

**POTENCIALES DE BIOMETANIZACIÓN Y ACTIVIDADES MICROBIOLÓGICAS
DE ESTIÉRCOLES: BOVINO, PORCINO Y EQUINO A DIFERENTES
DILUCIONES**

**AMÍLCAR LEONARDO MOJICA PRADILLA
BRYAN KEITH TOVAR VARGAS**

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

2018

**POTENCIALES DE BIOMETANIZACIÓN Y ACTIVIDADES MICROBIOLÓGICAS
DE ESTIÉRCOLES: BOVINO, PORCINO Y EQUINO A DIFERENTES
DILUCIONES**

**AMÍLCAR LEONARDO MOJICA PRADILLA
BRYAN KEITH TOVAR VARGAS**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Ingeniero Químico**

Directores:

**HUMBERTO ESCALANTE HERNÁNDEZ
PhD en Ingeniería Química**

Codirectoras:

**LILIANA DEL PILAR CASTRO MOLANO
PhD en Ingeniería Química**

**MABEL JULIANA QUINTERO SILVA
MSc. en Ciencias Básicas Biomédicas**

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

2018

DEDICATORIA

A mi papá porque siempre fue mi principal modelo a seguir. Se sacrificó para darnos todo y aislarnos siempre de los problemas económicos en los tiempos de crisis. A ti todo y más, así pronto ya no estés junto a mí.

A mi mamá por su sacrificio por el hogar y por mi papá, y por ser ese abrazo y comprensión que siempre necesité en los momentos más tristes y confusos.

A mi tío German por ser ese segundo papá cuando más lo necesitamos.

A mi familia y amigos porque sin ellos todo hubiera sido más difícil de lo que fue.

Amílcar

A mi padre por creer en mí. Me dejaste tus enseñanzas las cuales empecé a entender después de partir de mi lado. Uno de tus deseos fue ver este sueño que hoy se está realizando. Sé que desde arriba me acompañas y espero reflejar todo lo que aprendí al verte. Padre con orgullo esto es para ti.

A mi madre, que en los tiempos más difíciles me mostró la forma para mantenerme luchando por todo lo que queremos. Sabes que este logro es de los dos, porque sin ti no hubiera sido posible. Te aseguro que esto es solo el inicio.

A mi tío Beto, por ser mi segundo padre. Me has enseñado sobre la vida y en especial el preciado valor de la humildad.

A mi abuela por forjar lo mejor de mí. Hoy como un ángel guías mi camino.

A Victor, Cristian, Federman, Marcela y Amílcar, que más que amigos son mis hermanos. Porque hemos pasado por mil situaciones y seguimos avanzando en nuestras respectivas luchas apoyándonos incondicionalmente.

A mi familia por hacerme saber que me tienen como referente y por estar apoyándome en cada uno de mis sueños.

A mis amigos por brindarme momentos de alegría y llenarme de esperanza de que vendrán más situaciones para seguir creciendo como persona.

Bryan

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque fue el guía en este camino, dándonos sabiduría para tomar decisiones y la fuerza para sobreponernos a todas las adversidades.

Al profesor Humberto Escalante por creer en nosotros y por ser un padre y guía tanto en el ámbito académico como fuera de la universidad.

A la profesora Liliana Castro por confiar en nuestro trabajo y darnos un apoyo cuando lo requerimos aportándonos nuevos conocimientos.

A la profesora Mabel Quintero por las enseñanzas y amistad que nos brindó desde los primeros semestres.

Al grupo de Digestión Anaerobia por acogernos en su familia y formarnos aún más en nuestras competencias investigativas.

A Don Guillermo, Don Eduardo y Don Wilson por siempre decir sí a nuestro llamado de ayuda en las distintas responsabilidades del laboratorio.

A Doña Dominga por siempre abrirnos a cualquier hora las puertas de su finca a pesar de los problemas presentados.

A Jaime Jaimes e Ivan Gómez por ser guías y consejeros cuando surgieron problemas dentro de este mundo de la digestión anaerobia.

A nuestros padres por el apoyo durante este largo proceso, y su confianza incondicional a pesar de que tuvimos que comenzar de nuevo varias veces.

A todos los profesores, administrativos, compañeros y amigos que hicieron parte de este camino llamado universidad.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA	21
1.2 PARÁMETROS Y VARIABLES DEL PROCESO	23
1.2.1 Temperatura	23
1.2.2 pH	23
1.2.3 Ácidos grasos volátiles (AGV).....	24
1.2.4 Alcalinidad Total (AT).....	24
1.2.5 Demanda química de oxígeno (DQO).....	24
1.2.6 Actividad hidrolítica específica (AHE)	25
1.2.7 Actividad metanogénica específica (AME).....	25
1.2.8 Potencial bioquímico de metano (PBM)	25
2. METODOLOGÍA	26
2.1 PRIMERA ETAPA.....	26
2.1.1 Caracterización física de los estiércoles	27
2.2 SEGUNDA ETAPA	27
2.2.1 Preparación de diluciones.....	27
2.2.2 Determinación de actividad hidrolítica (AHE) y actividad metanogénica (AME).....	29
2.3 TERCERA ETAPA.....	29
2.3.1 Determinación del potencial de biometanización (PBM)	29
2.3.2 Variables de estabilidad de la digestión anaerobia	30
3. RESULTADOS.....	32
3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS ESTIÉRCOLES	32

3.2 ACTIVIDADES HIDROLÍTICA ESPECÍFICA (AHE) Y ACTIVIDAD METANOGÉNICA ESPECÍFICA (AME)	33
3.2.1 Actividad hidrolítica específica (AHE)	33
3.2.2 Actividad metanogénica específica (AME).....	34
3.3 POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN (PBM) DE LOS ESTIÉRCOLES DILUIDOS	35
3.3.1 PBM de diluciones de estiércol Bovino (EB)	35
3.3.2 PBM de diluciones de estiércol Equino (EE).....	37
3.3.3 PBM de diluciones de estiércol Porcino (EP).....	38
3.3.2 Variables de estabilidad de la Digestión Anaeróbica.	40
4. CONCLUSIONES	46
5. RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Dinámica del PBM del estiércol bovino (EB) a diferentes diluciones.	36
Figura 2. Dinámica de PBM del estiércol equino (EE) a diferentes diluciones.....	37
Figura 3. Dinámica de PBM del estiércol porcino (EP) a diferentes diluciones.....	38

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cantidad de muestra presente en cada una de las diferentes diluciones.....	28
Tabla 2. Caracterización física de los estiércoles sin diluir	32
Tabla 3. Caracterización química de los estiércoles diluidos.....	33
Tabla 4. pH de los estiércoles a diferentes diluciones	35
Tabla 5. PBM a los 40 días para los tres estiércoles a diferentes diluciones.....	39
Tabla 6. Variables de estabilidad de la Digestión Anaeróbica.....	35
Tabla 7. Sólidos totales (ST) para los tres estiércoles a diferentes diluciones antes y después de la determinación del PBM	66
Tabla 8. Sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) para los tres estiércoles a diferentes diluciones	67

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Actividad hidrolítica específica (AHE).....	57
Anexo B. Azúcares reductores totales (ART)	59
Anexo C. Desplazamiento alcalino	60
Anexo D. pH.....	61
Anexo E. Ácidos grasos volátiles (AGV) y Alcalinidad total (AT)	62
Anexo F. Demanda química de oxígeno (DQO)	64
Anexo G. Sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV).....	65
Anexo H. Sólidos totales (ST) para los tres estiércoles a diferentes diluciones antes y después de la determinación del PBM	66
Anexo I. Sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) para los tres estiércoles a diferentes diluciones	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGV:** Ácidos grasos volátiles
- AD:** Agua destilada
- AHE:** Actividad hidrolítica específica
- AME:** Actividad metanogénica específica
- ART:** Azúcares reductores totales
- AT:** Alcalinidad total
- DA:** Digestión anaerobia
- DQO:** Demanda química de oxígeno
- EB:** Estiércol bovino
- EE:** Estiércol equino
- EP:** Estiércol porcino
- PBM:** Potencial bioquímico de metanización
- SST:** Sólidos suspendidos totales
- SSV:** Sólidos suspendidos volátiles
- ST:** Sólidos totales
- SV:** Sólidos volátiles

RESUMEN

TÍTULO: POTENCIALES DE BIOMETANIZACIÓN Y ACTIVIDADES MICROBIOLÓGICAS DE ESTIÉRCOLES: BOVINO, PORCINO Y EQUINO A DIFERENTES DILUCIONES*.

AUTORES: AMÍLCAR LEONARDO MOJICA PRADILLA**; BRYAN KEITH TOVAR VARGAS**

PALABRAS CLAVE: Estiércol, Diluciones, Bovino, Porcino, Equino, Estudio bioquímico, Actividades microbianas.

DESCRIPCION:

Los estiércoles: bovino (EB), porcino (EP) y equino (EE) se encuentran entre los residuos renovables más abundantes en los agroecosistemas, los cuales generan problemas de contaminación si no son tratados adecuadamente. La estabilización de la materia orgánica presente en ellos se ha logrado mediante la digestión anaerobia (DA). En el desarrollo de esta investigación se realizó un estudio del comportamiento bioquímico y actividad microbiana de los EB, EP, EE en proporciones de dilución: 1:3, 1:5, 1:7, para hacer seguimiento de las etapas que intervienen en la DA, tomando como variables de respuesta el potencial de biometanización (PBM) y las actividades: hidrolítica específica (AHE) y metanogénica específica (AME). Se realizó la respectiva caracterización fisicoquímicas de las diluciones antes y después de la determinación del PBM. La finalidad de la caracterización fue determinar la conversión de la materia orgánica en términos de demanda química de oxígeno soluble (DQOs) y de sólidos volátiles (SV), concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), la estabilidad del proceso (pH-AT) y la concentración de inhibidores (NH_4^+). Para la DA de los casos de estudio, la mayor producción de biogás se obtuvo del EE diluido en agua en relación 1:5 alcanzando un valor de $0,205 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgSV}$ definiéndolo con óptimas capacidades para ser sustrato; en torno a la AME el mejor resultado fue obtenido por el EP diluido en relación 1:5 con un valor de $0,0287 \text{ g DQO / g SSV día}$ indicando que su consorcio microbiano es el mejor inóculo y respecto a la AHE el mejor valor fue alcanzado por el EE con la relación 1:3 obteniendo un valor de $0,0231 \text{ g DQO / g SSV}$ destacándose como buen inóculo en la degradación de cadenas poliméricas, además que el EB tiene buenas propiedades tanto de inóculo como de sustrato.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías Físico-Químicas. Escuela de ingeniería Química. Directora Liliana Castro Ing. Química Ph.D. Director Humberto Escalante Ing. Químico Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: POTENTIALS OF BIOMETHANIZATION AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITIES OF MANURES: BOVINE, PORCINE AND EQUINE TO DIFFERENT DILUTIONS*.

AUTHORS: AMÍLCAR LEONARDO MOJICA PRADILLA **; BRYAN KEITH TOVAR VARGAS**.

KEY WORDS: Manure, Dilutions, Bovine, Porcine, Equine, Biochemical study, Microbial activities.

