/m ³ /Bar	0.0271
Kh_h2S	k mol S/m ³ /Bar	0.0017
Disociación ácido/base		
Kab	k mol H/ m ³ /d	1215752192

Fuente: Batstone *et al.*, 2002

Tabla 5.6 Términos individuales de inhibición

Término	Expresión	Comentarios
In_Inlim	$1/(1+KSIN/SNH_4+SNH_3)$	Limitación de nitrógeno inorgánico
In_h2fa	$1/(1+SH_2/KI_{h2fa})$	Inhibición de H ₂ in degradación de ácidos
In_h2c4	$1/(1+SH_2/KI_{h2c4})$	Inhibición de H ₂ en la degradación de butirato/valerato
In_h2pro	$1/(1+SH_2/KI_{h2pro})$	Inhibición de H ₂ en la degradación de propionato
In_nh3xac	$1/(1+SH_2/KI_{h2nh3})$	Inhibición de amonio en la degradación de acetato
In_h2sxac	$1/(1+SH_2/KI_{h2s})$	Inhibición de H ₂ S en la degradación del acetato

Fuente: Batstone *et al.*, 2002

5.4.1. Efecto de las saponinas esteroideas (*Furcraea* ssp) sobre la cinética de la acetogénesis-metanogénesis

Como se discutió en el capítulo 1, las saponinas esteroideas provenientes del BF causan inhibición de la metanogénesis a concentraciones superiores a 57 ppm empleando como sustrato modelo acetato. La descripción del efecto inhibitorio de las saponinas sobre la etapa metanogénica de la digestión se desarrolló mediante una función de inhibición no competitiva propuesta Fountouakis *et al.*, 2008 (Ecuación 5.1).

Ecuación 5.1

$$r_{modificado} = r \times \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{I}{K_i} \right)^m} \right)$$

Donde:

r: velocidad de consumo del acetato expresado en unidades del ADM [kg DQO/m³/d]

I: Concentración del compuesto inhibitorio (saponinas esteroideas)

K_i: Constante de inhibición

m: Constante que representa la dependencia no lineal de la inhibición.

Dependiendo de la concentración del inhibidor tres casos se pueden presentar:

- a) Cuando $m=1$, la inhibición se convierte de tipo no competitiva.
- b) Cuando $m<1$, el efecto del inhibidor sobre la cinética es insignificante con la concentración del inhibidor
- c) Cuando $m>1$, el efecto del inhibidor es muy sensible con la concentración del inhibidor.

5.5. MÉTODOS

5.5.1. Implementación del modelo cinético ADM para la DA del BF

El modelo empleado fue desarrollado en MATLAB/SIMULINK con el código escrito en el lenguaje C. Los datos de la caracterización del BF, estequiometría y cinética se escribieron en excel y se exportaron a Matlab.

La Figura 5.2 muestra un esquema del proceso en el entorno de Simulink. Las diferentes ecuaciones diferenciales son escritas en C y están estructuradas en orden de solucionar para cada componente o variable. Al mismo tiempo, las variables del modelo y las condiciones de operación de la digestión son definidas y conectadas con Matlab mediante Simulink. Para establecer la conexión entre el lenguaje C y Matlab/Simulink, los archivos de C deben estar compilados y convertidos en archivos MEX (Galí *et al.*, 2009).