DESCRIPTION:

Manures: bovine (BM), porcine (PM) and equine (EM) are among the most abundant renewable residues in agroecosystems, which generate pollution problems if they are not treated properly. The stabilization of organic matter present in them has been achieved through anaerobic digestion (AD). In the development of this research, a study of the biochemical behavior and microbial activity of the BM, PM, EM in dilution ratios was made: 1:3, 1:5, 1:7, to follow the stages involved in the AD, taking as response variables the biomethanization potential (BMP) and the activities: specific hydrolytic activity (SHA) and specific methanogenic activity (SMA). The physicochemical characterization of the dilutions was carried out before and after the determination of BMP. The purpose of the characterization was to determine the conversion of organic matter in terms of chemical demand for soluble oxygen (COD) and volatile solids (VS), concentration of volatile fatty acids (VFA), the stability of the process (pH-TA) and the concentration of inhibitors (NH_4^+). For the AD of the case studies, the highest production of biogas was obtained from the EI diluted in water in a ratio of 1:5 reaching a value of $0.205 \text{ m}^3\text{CH}_4 / \text{kg VS}$ defining it with optimal capacities to be a substrate, around the SMA the best result was obtained by the PM diluted in a 1:5 ratio with a value of $0.0287 \text{ g COD} / \text{g VSS}$ day indicating that its microbial consortium is the best inoculum and with respect to the SHA the best value was reached by the EM with the ratio 1:3 obtaining a value of $0.0231 \text{ g COD} / \text{g VSS}$ standing out as a good inoculum in the degradation of polymer chains, besides that the BM has good properties of both inoculum and substrate.

* Degree Work

** Faculty of Engineering Physic-chemical. School of Chemical Engineering. Director Liliana Castro Chemical Engineer Ph.D. Director Humberto Escalante Chemical Engineer PhD

INTRODUCCIÓN

Colombia se caracteriza por ser un país pecuario. En el año 2017 este sector aportó un crecimiento del 4,4% en el producto interno bruto (PIB)¹. Según las estadísticas del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), actualmente existen 23,5 millones cabezas de bovino, 5,3 millones de porcinos y 1,4 millones de equinos, aumentando en un 3,5%, 4,6% y 1,2% respectivamente sus poblaciones en comparación al año 2016, siendo las especies más abundantes en el campo colombiano^{2 3 4}.

Respecto a la producción de estiércol, se tiene que para el ganado bovino su generación diaria está alrededor de 8 kg de estiércol/100 kg de peso por cabeza de ganado⁵, la población porcina diariamente genera aproximadamente 2 kg de estiércol/100 kg de peso por porcino y se generan 3,8 kg de estiércol/100 kg de peso por equino⁶.

¹ PERFETTI, M., CORRAL, D., CARLOS, S., PRADA, F. Cuentas Trimestrales -Colombia Producto Interno Bruto (PIB) Segundo Trimestre de 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 2 de enero de 2018]. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/pib/bol_PIB_IVtrim16_oferta_demanda.pdf%0A

² INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Censo Bovino en Colombia. Censo Pecuario Nacional - 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 10 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>

³ INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Censo Porcino en Colombia. Censo Pecuario Nacional - 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 10 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>

⁴ INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Censo Equino en Colombia. Censo Pecuario Nacional - 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 10 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>

⁵ MARTÍ-HERRERO, J. Biodigestores familiares: Guía de diseño y manual de instalación. Proyecto EnDev Bolivia – Acceso a Energía GTZ. 2008. [En Línea]. [Consultado: 2 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.bivica.org/upload/biodigestores-familiares.pdf>

⁶ SAGARPA. Utilización de estiércoles. 2000. [En Línea]. [Consultado: 2 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Utilizaci%F3n%20de%20esti%20rcoles.pdf>

Una alternativa promisorio para la gestión de los estiércoles es el proceso de digestión anaerobia (DA), el cual utiliza material biodegradable para ser descompuesto por microorganismos en ausencia de oxígeno y así obtener productos de valor agregado. La DA es una tecnología con triple beneficio: a) produce un biogás como fuente de energía renovable; b) reduce los problemas de contaminación causados por el estiércol y c) produce un digerido (fertilizante orgánico) que permite el reciclaje de nutrientes en la tierra⁷.

El estudio de la DA puede ser abordado desde el punto de vista bioquímico y microbiológico. El estudio bioquímico es cuantificado mediante el potencial de biometanización (PBM). El PBM se define como la capacidad de biodegradabilidad anaeróbica de un sustrato, expresada en términos de rendimiento (Y_p/s), como el volumen de metano acumulado, medido en condiciones estándar de temperatura y presión (TPE), por cantidad de sustrato en términos de materia orgánica. El PBM permite evaluar la viabilidad del proceso anaerobio y proyectar su diseño⁸.

Desde el punto de vista microbiológico, es posible evaluar el comportamiento microbiano mediante la actividad de cada etapa metabólica. Según el tipo de análisis que se desee realizar se pueden obtener resultados de forma independiente desde hidrólisis, fermentación/acidogénesis, acetogénesis, hasta metanogénesis. Este tipo de estudio es comúnmente llevado a cabo para determinar estabilidad, variaciones del rendimiento, actividad de los consorcios bacterianos, inactivaciones o redirección de rutas metabólicas según las condiciones de operación que se le suministren al proceso⁹.

⁷ MANTILLA-AVILA, L. Implementación de un reactor rural para la digestión anaerobia de estiércol bovino en la finca la Marcella. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, 2016

⁸ STRÖMBERG, S., NISTOR, M. y LIU, J. Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*. 2014, vol. 34, pp. 1939–1948

⁹ ANGELIDAKI, I., KARAKASHEV, D., BATSTONE, D. J., PLUGGE, C. M. y STAMS, A. J. M. Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology*. 2011, vol. 494, pp. 327-351. Disponible en: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>

La DA se ha posicionado como un proceso de producción de energía renovable en zonas rurales no interconectadas que además permite estabilizar la materia orgánica presente en el estiércol¹⁰. Esta tecnología se lleva a cabo en reactores tubulares denominados biodigestores de bajo costo (BDG) los cuales presentan beneficios técnicos, económicos y ambientales¹¹. La referencia al bajo costo es debido a que su construcción es con mangas de polietileno tubular, baja inversión económica en materiales y fácil instalación¹².

Durante tres décadas, la población rural colombiana ha hecho uso de los BDG generando energía en forma de biogás para cocción de alimentos. Se estima que en Colombia hay más de 120 digestores de bajo costo, en zonas rurales de difícil acceso, alimentados con EB y EP¹³. Con respecto al estiércol equino (EE) la instalación de digestores con este sustrato aún no ha sido reportada en el país.

Con respecto a la operación del biodigestor, para evitar atascamientos con masas y formaciones de nata en su superficie se requiere diluir el estiércol con agua. Adicionalmente, una buena dilución de la mezcla asegura que el biodigestor realmente sea de flujo continuo y que a su vez genere una buena producción de metano. En estudios empíricos y experimentales se han determinado rangos de dilución entre 1:3 y 1:4 para EB. Referente al EP, la literatura reporta altas diluciones en su operación sin definir un valor específico¹⁴. Estudios relacionados con dilución de EE no han sido reportados hasta el momento.

¹⁰ RODRÍGUEZ, L. La fundación UTA y la promoción de los sistemas integrados sostenibles. En: RedBioCol. Abril, 2016. Vol 1, pp. 35–38

¹¹ BOTERO BOTERO, R. y PRESTON, T. R. Biodigestor de bajo costo para la producción de combustible y fertilizante a partir de excretas. *Bbc*. 1987, pp. 1-20. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/Biodigestores/04-biodigestores.pdf>

¹² OLAYA, Y. y GONZALEZ, L. Fundamentos para el diseño de biodigestores: Modulo Para La Asignatura de Construcciones Agrícolas. Palmira, Universidad Nacional de Colombia. 2009. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7967/4/luisoctaviogonzalezsalcedo.20121.pdf>

¹³ GARFÍ, M., MARTÍ-HERRERO, J., GARWOOD, A. y FERRER, I. Household anaerobic digesters for biogas production in Latin America: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, vol. 60, pp. 599-614

¹⁴ MARTÍ-HERRERO, J. Op. Cit.

Por lo anterior, se requiere realizar un estudio del comportamiento bioquímico y actividad microbiana de los estiércoles (EB, EP, EE) en función de la dilución. El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el comportamiento bioquímico y microbiológico de las diluciones (1:3, 1:5, 1:7) de los estiércoles bovino, porcino y equino tomando como variables de respuesta el potencial de biometanización (PBM) y las actividades: hidrolítica específica (AHE) y metanogénica específica (AME).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el cual materia orgánica fácilmente biodegradable es convertida en biogás mediante la acción de un consorcio bacteriano en ausencia de oxígeno. Este biogás que está compuesto principalmente por metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂), es una fuente de energía limpia renovable con numerosas utilidades tales como generación calor y electricidad¹⁵.

Desde que la materia orgánica empieza a degradarse hasta que termina en convertirse a biogás, se llevan a cabo varias fases o etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

La hidrólisis es la primera etapa, la cual consiste en la degradación de cadenas hidrolizables largas y complejas tales como carbohidratos, lípidos y proteínas en moléculas simples llamadas monómeros: azúcares, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos respectivamente¹⁶.

La hidrólisis es considerada una de las etapas más activas y a la vez lentas de la digestión anaerobia debido a la complejidad de las moléculas que deben ser

¹⁵ SURENDRA, K. C., TAKARA, D., HASHIMOTO, A. G. y KHANAL, S. K. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014, vol. 31, pp. 846–859

¹⁶ VASCO-CORREA, J., KHANAL, S., MANANDHAR, A. y SHAH, A. Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. *Bioresource Technology*. 2017, vol. 247, pp. 1015–1026

degradadas por las enzimas. En numerosas ocasiones se debe apoyar esta etapa con pretratamientos de la biomasa inicial para facilitar y/o acelerar el proceso¹⁷.

En la acidogénesis, las moléculas resultantes de la fase hidrolítica son convertidas por bacterias acidogénicas-fermentativas en ácidos grasos volátiles de tres carbonos o más: ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico principalmente; además de hidrógeno, dióxido de carbono y algunos alcoholes. Otros subproductos como el amoníaco y algunos compuestos sulfurados, por ejemplo: H₂S, son generados producto de la transformación de algunos aminoácidos¹⁸.

En la tercera fase llamada acetogénesis, se lleva a cabo la transformación por medio de las bacterias acetogénicas mediante oxidación anaerobia, de los ácidos grasos y alcoholes en acetato principalmente, así como en CO₂ y H₂. Esta conversión está controlada en gran medida por la concentración de H₂ en la mezcla¹⁹.

La metanogénesis es la última etapa, donde participan los distintos grupos de bacterias metanogénicas para producir metano a través de dos caminos. En el primer camino el acetato se divide para formar CH₄ y CO₂, mientras que en el segundo camino el H₂ es utilizado como donante de electrones y el CO₂ es reducido para producir CH₄²⁰.

¹⁷ AMANI, T., NOSRATI, M. y SREEKRISHNAN, T. R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environmental Reviews*. 2010, vol. 18, pp. 255–278

¹⁸ CHEROSKY, P. B. Anaerobic Digestion of Yard Waste and Biogas Purification by Removal of Hydrogen Sulfide. Tesis de Maestría. The Ohio State University, 2012

¹⁹ APPELS, L., BAEYENS, J., DEGRÈVE, J. y DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, vol. 34, pp. 755–781

²⁰ SURENDRA, K. C., TAKARA, D., HASHIMOTO, A. G. y KHANAL, S. K. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014, vol. 31, pp. 846–859

1.2 PARÁMETROS Y VARIABLES DEL PROCESO

1.2.1 Temperatura La temperatura juega un papel fundamental en el proceso de digestión anaerobia, especialmente sobre la actividad metabólica de los microorganismos encargados de realizar las distintas etapas del mismo.

Dependiendo del rango de temperatura se puede clasificar el proceso en: psicrófilo ($T^{\circ} < 20^{\circ}\text{C}$), mesófilo ($20^{\circ}\text{C} < T^{\circ} < 40^{\circ}\text{C}$) y termófilo ($40^{\circ}\text{C} > T^{\circ}$). Los procesos mesófilos y termófilos (especialmente entre $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$) presentan los mejores resultados, mientras que aquellos llevados a cabo por debajo de los 20°C tienden a generar una mayor acumulación de ácidos grasos volátiles, una menor eficiencia en la reducción de la demanda química de oxígeno y una menor calidad y producción de biogás, especialmente con sustratos de alto contenido lignocelulósico²¹.

1.2.2 pH El pH es una variable esencial para que se lleve a cabo una óptima producción de metano y reducción de los sólidos volátiles. Si bien en la digestión anaerobia el pH puede variar en distintos valores según el sustrato utilizado, el rango óptimo se encuentra entre 6,5-7,5. Valores muy alejados de este rango pueden generar serias consecuencias de inhibición en el proceso, por ejemplo, en la etapa de hidrólisis o sobre los grupos bacterianos, especialmente en las bacterias acidogénicas y metanogénicas debido a su alta sensibilidad a los cambios de pH²².

²¹ ALVAREZ, R. y LIDÉN, G. The effect of temperature variation on biomethanation at high altitude. *Bioresource Technology*. 2008, vol 99, pp. 7278–7284

²² ZHAI, N., ZHANG, T., YIN, D., YANG, G., WANG, X., REN, G. y FENG, Y. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. *Waste Management*. 2015, vol. 38, pp. 126–131

1.2.3 Ácidos grasos volátiles (AGV) Los AGV son ácidos grasos de cadena corta que pueden ser destilados a presión atmosférica. Son el producto principal de la fase acidogénica de la digestión anaerobia²³.

De su concentración depende tanto una producción favorable de metano como una inhibición de la misma. Un factor importante como la cantidad de ácido propiónico requiere especial cuidado debido a que suele ser un indicador de desbalances y fallas en el proceso²⁴.

1.2.4 Alcalinidad Total (AT) La AT es un indicador importante para predecir la estabilidad del proceso, debido a que es una representación de la capacidad buffer del sistema y funciona como respuesta a la acumulación de ácidos grasos volátiles que se puede generar mayormente en sistemas Batch manteniendo el pH en un rango neutro. La relación AGV/AT simboliza la proporción entre ambas variables²⁵.

1.2.5 Demanda química de oxígeno (DQO) La DQO es la masa de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica e inorgánica (metales, sulfatos o nitratos) presente en una muestra. Debido a la rapidez y facilidad de su análisis es un parámetro muy utilizado como indicador de la remoción orgánica y del desempeño del proceso²⁶.

²³ KURUTI, K., NAKKASUNCHI, S., BEGUM, S., JUNTUPALLY, S., ARELLI, V. y ANUPOJU, G. R. Rapid generation of volatile fatty acids (VFA) through anaerobic acidification of livestock organic waste at low hydraulic residence time (HRT). *Bioresource Technology*. 2017, vol. 238, pp. 188–193

²⁴ AYMERICH, E., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M. y SANCHO, L. (2013). Analysis of the stability of high-solids anaerobic digestion of agro-industrial waste and sewage sludge. *Bioresource Technology*. 2013, vol. 144, pp. 107–114

²⁵ DENNEHY, C., LAWLOR, P. G., CROIZE, T., JIANG, Y., MORRISON, L., GARDINER, G. E. y ZHAN, X. Synergism and effect of high initial volatile fatty acid concentrations during food waste and pig manure anaerobic co-digestion. *Waste Management*. 2016, vol. 56, pp. 173–180

²⁶ KAWAI, M., NAGAO, N., KAWASAKI, N., IMAI, A. y TODA, T. Improvement of COD removal by controlling the substrate degradability during the anaerobic digestion of recalcitrant wastewater. *Journal of Environmental Management*. 2016, vol. 181, pp. 838–846

1.2.6 Actividad hidrolítica específica (AHE) La AHE indica la habilidad inherente del consorcio microbiano presente en el estiércol para degradar fuentes complejas de carbono (celulosa, almidón, etc.). Suele ser cuantificada como la velocidad específica de consumo de sustrato o de generación de monómeros en función al inóculo evaluado^{27 28}.

1.2.7 Actividad metanogénica específica (AME) Es la capacidad de la biomasa microbiana para convertir un sustrato específico (hidrógeno, acetato o propionato) en metano; se expresa 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)²⁹. La determinación del AME es importante para evaluar el arranque de reactores anaerobios, optimizar el proceso y para la toma de decisiones acerca del funcionamiento de los reactores³⁰.

1.2.8 Potencial bioquímico de metano (PBM) Es un parámetro muy importante para la caracterización y evaluación de los desechos dado que es la representación del potencial para producir biogás en condiciones anaeróbicas de los mismos. El tiempo de medición del metano producido en una medición de PBM suele durar entre 60-90 días, sin embargo, el rango de días puede variar desde 15-40 o incluso más de 100 días dependiendo el tipo de sustrato y el montaje experimental realizado³¹.

²⁷ MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959, vol. 31, pp. 426–428

²⁸ MSHANDETE, A., BJÖRNSSON, L., KIVAISIA, A., RUBINDAMAYUGIA, M. y MATTIASSON, B. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. *Water Research.* 2005, vol. 39, pp. 1569–1575

²⁹ QUINTERO, M. J. Estudio de consorcios microbianos para la producción de biogás a partir de residuos del fique. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, Facultad de salud. Departamento de Ciencias Básicas, 2012

³⁰ LE HYARIC, R., CHARDIN, C., BENBELKACEM, H., BOLLON, J., BAYARD, R., ESCUDIÉ, R. y 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 Technology.* 2005, vol. 102, pp. 822–827

³¹ KAFLE, G. K. y CHEN, L. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. *Waste Management.* 2016, vol. 48, pp. 492–502

2. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en tres etapas: la primera consistió en la caracterización física de los estiércoles EB, EP, EE. En la segunda etapa se determinaron las actividades: hidrolítica y metanogénica y finalmente en la tercera etapa se determinó el potencial de biometanización.

2.1 PRIMERA ETAPA

Los sustratos utilizados fueron EB, EP y EE, los cuales fueron recolectados en una finca campesina ubicada a 35 minutos (Lat. N 7°11'40.1", Long. 73°04'34.7") en la vía que comunica a la ciudad de Bucaramanga con el municipio de Matanza, Santander. Dicha finca contaba con las tres especies de animales productoras de estos estiércoles, además del servicio de agua. La temperatura alcanza valores inferiores a 20°C en las mañanas y noches, y valores entre 22°C y 28°C en el día.

Los bovinos y equinos con los que cuenta la finca tienen periodos de estabulación de 12 horas. Por otra parte, los porcinos se encuentran en corral las 24 horas.

La recolección de los estiércoles se dio a las 6:00 a.m. En su respectivo establo, el EB fue recogido con pala y almacenado en un recipiente plástico para su transporte. De la misma forma fue recogido el EE en la zona de alta vegetación y el EP en el corral.

Al momento de llegar al laboratorio los recipientes fueron guardados en la nevera a 2°C mientras se les realizaban las pruebas de caracterización física como se presenta a continuación.

2.1.1 Caracterización física de los estiércoles A estos estiércoles frescos antes de diluirlos se les realizó un análisis de la densidad, ST y SV (Método Estándar) para caracterizarlos físicamente. Los experimentos fueron realizados por triplicado para garantizar la estabilidad en los valores de referencia.

Posteriormente, con el fin de poder almacenar los estiércoles en el congelador de la nevera a una temperatura inferior a 3°C para preservar sus propiedades, estos fueron trasegados a bolsas plásticas.

Es importante mencionar que una gran ventaja de utilizar estiércol como sustrato en la digestión anaerobia es que estos presentan un inóculo propio gracias a la presencia de consorcios microbianos en los mismos^{32 33 34}.

2.2 SEGUNDA ETAPA

2.2.1 Preparación de diluciones Diluir la muestra puede generar ciertos beneficios para el proceso de digestión anaerobia, no obstante, de manera general estos beneficios no necesariamente son proporcionales a la dilución debido a que de la misma manera altas diluciones pueden generar inconvenientes de sedimentación y heterogeneidad en el reactor³⁵.

³² ALZATE, M. S. y QUINTERO, M. J. Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. *Revista Investigación, Optimización Y Nuevos Procesos En Ingeniería*. 2016, vol. 29, pp. 117–123

³³ MÖNCH-TEGEDER, M., LEMMER, A. y OECHSNER, H. Enhancement of methane production with horse manure supplement and pretreatment in a full-scale biogas process. *Energy*. 2014, vol. 73, pp. 523–530

³⁴ VILLAR, I., ALVES, D. y MATO, S. Product quality and microbial dynamics during vermicomposting and maturation of compost from pig manure. *Waste Management*. 2017, vol. 69, pp. 498–507

³⁵ BURKE, D. A. Dairy Waste Anaerobic Digestion Handbook: Options for Recovering Beneficial Products From Dairy Manure. Olympia: Environmental Energy Company, 2001. pp. 1-54. Disponible en: <http://www.makingenergy.com/Dairy%20Waste%20Handbook.pdf>

Por esta razón se escogieron las siguientes diluciones en proporción V/V de estiércol-agua: 1:3, 1:5 y 1:7 para mirar el efecto de esta sobre la producción de metano en cada estiércol, de manera que se pudiese cubrir un alto rango de diluciones que sean prácticas y factibles en biodigestores reales. Esta preparación se efectuó en cada caso de estudio por triplicado garantizando la mayor homogeneidad posible entre las mismas.

Con el fin de mantener las condiciones y propiedades termodinámicas de cada reactor de 100 mL iguales, se realizó cada dilución de 60 mL conservando constante el volumen total para cada muestra, variando la cantidad de AD y cantidad de estiércol necesario. A continuación, se presentan los datos de la cantidad de muestra presente en cada botella para las respectivas diluciones:

Tabla 1. Cantidad de muestra presente en cada una de las diferentes diluciones

Estiércol	Dilución	SV [g]	Estiércol [ml]	Estiércol [g]	Agua [g]	Masa Total [g]
Bovino (EB)	1 a 3	1,857	15	15,023	45,0	60,0
	1 a 5	1,238	10	10,015	50,0	60,0
	1 a 7	0,928	7,5	7,511	52,5	60,0
Porcino (EP)	1 a 3	2,570	15	14,024	45,0	59,0
	1 a 5	1,714	10	9,350	50,0	59,3
	1 a 7	1,285	7,5	7,012	52,5	59,5
Equino (EE)	1 a 3	2,035	15	14,406	45,0	59,4
	1 a 5	1,357	10	9,604	50,0	59,6
	1 a 7	1,018	7,5	7,203	52,5	59,7

Posteriormente, cada botella fue aireada con N₂, sellada con tapón de butilo y sello de aluminio, y almacenada en una incubadora a 37°C.