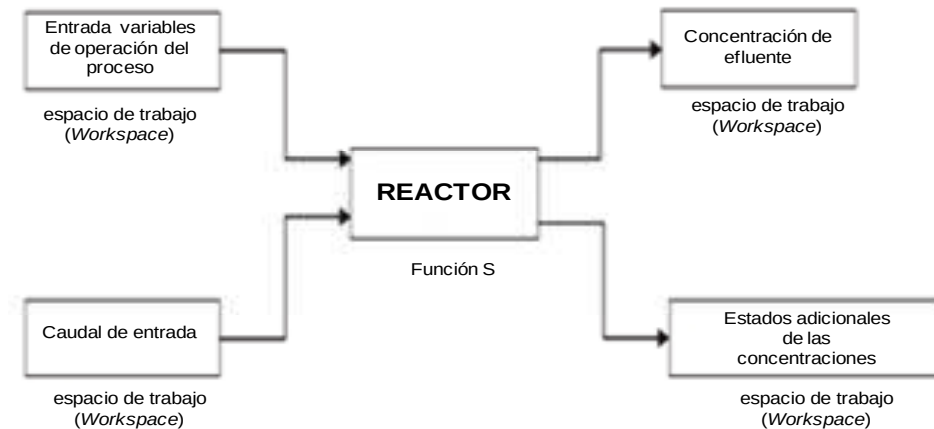


Figura 5.3 Esquema de Matlab/Simulink

Fuente: Astals *et al.*, 2011

5.5.2. Validación del modelo

Los datos obtenidos durante las determinaciones de los PBM para los diferentes experimentos explicados en los capítulos anteriores fueron empleados para calcular las constantes de desintegración y validar el modelo.

La cuantificación de ST, SV, DQO se realizó de acuerdo con los protocolos descritos por el standard methods (APHA, 1998). Las principales fracciones de carbohidratos no estructurales: lignina, celulosa y hemicelulosa se calcularon a partir de la fibra detergente ácida, la fibra detergente neutra y la fibra de kurschner (Goering & Van Soest, 1970).

5.5.3. Determinación de la constante de desintegración

La producción de metano del BF es limitada por el rendimiento de la hidrólisis de la materia orgánica particulada (etapa de desintegración en el ADM). Asumiendo una cinética de primer orden para la hidrólisis de material particulado (BF), las

constantes de desintegración K_{dis} se calcularon a partir de la ecuación 5.1 (Angelidaki *et al.*, 2009), utilizando la herramienta *curvefitting* de Matlab.

Ecuación 5.2

$$SMP(t) = SMP_{\alpha} * (1 - e^{(-K_{dis} * t)})$$

Donde:

$SMP(t)$ = Volumen de CH_4 acumulado específico (mL/g SV adicionados) en el tiempo t (a condiciones estándar de presión y temperatura).

SMP_{α} = Máximo volumen de CH_4 específico producido (mL/g SV adicionados) durante el tiempo de digestión.

K_{dis} = Constante de desintegración de primer orden ($días^{-1}$) y el tiempo t .

t = Tiempo (días).

5.5.4. Estimación de parámetros de inhibición de saponinas esteroideas

Los valores de los parámetros de velocidad de consumo de acetato $K_{m,ac} = 2.98$ kg DQO/kg DQO/d, $K_{s,ac} = 0.075$ kg/m³ fueron tomados como referencia (Fountoulakis *et al.*, 2008).

Los parámetros de inhibición, K_i y m fueron estimados utilizando la herramienta *curve fitting* de Matlab, a partir del cálculo de la velocidad de consumo de acetato para la cada una de las concentraciones de saponina evaluadas (29 ppm, 57 ppm, 86 ppm y 114 pm). Se consideró que la concentración de saponina permanece constante durante el ensayo.

5.6. RESULTADOS

5.6.1. Efecto de los pre-tratamientos sobre la cinética de biodegradación del BF

5.6.1.1. Caracterización del sustrato

Como se mencionó en el capítulo 5 el BF fue tratado mediante procesos físicos: hidrotérmico y reducción de tamaño de partícula y un proceso químico: adición de solución de peróxido alcalinizado.

La caracterización detallada de la materia orgánica particulada es un factor relevante para realizar los balances de masa durante el desarrollo de el modelo. Las fracciones de materia soluble corresponden a la concentración de glucosa (asumiendo que todos los ART son glucosa), concentración de ácido acético (asumiendo que todos los AGVT son ácido acético), inertes solubles. En la tabla 5.7 se presenta la caracterización de los sustratos aplicados al modelo ADM.

Tabla 5.7 Caracterización fisicoquímica del BF tratado y sin tratar

Parámetro	Unidades	BF Tratado			BF húmedo Sin tratar	BF Seco Sin tratar
		Hidrotérmico	Oxidativo	Mecánico (2.36mm)		
pH		4.5	7		4	
ST	gST kg ⁻¹	124	960	960	195	960
SV	gSV kg ⁻¹	111	860	860	163	860
DQO total	g O ₂ kg ⁻¹ ST	965.3	922.49	1200		1230
Celulosa	g kg ⁻¹ ST	244.7	235.1	410		418
Hemicelulosa	g kg ⁻¹ ST	188.4	210.09	220		221.8
Lignina	g kg ⁻¹ ST	130	68.1	157.6		157.6
C	%	35.69	31.89	34.35		35.58
H	%	6.05	5.25	4.88		6.02
O	%	43.84	40.69	42.07		47.44
N	%	1.46	0.29	1.27		1.32
Fórmula empírica		C ₂₉ H ₅₈ O ₂₆ N ₁	C ₁₂₈ H ₂₅₃ O ₁₂₃ N ₁	C ₃₂ H ₅₄ O ₂₉ N ₁		C ₃₃ H ₆₇ O ₃₃ N ₁

Fuente: El Autor

5.6.1.2. Fracciones (DQO) de la materia orgánica particulada Xc

La materia orgánica Xc esta compuesta por carbohidratos (fchxc1), proteínas (fprxc1), lípidos (flixc1) e inertes solubles y particulados (fsixc1, fxixc1) (Batstone et al., 2002). En este estudio la lignina representa la fracción de los compuestos inertes particulados (fxixc1), teniendo en cuenta que es un polímero recalcitrante a la biodegradabilidad anaerobia (Jimenez *et al.*, 1990; Iglesias *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2001; Buranov & Mazza, 2008). En la tabla 5.8 se especifican las fracciones de DQO particulados para cada uno de los tipos de bagazo evaluados. El fraccionamiento de DQO es relevante para el desarrollo del modelo porque los mecanismos de degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas es diferente (Galí *et al.*, 2009).

Tabla 5.8 Fracciones de DQO del BF particulado

Sustrato		fchxc1	fprxc1	flixc1	fxixc1	fsixc1
BF tratado	Hidrotérmico	0.53	0.08	0.12	0.21	0
	Oxidativo	0.57	0.07	0.12	0.12	0
	Mecánico	0.62	0.05	0.09	0.2	0
BF		0.59	0.06	0.09	0.19	0

Fuente: El Autor

Los valores de cada una de las fracciones varían de acuerdo a la caracterización de los tipos de BF. Por ejemplo, el tratamiento oxidativo es el que alcanza la mayor remoción de lignina, por consiguiente, la fracción fxixc1 disminuye 37% con respecto al BF sin tratar.

5.6.1.3. Constantes de desintegración

Teniendo en cuenta que la etapa hidrolítica es la limitante para los procesos de degradación anaerobia de sustratos lignocelulósicos como el BF; un aumento del 14% en la constante de desintegración para el BF tratado hidrotérmicamente representa un incremento en la velocidad de reacción de la etapa hidrolítica (Tabla 5.9).

Tabla 5.9 Constantes de desintegración del BF tratado y sin tratar

Sustrato		$K_{dis} [d^{-1}]$	Coefficiente de correlación	PBM [$m^3CH_4/kg\ SV$]
BF tratado	Hidrotérmico	0.24	0.98	0.37
	Oxidativo	0.23	0.97	0.36
	Mecánico	0.23	0.97	0.36
BF sin tratar		0.21	0.99	0.30

Fuente: El Autor

De igual forma los tratamientos oxidativo y mecánico mostraron un incremento del 9% de la K_{dis} con respecto al bagazo sin tratar, favoreciendo la eficiencia del proceso. Los valores de K_{dis} para cada uno de los tipos de bagazo evaluados presentan una relación lineal con los resultados obtenidos de PBM, evidenciando el marcado efecto de los pre tratamientos sobre la cinética del proceso de digestión anaerobia del BF.