2.2.2 Determinación de actividad hidrolítica (AHE) y actividad metanogénica (AME)

Actividad Hidrolítica Específica: Se llevó a cabo por duplicado siguiendo el protocolo de Soto³⁶ (ANEXO A). Se tomó como variable de respuesta la producción de ART, la cual fue medida con el método colorimétrico de Miller (ANEXO B) utilizando el espectrofotómetro (Specord 2010 PLUS).

Actividad Metanogénica Específica: Se realizó por triplicado siguiendo el protocolo de Astals³⁷, el cuál recomienda llevar todas las muestras a una concentración de 10 gSV/L y utilizar una cantidad de acetato en proporción de 1 g por cada 5 gSV. Se tomó como variable la producción de metano medida a través del método de desplazamiento alcalino³⁸ (ANEXO C).

2.3 TERCERA ETAPA

2.3.1 Determinación del potencial de biometanización (PBM) En esta etapa se llevó a cabo el desarrollo del Potencial Bioquímico de Metano o Potencial de Biometanización (PBM) de cada sustrato a las diluciones correspondientes siguiendo el protocolo propuesto por Angelidaki³⁹ para la preparación de muestras como se describe en la sección 3.2.1. Se realizó por triplicado con el fin de obtener

³⁶ SOTO, M., MENDEZ, R. y LEMA, J. M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests-theoretical basis and experimental set-up. *Water Research*. 1993, vol. 27, pp. 1361-1376

³⁷ ASTALS, S., BATSTONE, D. J., TAIT, S. y JENSEN, P. D. Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Research*. 2015, vol. 81, pp. 208-215

³⁸ ESPOSITO, G. Bio-Methane Potential Tests To Measure The Biogas Production From The Digestion and Co-Digestion of Complex Organic Substrates. *The Open Environmental Engineering Journal*. 2012, vol. 5, pp. 1-8

³⁹ ANGELIDAKI I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., CAMPOS, J. L., GUWY, A. J., KALYUZHNYI, S., JENICEK, P. y VAN LIER, J. B. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. 2009, vol. 59, pp. 927-934

una base de datos confiable para el posterior análisis estadístico y replicación de la información.

La producción de metano se empezó a medir diariamente a partir del día siguiente a la preparación de las diluciones durante 40 días por medio del método de desplazamiento alcalino (ANEXO C).

2.3.2 Variables de estabilidad de la digestión anaerobia En el día 0 y una vez se dio por finalizado el PBM en el día 40, se realizó la medición de las siguientes variables para cada estiércol y sus respectivas diluciones:

- **AGV, AT y pH:** La medición de éstas tres variables se realizó de manera consecutiva. Primero se realizó la medición del pH en un pH-metro (OHAUS Starter 300) siguiendo el método potenciométrico estándar (ANEXO D. Segundo, utilizando una centrífuga (Universal 320 R), un agitador/calentador (Schott SLR) y un pH-metro (OHAUS Starter 300), se llevó a cabo la medición de AGV y AT por medio del método titrimétrico estándar (ANEXO E).
- **Amonio:** Por el método fotométrico APHA 4500-NH₃ se midió la cantidad de amonio NH₄⁺ utilizando el espectrofotómetro (Specord 2010 PLUS).
- **DQO:** La demanda química de oxígeno se midió por medio del espectrofotómetro (Specord 2010 PLUS) siguiendo el método colorimétrico estándar (ANEXO F) el cual requiere de la utilización de un termoreactor (Hach DRB 200). En la medición de la DQO se encontró una dispersión alta dado que el método utilizado es demasiado sensible en muestras con alto contenido de sólidos⁴⁰, esto puede generar algunos errores en los resultados.

⁴⁰ RAPOSO, F., DE LA RUBIA, M. A., FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V. y BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, vol. 16, pp. 861–877

- **ST, SV, SST, SSV:** Estas variables se midieron por el método estándar utilizando un horno (Drying Cabinet Memmert TV 30u) y una mufla (Thermolyne 1500 FD1525M benchtop furnace) (ANEXO G).

Remoción de materia orgánica

Los SV y DQO son variables que expresan la cantidad de materia orgánica presente en un sustrato. Para calcular esta remoción se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$(\%) \text{ de Remoción de la DQO} = \frac{[DQO]_{inicial} - [DQO]_{final}}{[DQO]_{inicial}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

$[DQO]_{inicial}$ = Concentración de la DQO en el día 0.

$[DQO]_{final}$ = Concentración de la DQO en el día 40.

$$(\%) \text{ de Remoción de los SV} = \frac{[SV]_{inicial} - [SV]_{final}}{[SV]_{inicial}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

$[SV]_{inicial}$ = Concentración de SV en el día 0.

$[SV]_{final}$ = Concentración de SV en el día 40.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS ESTIÉRCOLES

Tabla 2. Caracterización física de los estiércoles sin diluir

Estiércol	Densidad [g/mL]	[gST/kg Muestra]	[gSV/kg Muestra]
EB	1,00	154,93	123,60
EP	0,93	230,39	183,28
EE	0,96	185,23	141,29

En la tabla 2 se presenta la caracterización física de los estiércoles. Se observa que el EB y el EE poseen una densidad similar a la del agua, lo cual favorece su homogeneidad en las diluciones. El estiércol porcino (EP) reportó la densidad más baja (0,93 g/m) generando suspensiones en la dilución⁴¹.

Entre los estiércoles caracterizados, el estiércol porcino reporta los valores más altos en concentración de ST=230,39 gST/kg de muestra y SV=183,28 gST/kg de muestra infiriendo en una buena cantidad de materia orgánica disponible para ser degradada como lo reportado por Víquez⁴².

⁴¹ ANDRÉ, L., PAUSS, A. y RIBEIRO, T. Solid anaerobic digestion: State-of-art, scientific and technological hurdles. *Bioresource Technology*. 2018, vol. 247, pp. 1027-1037

⁴² VIQUEZ, J. A. (2011). ¿Por qué la excreta porcina produce biogás con mayor concentración de metano, en comparación con la bovina?. En: *ECAG Informa*, 2011. Vol. 55, pp. 70–74

3.2 ACTIVIDADES HIDROLÍTICA ESPECÍFICA (AHE) Y ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECÍFICA (AME)

En la tabla 3. se reporta la AHE y la AME para las diferentes diluciones de los tres estiércoles.

Tabla 3. Caracterización química de los estiércoles diluidos

Muestra	AHE [gDQO/gSSV día]	AME [gDQO/gSSV día]
EB 1:3	0,0225	0,0229
EB 1:5	0,0113	0,0141
EB 1:7	0,0088	0,0068
EP 1:3	0,0139	0,0205
EP 1:5	0,0151	0,0287
EP 1:7	0,0141	0,0164
EE 1:3	0,0231	0,0234
EE 1:5	0,0195	0,0170
EE 1:7	0,0191	0,0120

3.2.1 Actividad hidrolítica específica (AHE) La dilución de EB 1:7 presenta la AHE más baja (0,0088 gDQO/gSSV*día), infiriendo que este inóculo tiene una baja capacidad de ruptura de las cadenas poliméricas de carbohidratos. Por lo tanto, esta alta dilución del estiércol frenaría las siguientes etapas de la digestión anaerobia. Por el contrario, se reporta el valor más alto de AHE para la dilución 1:3 de EB (0,0225 gDQO/gSSV*día) dando indicios del buen arranque en el proceso, este resultado concuerda con lo reportado por Quintero⁴³.

En el caso del EE, la dilución 1:3 reporta el valor más alto de AHE (0,0231 gDQO/gSSV*día), mientras que la dilución 1:7 presenta la AHE más baja (0,0191

⁴³ QUINTERO, M., CASTRO, L., ORTIZ, C., GUZMÁN, C. y ESCALANTE, H. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: Figue's bagasse as an example. *Bioresource Technology*. 2012, vol. 108, pp. 8–13

gDQO/gSSV*día). Así mismo, se observa una baja desviación estándar entre los diferentes datos experimentales, indicando que este inóculo presenta una buena reproducibilidad. Aun cuando la literatura no reporta información sobre AHE de EE, se puede inferir que su comportamiento en la primera etapa de la digestión anaeróbica puede tener la misma tendencia al desempeño del EB.

Por otra parte, el desempeño de las diluciones de EP muestra variación en la tendencia contraria a los otros estiércoles. La dilución 1:3 reportó el valor más bajo de AHE y el mejor desempeño lo presenta la dilución 1:5 (0,0151 gDQO/gSSV*día).

3.2.2 Actividad metanogénica específica (AME) La literatura reporta para el EB, valores de AME que oscilen en el rango de 0,017 a 0,146 gDQO/gSSV*día⁴⁴. Se observa en la tabla 3, que a excepción de la dilución 1:7 de estiércol bovino (AME = 0,0068 gDQO/gSSV*día), las demás diluciones de los tres estiércoles cumplen con esta condición. Dado que el AME representa la capacidad del inóculo, dentro de su ruta metabólica, para hacer la conversión del ion acetato a metano y dióxido de carbono, sobresale el desempeño del estiércol porcino, el cual reporta valores de AME entre 0,0164 y 0,0287 gDQO/gSSV*día indicando que sus consorcios microbianos en los primeros días de operación están en óptimas condiciones para generar metano. Por lo anterior, se puede inferir que estas diluciones son adecuadas para llevar a cabo la cuarta etapa del proceso de digestión anaerobia.

pH

En la tabla 4 se presentan los valores de pH antes y después de la determinación del PBM llevado a cabo por 40 días con EB, EP y EE a diferentes diluciones.

⁴⁴ QUINTERO, M., CASTRO, L., ORTIZ, C., GUZMÁN, C. y ESCALANTE, H. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: Figue's bagasse as an example. *Bioresource Technology*. 2012, vol. 108, pp. 8–13

Tabla 4. pH de los estiércoles a diferentes diluciones

Parámetro	EB	EB	EB	EP	EP	EP	EE	EE	EE
	1:3	1:5	1:7	1:3	1:5	1:7	1:3	1:5	1:7
pH Día 0	7,20	7,45	7,36	7,73	7,87	7,91	6,65	6,74	6,69
pH Día 40	6,56	5,48	4,80	5,86	5,97	5,86	6,86	7,01	6,82

Se observa que los valores reportados en el día cero se encuentran dentro del rango óptimo de operación (6,5-7,5) lo cual garantiza un buen arranque para las diluciones⁴⁵.