5.7. ESTRUCTURA, DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MODELO

El modelo se construyó a partir de la caracterización del BF tratado y sin tratar, las constantes de desintegración y las fracciones de DQO. Los valores iniciales de cada una de las variables del modelo se establecen a partir de la caracterización del BF y las fracciones de DQO (Tablas 5.7 y 5.8). Las variables de operación introducidas al modelo se describen en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10 Variables de operación para la simulación de la producción de metano a partir del BF

Variables de operación	Valor
Temperatura [$^{\circ}C$]	39
Volumen del reactor [ml]	500
Volumen de operación [ml]	350
RIS	1.3
[gsv inóculo/gsv sustrato]	
Sustrato	BF
Tiempo de operación [días]	BF tratado
Tipo de operación	30
Estado	Discontinua
	Estable
Variables de respuesta	
pH, %CH ₄ , PBM [$m^3\ CH_4/kg\ SV$]	

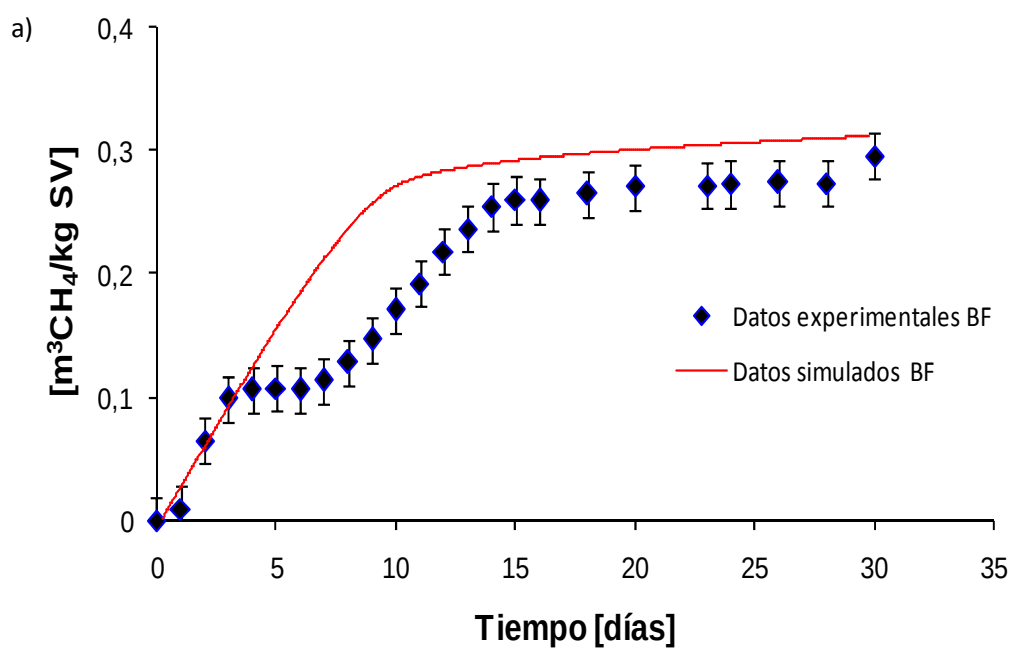
Fuente: El Autor

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 5.11. Dado que el mayor PBM se alcanzó con el pre tratamiento hidrotérmico en la Figura 5.4 se muestran los perfiles de biodegradabilidad para el bagazo de fique tratado y sin tratar.

Tabla 5.11 Variables de respuesta de la DA del BF simulado y experimental

Residuo	Valores			
BF sin tratar	Variables de respuesta	Experimental	Simulado	% error
	pH	7.36	7.5	1.9
	%CH ₄	65	68	4.6
	Rendimiento	0.30	0.31	3.3
Hidrotérmico	pH	7.36	7.5	1.9
	%CH ₄	65	70	7.7
	Rendimiento	0.37	0.39	5.4

Fuente: El Autor



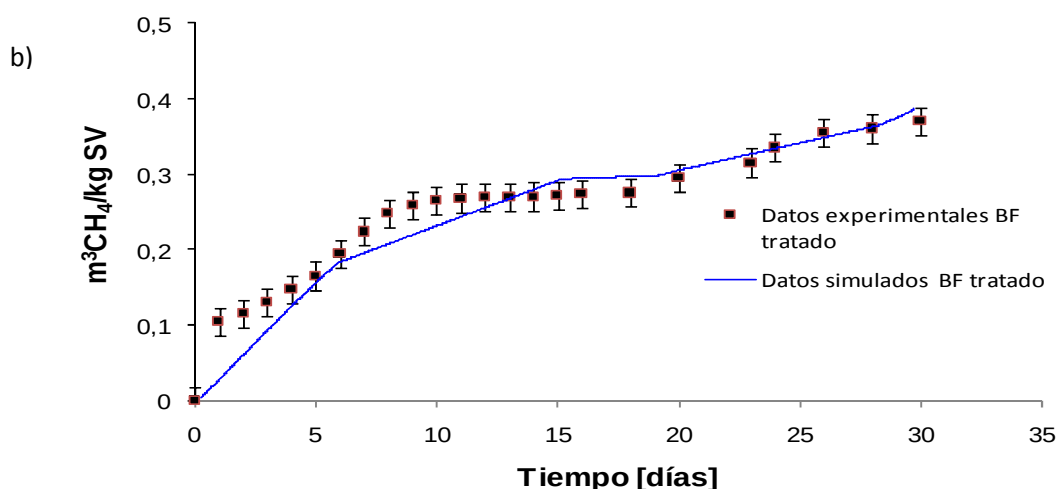


Figura 5.3 Perfiles de biodegradabilidad del bagazo de fique. a) PBM a partir de bagazo de fique en estado natural; b) PBM a partir de bagazo de fique tratado hidrotérmicamente.

Fuente: El Autor

Los resultados obtenidos de la simulación se correlacionan con resultados alcanzados durante el desarrollo experimental con porcentajes de error menores al 8%, lo cual indica que la descripción matemática del ADM se ajusta satisfactoriamente a los ensayos experimentales.

5.7.1 Evaluación del efecto de las saponinas esteroidales (*Furcraea ssp*) sobre la cinética de la acetogénesis-metanogénesis

5.7.2 Parámetros cinéticos de inhibición por saponinas esteroidales

Los valores estimados fueron: $K_i = 0.55$ mg/l y $m = 2.93$, con un coeficiente de correlación $R = 0.90$ (Ecuación 5.1). Estos parámetros indican que el efecto de las saponinas sobre la velocidad de consumo del acetato dependen de la concentración de éste compuesto. En la Figura 5.4 se presenta el consumo de acetato en presencia de 114 ppm de saponinas *furcraea*, durante el tiempo de fermentación para los datos obtenidos experimentalmente y simulados.

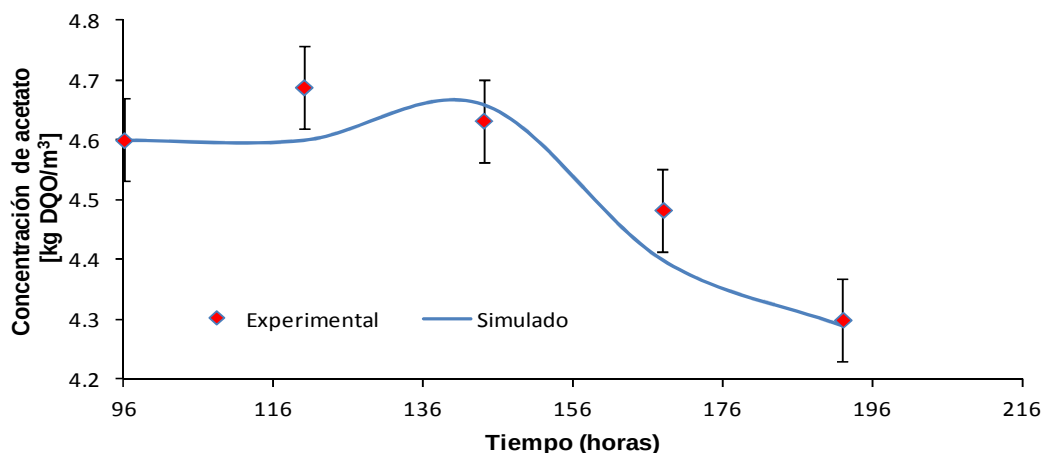


Figura 5.4 Consumo de acetato durante el tiempo de fermentación adicionando 114 ppm de saponinas
Fuente: El Autor

De acuerdo con los perfiles de consumo de acetato simulados y experimentales se puede afirmar que la incidencia de compuestos inhibitorios como las saponinas puede ser descrito mediante funciones no lineales de inhibición no competitiva. Este tipo de inhibiciones han sido utilizadas para incorporar la inhibición de ácidos volátiles no ionizados formados durante la degradación anaerobia de residuos sólidos urbanos (Vavilin *et al.*, 2003).