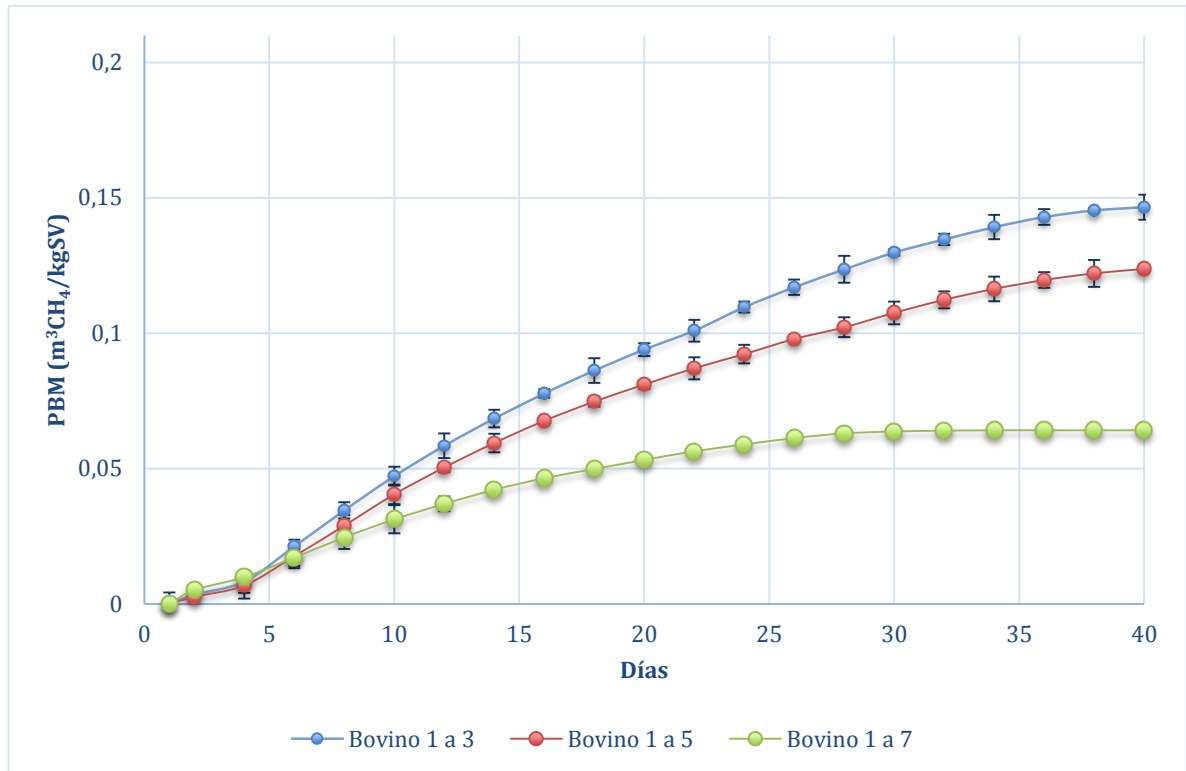
En el día cuarenta los resultados varían según el estiércol utilizado. En el EB la dilución 1:3 es la única que permanece en el rango óptimo de operación, mientras que las diluciones 1:5 y 1:7 reportan valores de inhibición. Para las tres diluciones del EP, los valores de pH disminuyeron a tal punto que causaron acidificación debido a una alta acumulación de AGV. En el EE, las diluciones presentan valores de pH entre 6,6 y 6,8, lo cual indica que mantuvieron su pH en los rangos óptimos durante todo el proceso de DA.

3.3 POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN (PBM) DE LOS ESTIÉRCOLES DILUIDOS

3.3.1 PBM de diluciones de estiércol Bovino (EB) En la figura 1 se presenta la producción de metano a partir de EB a tres diferentes diluciones.

⁴⁵ FERNÁNDEZ, L. A. Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz, Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente, 2008

Figura 1. Dinámica del PBM del estiércol bovino (EB) a diferentes diluciones.



En el arranque, el EB es un sustrato estable con pH superiores a 7,2 para las tres diluciones.

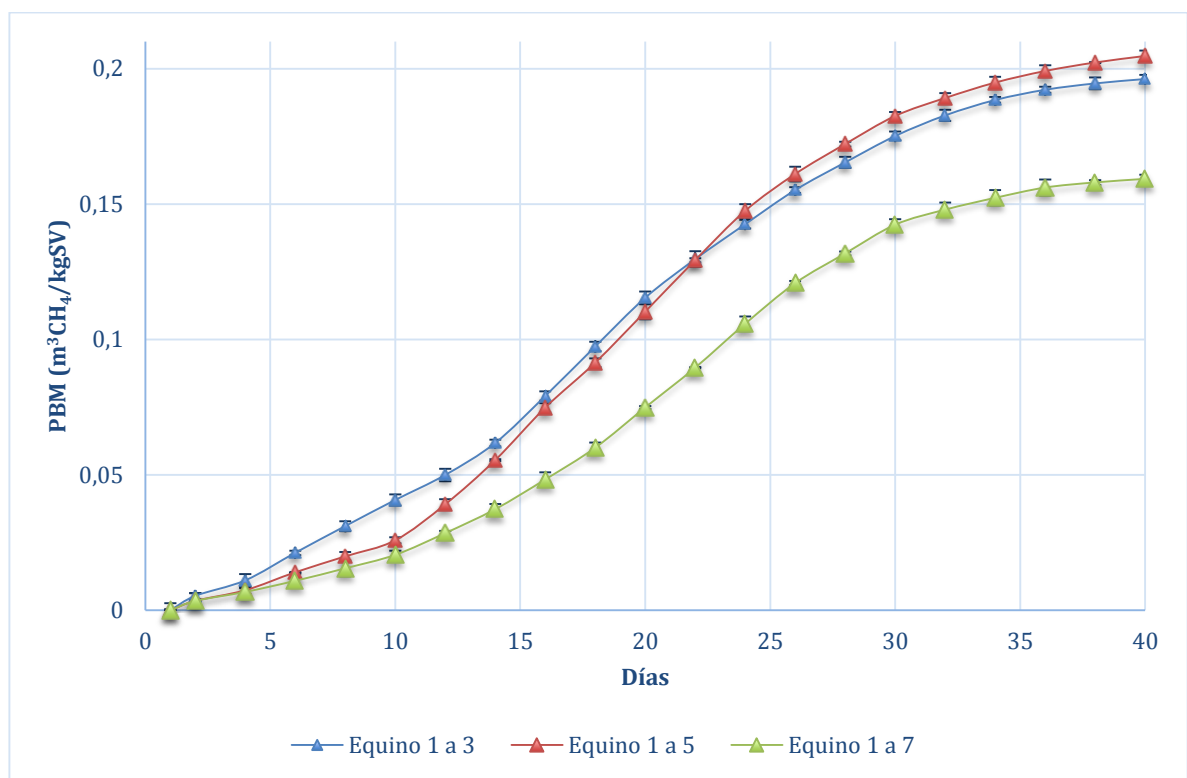
Durante los primeros cinco días no hay cambios considerables en la producción de metano en las tres diluciones; debido a que el inóculo está en etapa de adecuación. Después del quinto día se observa que los estiércoles diluidos empiezan a generar un patrón específico en la producción de metano. Sin embargo, el estiércol diluido a 1:7 presentó el PBM más bajo y en el día 26 se estabilizó debido a la acidificación que se corrobora con un pH final de 4,80⁴⁶. Por otra parte, los estiércoles bovinos diluidos a 1:3 y 1:5 muestran producciones de metano crecientes.

⁴⁶ TOMA, L., VOICU, G., FERDES, M. y DINCA, M. Animal Manure As Substrate for Biogas Production. Romania: University Politehnica of Bucharest. Engineering for Rural Development, 2012, pp. 629–634. Disponible en: <http://tf.llu.lv/conference/proceedings2016/Papers/N116.pdf#page=1&zoom=auto,-158,848>

El estiércol diluido a 1:3 reporta el máximo PBM (0,1471 m³CH₄/kgSV) manteniendo su estabilidad con un pH de 6,56 al día 40. Este resultado es coherente con las actividades hidrolítica y metanogénica reportadas en la tabla 3.

3.3.2 PBM de diluciones de estiércol Equino (EE) En la figura 2, se reflejan los resultados obtenidos de PBM con EE a tres diluciones distintas.

Figura 2. Dinámica de PBM del estiércol equino (EE) a diferentes diluciones



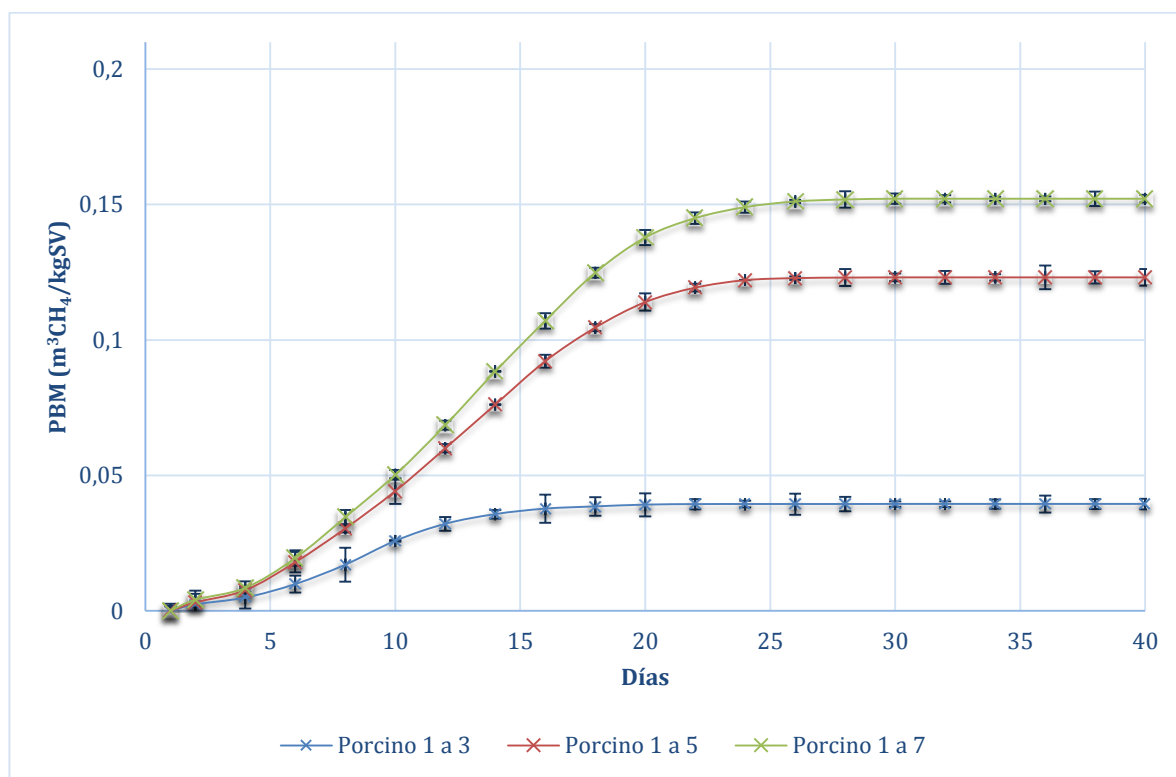
De forma global se observa que el EE es un sustrato estable, dado que no presenta inhibición, logrando producción de metano con tendencia creciente hasta el día 40. Este estiércol alcanza los valores de PBM más altos en comparación con los estiércoles bovino y porcino. Estos resultados son coherentes con los valores de pH reportados para el EE durante el proceso de DA, lo cuales se mantienen en los rangos óptimos de operación para las tres diluciones.

El estiércol equino a pesar de poseer un alto contenido lignocelulósico se infiere que tiene excelentes características como inóculo para el proceso de digestión anaeróbica, manteniendo estable las condiciones del sustrato, y promoviendo las altas producciones de metano.

De hecho, las diluciones de estiércol equino 1:5 y 1:3 mantienen similares sus producciones de metano, tanto así que en el día 20 las curvas de PBM se interceptan. Al día 40, la dilución 1:5 sólo supera la producción de la dilución 1:3 en 3,9% con un valor de 0,205 m³CH₄/kgSV.

3.3.3 PBM de diluciones de estiércol Porcino (EP) En la figura 3 se reporta la dinámica de evolución del comportamiento de PBM para las diluciones de estiércol porcino en un periodo de operación de 40 días.

Figura 3. Dinámica de PBM del estiércol porcino (EP) a diferentes diluciones



Las tres diluciones de EP tienden a estabilizar su producción de metano más rápidamente en comparación con el EB y el EE. Debido a las condiciones óptimas de alcalinidad y amonio iniciales del sustrato que se reflejan en pH iniciales superiores a 7,7 para las tres diluciones (tabla 4), se garantiza inicialmente la degradación de AGV que contribuye con la alta producción de metano en el arranque del proceso⁴⁷. En el día 13 ocurre la inhibición de la dilución 1:3, reportando un PBM de (0,039 m³CH₄/kgSV) al día 40, debido a una gran acumulación reflejada en los niveles de AGV y de amonio.

A medida que aumenta el grado de dilución, se presentan las mayores pendientes en la producción de metano; esta tendencia continúa hasta el día 20 para las diluciones 1:5 y 1:7 de EP, punto en el cual se detiene la producción en ambas diluciones reportando el máximo PBM para la dilución 1:7 (0,152 m³CH₄/kgSV) al día 40.

En la tabla 5 se presenta un resumen consolidado de los PBM para cada una de las diluciones de estiércoles a los 40 días de operación.

Tabla 5. PBM a los 40 días para los tres estiércoles a diferentes diluciones

Muestra	PBM (m³CH₄/kgSV adicionado)
EB 1:3	0,147
EB 1:5	0,124
EB 1:7	0,064
EP 1:3	0,039
EP 1:5	0,123
EP 1:7	0,152
EE 1:3	0,196
EE 1:5	0,205
EE 1:7	0,159

⁴⁷ DAI, X., HU, C., ZHANG, D., DAI, L. y DUAN, N. Impact of a high ammonia-ammonium-pH system on methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in mesophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 2017, vol. 245, pp. 598–605

Se observa que a bajas diluciones del EB se obtienen altos valores de PBM y a medida que se aumenta el grado de dilución la producción de metano disminuye hasta valores que no hacen factible la reproducibilidad del proceso en campo.

Por el contrario, el EP a altas diluciones presenta los mejores valores de PBM, en el caso de la dilución 1:7 se obtiene un valor de $0,0152 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgSV}$.

En el EE, los resultados reportan que en las tres diluciones se obtienen los valores más altos de PBM y que difieren poco entre ellos, obteniendo el mayor valor para la dilución 1:5 siendo de $0,205 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kgSV}$.

3.3.2 Variables de estabilidad de la Digestión Anaeróbica. En la tabla 6 se reporta un consolidado del cambio en la concentración de las variables SV, DQO, AGV, AT y amonio; al inicio y al final del proceso (40 días). Las mediciones de sólidos totales (ST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) están reportadas en los ANEXOS H y I.

Tabla 6. Variables de estabilidad de la Digestión Anaeróbica

Tipo De Estiércol		SV [g/L]			DQO [g/L]			Amonio [g/L]		AGV [mgAc.Ac./L]		AT [mgCaCO ₃ /L]	
		Día 0	Día 40	% remoción	Día 0	Día 40	% remoción	Día 0	Día 40	Día 0	Día 40	Día 0	Día 40
EB	1:3	30,98	22,74	41,39	343,93	246,85	28,23	0,17	0,02	510	600	850	900
	1:5	20,66	16,20	31,73	237,11	183,78	22,49	0,13	0,11	540	1050	475	1200
	1:7	15,49	17,65	16,49	207,05	173,71	16,10	0,11	0,17	480	2178	450	900
EP	1:3	51,20	41,30	23,31	433,92	367,32	20,26	1,53	3,63	732	4440	1250	4300
	1:5	33,96	23,97	33,24	418,60	310,80	25,75	0,91	3,28	480	3102	1150	2900
	1:7	25,39	17,52	34,94	289,16	220,29	23,82	0,72	2,73	300	2160	510	2100
EE	1:3	32,91	23,14	34,17	360,35	269,58	25,19	0,31	0,44	1860	600	1950	1600
	1:5	21,86	10,83	49,13	328,37	215,10	34,50	0,10	0,94	1680	360	1650	1400
	1:7	16,37	9,31	45,90	299,64	207,37	30,79	0,08	0,39	1140	264	950	1100

Se observa que los estiércoles bovino y equino poseen cargas orgánicas muy similares; expresadas como concentración de SV. Sin embargo, el EP posee una mayor concentración de SV, algo esperado debido a la gran cantidad de macronutrientes presentes en este estiércol, en especial lípidos y proteínas⁴⁸.

En el caso de la DQO, variable importante para evaluar el rendimiento e impacto de la digestión anaerobia en pro del medio ambiente, se presenta una tendencia similar a la concentración de SV, sobresaliendo el EP por su alta concentración.

Respecto a las concentraciones de amonio, en el EP las concentraciones de 3,63 g/L, 3,28 g/L son notablemente altas, dado que las proteínas presentes en el EP tienden a fermentarse fácilmente⁴⁹, siendo el amonio uno de los principales productos de la degradación de las mismas; incluso para una dilución alta como la 1:7, una concentración de 2,73 g/L puede afectar notablemente al sistema puesto que se generan condiciones de estrés para los microorganismos⁵⁰.

Con relación a los AGV se observa una baja carga inicial especialmente en el EB y EP. No obstante a día 40 se presenta una acumulación de AGV en las diluciones del estiércol porcino y dilución 1:7 de EB, a diferencia de las concentraciones finales en las diluciones de EE que fueron bajas, lo que significa que hubo un buen consumo de los mismos durante el proceso. Por otra parte, la AT para el EP fue alta en relación con los AGV, otorgándole entre los estiércoles inicialmente la mejor capacidad buffer.

⁴⁸ VIQUEZ, J. A. ¿Por qué la excreta porcina produce biogás con mayor concentración de metano, en comparación con la bovina?. En: *ECAG Informa*, 2011. Vol. 55, pp. 70–74

⁴⁹ MORENO, C. F. Digestión anaerobia de lodos residuales secundarios en reactores en lote y continuo. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, División de ciencias biológicas y de la salud. Departamento de Biotecnología, 2010

⁵⁰ AMHA, Y. M., ANWAR, M. Z., BROWER, A., JACOBSEN, C. S., STADLER, L. B., WEBSTER, T. M., & SMITH, A. L. Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. *Bioresource Technology*. 2017, vol. 247, pp. 999–1014

Ahora bien, una inhibición temprana del proceso como se observó en algunos casos durante el PBM se puede deber posiblemente a la acumulación de AGV que junto a altas concentraciones de amonio son síntomas de una inactivación de las bacterias metanogénicas, lo cual se ve reflejado en la producción de metano⁵¹.

Remoción de la materia orgánica

La remoción de la DQO de un sustrato puede variar considerablemente dependiendo las condiciones de operación del proceso y del reactor utilizado^{52 53 54}, obteniéndose remociones desde valores cercanos al 95%⁵⁵ como valores inferiores al 50%^{56 57}.

En este caso de estudio se obtuvieron valores considerablemente bajos (tabla 6), similares a los obtenidos por Muhammad para el EB⁵⁸. Se mantuvo una proporcionalidad inversa a la dilución en el estiércol bovino, en el cual 1:3 presentó una remoción del 28,23% mientras que 1:7 solo un 16,10%. Por otro lado, para el

⁵¹ CHEN, Y., CHENG, J. J., & CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, pp. 4044–4064

⁵² MORGAN-SAGASTUME, F., MORGAN-SAGASTUME, J. M. y NOYOLA-ROBLES, A. Aplicabilidad de la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales municipales. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, 1994

⁵³ CARRÈRE, H., DUMAS, C., BATTIMELLI, A., BATSTONE, D. J., DELGENÈS, J. P., STEYER, J. P. y FERRER, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 183, pp. 1–15

⁵⁴ ASTALS, S., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, T., AYMERICH, E., GARCÍA-HERAS, J. L. y MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A biodegradability and modelling study. *Water Research*. 2013, vol. 47, pp. 6033–6043

⁵⁵ YETILMEZSOY, K. Y SAKAR, S. Improvement of COD and color removal from UASB treated poultry manure wastewater using Fenton's oxidation. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, vol. 151, pp. 547–558

⁵⁶ WINTER J., HILPER, R. y SCHMITZ, H. Treatment of Animal Manure and Wastes for Ultimate Disposal. *Ajas*. 1992, vol. 5, pp. 199-215

⁵⁷ GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C., RIAÑO, B., TERESA, M., HERRERO, E., WARD, A. J., PROVOLO, G., MOSCATELLI, G., PICCININI, S., BONMATI, A., BERNAL, M. P., WISNIEWSKA, H. y PRONIEWICZ, M. Treatment of swine manure: case studies in European's N-surplus areas. *Scientia Agricola*. 2016, vol. 73, pp. 444–454

⁵⁸ NASIR, I. M., OMAR, R. e IDRIS, A. Anaerobic Digestion of Cattle Manure: Influence of Inoculum Concentration. *International Journal of Engineering and Technology*. 2013, vol. 10, pp. 22–26

estiércol equino la mayor remoción de la DQO se obtuvo en 1:5 con el 34,5%. Por último, en el estiércol porcino se removió el 25,75% en 1:5 y en menor medida un 20,26% en 1:3.

Cabe aclarar que al igual que en la DQO, la remoción de SV de un sustrato está condicionada por las variables de operación cambiando considerablemente.

Respecto a esta remoción (tabla 6), los valores obtenidos se encuentran en un rango normal y esperado en procesos de digestión anaerobia⁵⁹ ⁶⁰. Para el estiércol bovino se obtuvo la mayor remoción en la dilución 1:3 con un 41,39%, mientras que en 1:7 fue bastante baja, con solo un 16,49%. En el caso del estiércol equino se obtuvieron los valores más altos de los tres estiércoles, siendo 1:5 con un 49,13% la dilución con mayor remoción de SV mientras que 1:3 fue la menor. Por último, en el estiércol porcino la dilución 1:7 presentó la mayor remoción de SV con un 34,94% cercana también a la 1:5 (33,24%), en cambio en 1:3 solo se removió un 23,31%.

De forma general se puede observar una relación entre la remoción de la DQO y los SV, con una proporcionalidad directa entre la dilución y la remoción en el EP e inversa en el EB, sin embargo, en el EE a pesar de que no hubo una relación proporcional entre diluciones se puede contemplar como la dilución favorece la remoción de la materia orgánica presente en 1:5 y 1:7.

A su vez existe una relación entre la mayoría de los resultados obtenidos en el montaje del PBM y los porcentajes de remoción, así también con respecto a las variables caracterizadas como por ejemplo caídas o bajos pH se pueden relacionar

⁵⁹ CARRÈRE, H., DUMAS, C., BATTIMELLI, A., BATSTONE, D. J., DELGENÈS, J. P., STEYER, J. P. Y FERRER, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 183, pp. 1–15

⁶⁰ ASTALS, S., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, T., AYMERICH, E., GARCÍA-HERAS, J. L. Y MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A biodegradability and modelling study. *Water Research*. 2013, vol. 47, pp. 6033–6043

con una menor remoción de materia orgánica⁶¹. Entre tanto, para cada estiércol la dilución con mayor PBM tuvo en promedio la mayor disminución en la materia orgánica: EB 1:3, EE 1:5, EP 1:7, algo esperado considerando que la producción de metano va ligada a la degradación del sustrato⁶².