5.8 CONCLUSIONES

El modelo cinético ADM modificado por Galí *et al.*, 2009 fue implementado para describir la velocidad de desintegración del bagazo de fique en su estado natural y tratado por procesos físicos y químicos.

El efecto de los pre-tratamientos se evidencia en los valores de las constantes de desintegración del BF, lo que se traduce en un mejoramiento de los rendimientos de la etapa hidrolítica y consecuentemente en la producción de biogás. El comportamiento de compuestos inhibitorios (saponinas) sobre el proceso de

digestión anaerobia puede ser simulado empleando una función no lineal de tipo no competitivo.

5.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIDAKI I.; ALVES M., BOLZONELLA D.; BORZACCONI L.; CAMPOS J.; GUWY A.; KALYUZHNYI S.; JENICEK P.; VAN LIER J. *“Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays”*. Water Sci. Technol., 59, 2009, 927-934.

APHA - American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20th. Washington, USA.

APPELS L.; BAEYENS J.; DEGRE`VE J.; DEWIL R. *“Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge”*. Prog Energ Combust., 34, 2008, 755–781.

ASTALS S.; ARISO M.; GALÍ A.; MATA-ALVAREZ J. *“Co-digestión of pig manure and glycerine:Experimental and modelling study”*. J Environ Management., 92, 2011, 1091-1096.

BATSTONE D.J.; KELLER I.; ANGELIDAKI I.; KALYUZHNYI SV.; PAVLOSTATHIS SG.; ROZZI A.; SANDERS W.T.M.; SIEGRIST H.; VAVILIN V.A. *“The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1)”*. Wat. Sci. Tech., 45, 2002, 65-73.

BOLLON J.; LE-HYARIC; BENBELKACEM H.; BUFFIERE P. *“Development of a kinetic model for Anaerobic dry digestion processes: focus on acetate degradation and moisture content”*. Biochem Eng. J., 2011. DOI: 10.1016/j.bej.2011.06.011.

BOZINIS N.A.; ALEXIOU I.E.; PISTIKOPOULOS E. "*Optimal design and operation of an anaerobic co-digestion plant*". Wat. Sci. Tech., 34, 1996, 383-392.

BURANOV A.; MAZZA G. Review Lignin in straw of herbaceous crops. Industrial crops and products., 28, 2008, 237–259.

ESPOSITO G.; FRUNZO L.; PANICO A.; ANTONIO G. "*Mathematical modelling of desintegration-limited co-digestion of OFMSW and sewage sludge*". Wat. Sci. Tech., 58, 2008, 1513-1519.

FOUNTOLULAKIS M.S.; STAMATELATOU K.; LYBERATOS G. "*The effect of pharmaceuticals on the kinetics of methanogenesis and acetogenesis*". Bioresource Technol., 99, 2008, 7083-7090.

GALÍ A.; BENABDALLAH T.; ASTALS S.; MATA-ALVAREZ J. "*Modified version of ADM1 model for agro-waste application*". Bioresource Technol., 100, 2009, 2783–2790.

GAVALA H.N.; SKIADAS I.V.; BOZINIS N.A.; LYBERATOS G. "*Anaerobic codigestion of agricultural industries wastewaters*" Wat. Sci. Tech., 34, 1996, 67-75.

GOERING H.K.; VAN SOEST P.J. Forage Fibre Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook No. 379, ARS-USDA, Estados Unidos., 1970.

HENDRIKS A.T.W.M.; ZEEMAN G. "*Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*". Bioresource Technol., 100, 2009, 10-18.