⁶¹ ZHAI, N., ZHANG, T., YIN, D., YANG, G., WANG, X., REN, G. Y FENG, Y. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. *Waste Management*. 2015, vol. 38, pp. 126–131

⁶² KHANAL, S. K. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008

4. CONCLUSIONES

Se realizó la caracterización de tres estiércoles a diferentes diluciones, en función de las variables que determinan su viabilidad para ser digeridos, encontrándose que:

El estiércol bovino a dilución 1:3 presentó buena remoción de materia orgánica (41,39% de SV y 28,23% para DQO), alcanzó un PBM de 0,147 m³CH₄/kgSV, una AHE de 0,0225 gDQO/gSSV*día y una AME de 0,0229 gDQO/gSSV*día indicando que en un proceso de digestión anaeróbica esta dilución tendrá un excelente desempeño como sustrato productor de biogás.

El estiércol porcino en las tres diluciones, presenta inhibición por los altos niveles de amonio (2,73 a 3,63 g/L) y acidificación debido a los elevados contenidos de AGV acumulados (2160 a 4440 mg/L). Sin embargo, a la mayor dilución de 1:7 este estiércol presenta la mejor producción de metano (PBM de 0,159 m³CH₄/kgSV), lo cual se relaciona con los porcentajes de remoción de SV (34,94%) y DQO (23,82%). Por consiguiente, el estiércol porcino es recomendable utilizarlo como sustrato en un proceso de digestión anaeróbica a dilución de 1:7.

El estiércol equino a dilución 1:5 presenta las remociones más altas de SV (49,13%) y DQO (34,50%). Por lo tanto, este estiércol a dilución de 1:5 reporta los mejores valores de PBM (0,205 m³CH₄/kgSV), remoción de SV (49,13%) y de DQO (34,50%). Así pues, esta sería la mejor dilución a utilizar durante un proceso de digestión anaeróbica del estiércol equino.

5. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados de este estudio, la siguiente etapa de investigación sería realizar un estudio (con un diseño factorial) de codigestiones entre las diluciones de los tres estiércoles. Esto con el fin de identificar la mejor relación de mezcla. Lo anterior soportado en el caso real de las pequeñas granjas colombianas (en zonas rurales no interconectadas) que poseen los tres tipos de estiércoles y buscan un buen aprovechamiento para la producción de biogás.

A su vez, se recomienda ampliar la investigación con estiércoles de otras especies de animales que se encuentren a menudo en las granjas rurales o que tengan proyección de aumentar su población en la región como las especies bufalina y caprina.

Por último, este estudio de diluciones tuvo un enfoque en torno al potencial de biometanización y actividad microbiana, se recomienda realizar un análisis reométrico de las cargas que ingresan al biodigestor haciendo un seguimiento de su fluencia a medida que ocurre el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, R. y LIDÉN, G. The effect of temperature variation on biomethanation at high altitude. *Bioresource Technology*. 2008, vol 99, pp. 7278–7284.

ALZATE, M. S. y QUINTERO, M. J. Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. *Revista Investigación, Optimización Y Nuevos Procesos En Ingeniería*. 2016, vol. 29, pp. 117–123.

AMANI, T., NOSRATI, M. y SREEKRISHNAN, T. R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environmental Reviews*. 2010, vol. 18, pp. 255–278.

AMHA, Y. M., ANWAR, M. Z., BROWER, A., JACOBSEN, C. S., STADLER, L. B., WEBSTER, T. M., & SMITH, A. L. Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. *Bioresource Technology*. 2017, vol. 247, pp. 999–1014.

ANDRÉ, L., PAUSS, A. y RIBEIRO, T. Solid anaerobic digestion: State-of-art, scientific and technological hurdles. *Bioresource Technology*. 2018, vol. 247, pp. 1027-1037.

ANGELIDAKI I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., CAMPOS, J. L., GUWY, A. J., KALYUZHNYI, S., JENICEK, P. y VAN LIER, J. B. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. 2009, vol. 59, pp. 927–934.

ANGELIDAKI, I., KARAKASHEV, D., BATSTONE, D. J., PLUGGE, C. M. y STAMS, A. J. M. Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology*. 2011, vol. 494, pp. 327-351. Disponible en: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>

APPELS, L., BAEYENS, J., DEGRÈVE, J. y DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, vol. 34, pp. 755–781.

ASTALS, S., BATSTONE, D. J., TAIT, S. y JENSEN, P. D. Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Research*. 2015, vol. 81, pp. 208-215.

ASTALS, S., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, T., AYMERICH, E., GARCÍA-HERAS, J. L. y MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A biodegradability and modelling study. *Water Research*. 2013, vol. 47, pp. 6033–6043.

ASTALS, S., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, T., AYMERICH, E., GARCÍA-HERAS, J. L. Y MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A biodegradability and modelling study. *Water Research*. 2013, vol. 47, pp. 6033–6043.

AYMERICH, E., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M. y SANCHO, L. Analysis of the stability of high-solids anaerobic digestion of agro-industrial waste and sewage sludge. *Bioresource Technology*. 2013, vol. 144, pp. 107–114.

BOTERO BOTERO, R. y PRESTON, T. R. Biodigestor de bajo costo para la producción de combustible y fertilizante a partir de excretas. *Bbc*. 1987, pp. 1-20.

Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/Biodigestores/04-biodigestores.pdf>

BURKE, D. A. 2001. Dairy Waste Anaerobic Digestion Handbook: Options for Recovering Beneficial Products From Dairy Manure. Olympia: Environmental Energy Company, 2001. pp. 1-54. Disponible en: <http://www.makingenergy.com/Dairy%20Waste%20Handbook.pdf>

CARRÈRE, H., DUMAS, C., BATTIMELLI, A., BATSTONE, D. J., DELGENÈS, J. P., STEYER, J. P. y FERRER, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 183, pp. 1–15.

CARRÈRE, H., DUMAS, C., BATTIMELLI, A., BATSTONE, D. J., DELGENÈS, J. P., STEYER, J. P. Y FERRER, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 183, pp. 1–15.

CHEN, Y., CHENG, J. J., & CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, pp. 4044–4064.

CHEROSKY, P. B. Anaerobic Digestion of Yard Waste and Biogas Purification by Removal of Hydrogen Sulfide. Tesis de Maestría. The Ohio State University, 2012.

DAI, X., HU, C., ZHANG, D., DAI, L. y DUAN, N. Impact of a high ammonia-ammonium-pH system on methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in mesophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 2017, vol. 245, pp. 598–605.

DENNEHY, C., LAWLOR, P. G., CROIZE, T., JIANG, Y., MORRISON, L., GARDINER, G. E. y ZHAN, X. Synergism and effect of high initial volatile fatty acid

concentrations during food waste and pig manure anaerobic co-digestion. *Waste Management*. 2016, vol. 56, pp. 173–180.

ESPOSITO, G. Bio-Methane Potential Tests To Measure The Biogas Production From The Digestion and Co-Digestion of Complex Organic Substrates. *The Open Environmental Engineering Journal*. 2012, vol. 5, pp. 1–8.

FERNÁNDEZ, L. A. Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz, Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente, 2008.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C., RIAÑO, B., TERESA, M., HERRERO, E., WARD, A. J., PROVOLO, G., MOSCATELLI, G., PICCININI, S., BONMATI, A., BERNAL, M. P., WISNIEWSKA, H. y PRONIEWICZ, M. Treatment of swine manure: case studies in European's N-surplus areas. *Scientia Agricola*. 2016, vol. 73, pp. 444–454.

GARFÍ, M., MARTÍ-HERRERO, J., GARWOOD, A. y FERRER, I. Household anaerobic digesters for biogas production in Latin America: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, vol. 60, pp. 599-614.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Censo Bovino en Colombia. Censo Pecuario Nacional - 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 10 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Censo Equino en Colombia. Censo Pecuario Nacional - 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 10 de enero de 2018].

Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Censo Porcino en Colombia. Censo Pecuario Nacional - 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 10 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>

KAFLE, G. K. y CHEN, L. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. *Waste Management*. 2016, vol. 48, pp. 492–502.

KAWAI, M., NAGAO, N., KAWASAKI, N., IMAI, A. y TODA, T. Improvement of COD removal by controlling the substrate degradability during the anaerobic digestion of recalcitrant wastewater. *Journal of Environmental Management*. 2016, vol. 181, pp. 838–846.

KHANAL, S. K. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.

KURUTI, K., NAKKASUNCHI, S., BEGUM, S., JUNTUPALLY, S., ARELLI, V. y ANUPOJU, G. R. Rapid generation of volatile fatty acids (VFA) through anaerobic acidification of livestock organic waste at low hydraulic residence time (HRT). *Bioresource Technology*. 2017, vol. 238, pp. 188–193.

LE HYARIC, R., CHARDIN, C., BENBELKACEM, H., BOLLON, J., BAYARD, R., ESCUDIÉ, R. y 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 Technology*. 2005, vol. 102, pp. 822–827.

MANTILLA-AVILA, L. Implementación de un reactor rural para la digestión anaerobia de estiércol bovino en la finca la Marcella. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, 2016.

MARTÍ-HERRERO, J. Biodigestores familiares: Guía de diseño y manual de instalación. Proyecto EnDev Bolivia – Acceso a Energía GTZ. 2008. [En Línea]. [Consultado: 2 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.bivica.org/upload/biodigestores-familiares.pdf>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959, vol. 31, pp. 426–428.

MÖNCH-TEGEDER, M., LEMMER, A. y OECHSNER, H. Enhancement of methane production with horse manure supplement and pretreatment in a full-scale biogas process. *Energy.* 2014, vol. 73, pp. 523–530.

MORENO, C. F. Digestión anaerobia de lodos residuales secundarios en reactores en lote y continuo. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, División de ciencias biológicas y de la salud. Departamento de Biotecnología, 2010.

MORGAN-SAGASTUME, F., MORGAN-SAGASTUME, J. M. y NOYOLA-ROBLES, A. Aplicabilidad de la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales municipales. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, 1994.

MSHANDETE, A., BJÖRNSSON, L., KIVAISIA, A., RUBINDAMAYUGIA, M. y MATTIASSON, B. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. *Water Research.* 2005, vol. 39, pp. 1569–1575.

NASIR, I. M., OMAR, R. e IDRIS, A. Anaerobic Digestion of Cattle Manure: Influence of Inoculum Concentration. *International Journal of Engineering and Technology*. 2013, vol. 10, pp. 22–26.

OLAYA, Y. y GONZALEZ, L. Fundamentos para el diseño de biodigestores: Modulo Para La Asignatura de Construcciones Agrícolas. Palmira, Universidad Nacional de Colombia. 2009. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7967/4/luisoctaviogonzalezsalcedo.20121.pdf>

PERFETTI, M., CORRAL, D., CARLOS, S., PRADA, F. Cuentas Trimestrales - Colombia Producto Interno Bruto (PIB) Segundo Trimestre de 2017. 2017. [En Línea]. [Consultado: 2 de enero de 2018]. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/pib/bol_PIB_IVtrim16_oferta_demanda.pdf%0A

QUINTERO, M. J. Estudio de consorcios microbianos para la producción de biogás a partir de residuos del fique. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, Facultad de salud. Departamento de Ciencias Básicas, 2012.