IGLESIAS G.; BAO M.; LAMAS J.; VEGA A. "*Soda pulping of miscanthus sinensis. Effect of operational variables on pulp yield and lignin solubilization*". Bioresource Technol., 58, 1996, 17-23.

JIMENEZ S.; CARTAGENA M.C.; ARCE A. *"Influence of lignin on the methanization of lignocellulosic wastes"* Biomass., 21, 1990, 43-54.

KIELY G.; TAYFUR G.; DOLAN C.; TANJI K. *"Physical and mathematical modeling of anaerobic digestion of organic wastes"*. Wat. Res., 31, 1997, 534-540.

LUBKEN M.; WICHERN M.; SCHLATTMANN M.; GRONAUER A.; HORN H. *"Modelling the energy balance of an anaerobic digester fed with cattle manure and renewable energy crops"*. Water Resear., 2007, 41, 4085-4096.

MATA-ALVAREZ J. *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. Editorial IWA, España, 2003, 1-30.

MATA-ALVAREZ J.; MACÉ S.; LLABRÉS P. *"Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives"*. Bioresource Technol., 74, 2000, 3-16.

PATRA A.; SAXENA J. *"A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen"* Phytochemistry., 71, 2010, 1198–1222.

VAN LIER J. *"High-rate anaerobic wastewater treatment: diversifying from end-of-the-pipe treatment to resource-oriented conversion techniques"*. Wat. Sci. Tech., 57.8, 2008, 1137-1148.

VAVILIN V.A.; FERNANDEZ B.; PALATSI J.; FLOTATS X. *"Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview"*. Waste Management., 28, 2008, 939-951.

VAVILIN V.A.; RYTOV S.; LOKSHINA L.; PAVLOSTATHIS P.; BARLAZ M. *"Distributed model of solid waste anaerobic digestion: effects of leachate recirculation and pH adjustment"*. Biotechnol Bioeng., 81, 2003, 66-73.

XIAO B.; SUN F.; SUN R. "*Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw*" *Polymer Degradation and Stability*. 74, 2001, 307–319.

ZHAO B.; ZHENG-BO Y.; BING-JIE N.; YANG M.; HAN-QING Y.; HARADA H. "*Modeling anaerobic digestion of aquatic plants by rumen cultures: Cattail as an example*". *Water Research.*, 43, 2009, 2047-2055.

CONCLUSIONES GENERALES

Se identificó un consorcio microbiano (mezcla de líquido ruminal con lodo estiércol de cerdo) que degrada el bagazo de fique y mejora el arranque de reactores anaerobios con sustratos lignocelulósicos. La principal ventaja de mezclar estos inóculos radica en aprovechar el efecto sinérgico de sus grupos tróficos, dado que el líquido ruminal favorece la conversión de fracciones particuladas en fracciones solubles fácilmente biodegradables (etapa hidrolítica) y el lodo de cerdo presenta una alta actividad metanogénica.

La caracterización microbiológica del inóculo compuesto por LR+LEC demostró que la mezcla contiene un alto recuento de bacterias fermentativas de glucosa (27.61 NMP) indicando una mayor actividad enzimática durante las etapas hidrolítica y acidogénica del proceso. Esta característica del inóculo es favorable dado que la hidrólisis es la etapa limitante de la digestión anaerobia de los sustratos lignocelulósicos como el bagazo de fique.

En esta investigación se demostró que las saponinas esteroideas (*Furcraea* spp) a bajas concentraciones, estimulan la actividad hidrolítica y metanogénica de los consorcios microbianos presentes en la mezcla de líquido ruminal y lodo estiércol de cerdo.

El máximo potencial de biometanización del bagazo de fique ($0.30 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ adicionados) se obtuvo cuando el proceso se llevó a cabo a una RIS de 1.3 en rango mesófilo en una configuración de una fase.

Se consiguió adaptar el inóculo para obtener una excelente conversión del bagazo de fique a metano ($1.90 \text{ kw electricidad/l reactor} \cdot \text{día}$), en operación continua y a temperatura ambiente. Durante 120 días de operación los niveles de

concentración de consumo de ART y producción de AGVT mostraron concordancia con la dinámica de crecimiento microbiano.