QUINTERO, M., CASTRO, L., ORTIZ, C., GUZMÁN, C. y ESCALANTE, H. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: Fique's bagasse as an example. *Bioresource Technology*. 2012, vol. 108, pp. 8–13.

RAPOSO, F., DE LA RUBIA, M. A., FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V. y BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, vol. 16, pp. 861–877.

RODRÍGUEZ, L. La fundación UTA y la promoción de los sistemas integrados sostenibles. En: RedBioCol. Abril, 2016. Vol 1, pp. 35–38.

SAGARPA. Utilización de estiércoles. 2000. [En Línea]. [Consultado: 2 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Utilizaci%F3n%20de%20esti%20E9rcoles.pdf>

SOTO, M., MENDEZ, R. y LEMA, J. M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests-theoretical basis and experimental set-up. *Water Research*. 1993, vol. 27, pp. 1361-1376.

STRÖMBERG, S., NISTOR, M. y LIU, J. Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*. 2014, vol. 34, pp. 1939–1948.

SURENDRA, K. C., TAKARA, D., HASHIMOTO, A. G. y KHANAL, S. K. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014, vol. 31, pp. 846–859.

TOMA, L., VOICU, G., FERDES, M. y DINCA, M. Animal Manure As Substrate for Biogas Production. Romania: University Politehnica of Bucharest. Engineering for Rural Development, 2012, pp. 629–634. Disponible en: <http://tf.llu.lv/conference/proceedings2016/Papers/N116.pdf#page=1&zoom=auto,-158,848>

VASCO-CORREA, J., KHANAL, S., MANANDHAR, A. y SHAH, A. Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. *Bioresource Technology*. 2017, vol. 247, pp. 1015–1026.

VILLAR, I., ALVES, D. y MATO, S. Product quality and microbial dynamics during vermicomposting and maturation of compost from pig manure. *Waste Management*. 2017, vol. 69, pp. 498–507.

VIQUEZ, J. A. ¿Por qué la excreta porcina produce biogás con mayor concentración de metano, en comparación con la bovina?. En: *ECAG Informa*, 2011. Vol. 55, pp. 70–74.

WINTER J., HILPER, R. y SCHMITZ, H. Treatment of Animal Manure and Wastes for Ultimate Disposal. *Ajas*. 1992, vol. 5, pp. 199-215.

YETILMEZSOY, K. Y SAKAR, S. Improvement of COD and color removal from UASB treated poultry manure wastewater using Fenton's oxidation. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, vol. 151, pp. 547–558.

ZHAI, N., ZHANG, T., YIN, D., YANG, G., WANG, X., REN, G. y FENG, Y. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. *Waste Management*. 2015, vol. 38, pp. 126–131.

ANEXOS

Anexo A. Actividad hidrolítica específica (AHE)

1. Preparar el medio básico anaerobio (MBA) de la siguiente manera (los cálculos están hechos para 1000 mL de MBA y son proporcionales al volumen total que se desee preparar):

Reactivo/Solución	Cantidad
Solución mineral de Balch sin sulfatos	50 mL
Solución de oligoelementos sin sulfatos	10 mL
Solución de resarzurina al 0,1%	1 mL
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Extracto de levadura	0,1 g
Peptona tripticasa	0,1 g

2. Completar el volumen total con agua destilada y ajustar el pH a 7.0.

3. Agregar un 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por 2 minutos.

4. Enfriar bajo atmósfera de N₂.

5. A temperatura ambiente agregar:

Reactivo/Solución	Cantidad
Bicarbonato de sodio NaHCO ₃	2 g
Cisteína	0,5 g

6. Agregar 300 mL a cada botella de 500 mL.

7. Gasear con N₂, cerrar con tapón de butilo y poner sello de aluminio.
8. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Enfriar y refrigerar hasta su uso.
9. Antes de utilizarlos, agregar con jeringa a cada botella:

Reactivo/Solución	Cantidad
Solución de Na ₂ S al 2%	4,6 mL
Solución diluida de vitaminas de Balch	4,6 mL

10. A las botellas que no sean blancos, agregar:

Reactivo/Solución	Cantidad
Sustrato (almidón o celulosa)	0,3 g

La concentración del sustrato en la botella debe ser de 1 g/L.

11. A cada botella agregar entre 1,0-1,5 gSSV/L sin agitación. Con agitación agregar 2,0-2,5 gSSV/L. Posteriormente incubar a 37-39 °C.

Anexo B. Azúcares reductores totales (ART)

1. Centrifugar en tubos Falcon de 15 mL entre 2-10 mL de muestra a 10000 rpm durante 15 minutos.
2. Agregar 200 μ L del sobrenadante en cada tubo de ensayo de vidrio con tapa de rosca y agregar posteriormente 200 μ L de reactivo DNS.
3. Preparar un blanco utilizando en lugar de muestra, agua destilada.
4. Tapar los tubos, mezclar e introducirlos en baño María hasta ebullición durante 5 minutos.
5. Inmediatamente enfriar con agua y hielo durante 2-3 minutos.
6. Agregar a cada tubo de ensayo 2 mL de agua destilada.
7. Esperar 15 minutos y medir en un espectrofotómetro a 540 nm la absorbancia de cada muestra contra el blanco.
8. Si la medición se sale del rango, repetir los pasos y en lugar de agregar 200 μ L de sobrenadante, solo agregar 100 μ L y 100 μ L de agua destilada.

Anexo C. Desplazamiento alcalino

1. Preparar una solución de NaOH 2N en una botella de 500 mL.
2. Sujetar boca abajo la botella a un soporte.
3. Introducir 1 aguja hipodérmica con una manguera corta por el tapón de butilo de la botella y colocar debajo de la misma una probeta.
4. Utilizar una manguera larga a la cual se le colocan 2 agujas hipodérmicas a cada extremo.
5. Verificar que el regulador de flujo de la manguera larga este cerrado. Posteriormente conectar un extremo al tapón de butilo de la botella de NaOH y el otro al de la botella del biorreactor que contiene la muestra.
6. Deslizar el regulador de flujo permitiendo el flujo de biogás a través de la manguera larga llegando hasta la botella de 500 mL con la solución de NaOH.
7. El CO₂ reaccionará con la solución quedando atrapado en ella y dejando pasar la cantidad de CH₄ presente. Este volumen extra ocupado por el CH₄ en la parte superior de la botella de 500 mL será equivalente al que se desplazará a través de la manguera corta hasta la probeta.
8. Medir el volumen desplazado.

Anexo D. pH

1. Calibrar el pH-metro con las soluciones tampón.
2. Una vez calibrado el pH-metro, introducir el electrodo a la muestra a analizar.
3. Esperar que se estabilice el valor mostrado en el pH-metro.
4. Registrar el dato.
5. Lavar correctamente el electrodo con agua destilada y guardarlo en la solución correspondiente para evitar un daño en el mismo.

Anexo E. Ácidos grasos volátiles (AGV) y Alcalinidad total (AT)

1. Centrifugar en tubos Falcon de 50 mL entre 7-20 mL de muestra a 5000 rpm durante 30 minutos.
2. Trasegar el sobrenadante a un vaso precipitado.
3. Medir el pH inicial.
4. A 5 mL de muestra adicionar 25 mL de agua destilada.
5. Llevar el vaso precipitado a la plancha de agitación junto a un agitador magnético.
6. Medir nuevamente el pH. Si este es mayor a 6,5 agregar HCl 0,1N hasta 6,5.
7. Iniciar titulación con HCl 0,1N hasta un pH de 3,0. Anotar el volumen utilizado.
8. Pasar la muestra a un balón de destilación.
9. Ajustar el balón a un equipo de destilación y calentar con mechero o estufa hasta ebullición por 2 minutos.
10. Desmontar el balón de destilación y ponerlo sobre hielo para generar un choque térmico.
11. Trasegar la muestra del balón a un vaso precipitado y llevar nuevamente a la plancha de agitación con el agitador magnético.

12. Medir el pH y llevarlo hasta 6,5 con NaOH 0,1N. Anotar el volumen utilizado.

Anexo F. Demanda química de oxígeno (DQO)

1. Utilizar tubos de ensayo con tapa rosca de 16 x 100 mm.
2. Purgar los tubos de ensayo con ácido sulfúrico al 20% para eliminar contaminantes.
3. Agregar a cada tubo de ensayo 2,5 mL de muestra. Utilizar un blanco con 2,5 mL de agua destilada en lugar de la muestra.
4. Luego agregar a cada tubo de ensayo 1,5 mL de solución digestora. Posteriormente agregar a cada tubo 3,5 mL de solución catalítica evitando que roce con las paredes del mismo.
5. Cerrar los tubos y agitar con cuidado (reacción exotérmica) cada uno.
6. Llevar los tubos de ensayo al termorreactor durante 2 horas a 150 °C.
7. Sacar los tubos de ensayo, agitar y dejar enfriar.
8. Medir la absorbancia de las muestras contra el blanco en el espectrofotómetro a 600 nm para DQO altas y 420 nm para DQO bajas.

Se sugiere para mejores resultados esperar 24 horas entre la salida de las muestras del termorreactor y la medición en el espectrofotómetro. Durante este tiempo almacenar los tubos de ensayo en un sitio lejos de la luz y con poca humedad.

Anexo G. Sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV)

1. Pesar los crisoles a utilizar en una balanza. **A**
2. Agregar a cada crisol una alícuota homogenizada de la muestra a analizar. Pesar nuevamente los crisoles. **B**
3. Llevar los crisoles al horno a 103-105°C durante 24-48 horas hasta que la muestra esté seca y su peso en la balanza no varíe más del 4% con el tiempo. **C**
4. Llevar ahora los crisoles a una mufla a 550°C durante 1 hora. Apagar la mufla.
5. Dejar enfriar durante 12-24 horas la mufla hasta que la temperatura baje lo suficiente para sacar los crisoles de la misma.
6. Pesar los crisoles. **D**

Para sólidos totales (ST):

$$ST \left[\frac{g^{ST}}{Kg \text{ de muestra}} \right] = \frac{(C - A) * 1000}{(B - A)}$$

Para sólidos volátiles (SV):

$$SV \left[\frac{g^{SV}}{Kg \text{ de muestra}} \right] = \frac{(C - D) * 1000}{(B - A)}$$

**Anexo H. Sólidos totales (ST) para los tres estiércoles a diferentes diluciones
antes y después de la determinación del PBM**

Tipo de estiércol	ST g/L	
	Día 0	Día 40
EB 1:3	38,85	22,74
EB 1:5	25,90	16,20
EB 1:7	19,42	17,65
EP 1:3	51,20	41,30
EP 1:5	33,96	23,97
EP 1:7	25,39	17,52
EE 1:3	43,14	29,28
EE 1:5	28,67	15,08
EE 1:7	21,46	12,03

Anexo I. Sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST) para los tres estiércoles a diferentes diluciones

Tipo de estiércol	SST g/L	SSV g/L
EB 1:3	18,23	14,17
EB 1:5	11,98	9,66
EB 1:7	9,37	7,52
EP 1:3	57,91	50,91
EP 1:5	26,35	23,18
EP 1:7	12,17	9,87
EE 1:3	26,12	19,41
EE 1:5	11,25	9,05
EE 1:7	9,26	7,44