La digestión anaerobia del bagazo de fique en una configuración en dos fases se ve favorecida al emplear inóculos diferentes en cada fase, aprovechando las propiedades de los consorcios: alta actividad hidrolítica en el caso del líquido ruminal para la fase A y alta actividad metanogénica del lodo estiércol de cerdo en la fase B, alcanzando un incremento de 16% en el volumen de metano con respecto al proceso convencional.

El encalado del LE, subproducto de la digestión anaerobia del bagazo de fique, mediante $\text{Ca}(\text{OH})_2$, produce un biosólido sin riesgo biológico constituyéndose en una alternativa tecnológica viable para la disposición de este residuo.

El efecto controlante de la etapa hidrolítica durante la digestión anaerobia se consigue minimizar, mediante la solubilidad de la estructura lignocelulósica del bagazo de fique a partir de un tratamiento hidrotérmico. Este pre-tratamiento mejora la accesibilidad y disponibilidad del sustrato, aumentando en un 30% el potencial de biometanización.

Mediante la implementación del modelo ADM fue posible describir paso a paso la etapa de desintegración de un residuo lignocelulósico, como es el caso del bagazo de fique, en el cual los efectos inhibitorios de la saponina y la lignina inciden directamente sobre el rendimiento de la digestión anaerobia.

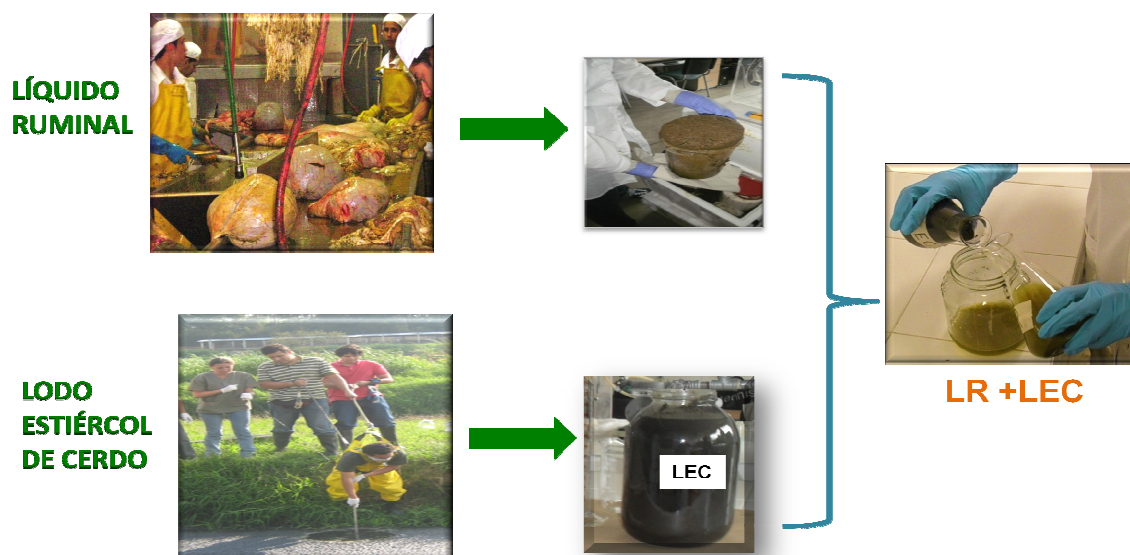
ANEXOS

ANEXO 1: REGISTRO FOTOGRÁFICO

1. Proceso de beneficio del fique: a) Planta de fique; b) Desfibrado; c) Bagazo de fique generado



2. Toma de muestra de los consorcios microbianos



3. Reactores discontinuos



4. Reactor en continuo: a) Carga de inóculo; b) Alimentación de sustrato



5. Reactor en continuo: Medición de biogás producido



6. Aprovechamiento del lodo efluente: a) Biosol; b) Adición de biosol a tierra estéril; c) Sembrado de semillas de pasto alpiste.



7. Crecimiento del pasto alpiste

