

**INFLUENCIA DE LA CARGA DE SUSTRATO Y LA TEMPERATURA SOBRE
LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ETAPA HIDROLÍTICA DEL PROCESO
DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE**

**SERGIO LUIS GÓMEZ PEÑALOZA
EDISON ROLANDO PARRA GÓMEZ**

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

2011

**INFLUENCIA DE LA CARGA DE SUSTRATO Y LA TEMPERATURA SOBRE
LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ETAPA HIDROLÍTICA DEL PROCESO
DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE**

**SERGIO LUIS GÓMEZ PEÑALOZA
EDISON ROLANDO PARRA GÓMEZ**

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

Director

**HUMBERTO ESCALANTE HERNANDEZ
Ingeniero Químico PhD.**

Co-director (a)

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

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

2011

AGRADECIMIENTOS

Al director Humberto Escalante Hernández PhD por su dirección.

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

Al bacteriólogo Alex Orlando Velásquez por su colaboración.

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

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

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

DEDICATORIA

A Dios por llenarme de fortaleza.

A mis papas y mi hermana por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación profesional, quienes gracias a su esfuerzo y colaboración me permitieron alcanzar un logro más en mi vida.

Edison Rolando Parra Gómez

A Dios por prepararme y guiarme en este camino.

A mis padres y mis hermanos por su apoyo incondicional y su fe en mí.

Sergio Luis Gómez Peñaloza

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MODELO MATEMÁTICO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	17
2. METODOLOGÍA	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3.1 DA del BF	27
3.1.1 Etapa Hidrolítica-Acidogénica	29
3.1.2 Evaluación de la etapa Acidogénica-Acetogénica	30
3.1.3 Evaluación de la etapa metanogénica	31
3.1.4 Estabilidad del proceso de DA.	32
3.2 EFECTO DE RIS Y TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE CONSUMO DE BF.	33
3.3 EFECTO DE LA RIS SOBRE EL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y_p) DE CH ₄ .	36
4. CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Evolución de los modelos de DA desde 1996 hasta 2009.	17
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de BF	24
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del inóculo utilizado.	25
Tabla 4. Diseño factorial	25
Tabla 5. K_{dis} calculadas para el diseño experimental.	33
Tabla 6. Velocidad de desintegración para el BF.	35
Tabla 7. Rendimientos (Y_p) calculados para tres RIS y tres temperaturas.	36

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Comportamiento de la DA	20
Figura 2. Rangos óptimos para la producción de CH ₄	22
Figura 3. a) b) y c) Concentración de ART en el tiempo de DA a las tres temperaturas de estudio a RIS 1,3; 0,6 y 0,3 respectivamente. d), e) y f) volumen acumulado de CH ₄ (—) y SV (---) a las tres temperaturas de estudio a la RIS 1,3; 0,6 y 0,3.	28
Figura 4. a) b) y c) Relación AGV/AT en el tiempo de DA a las tres temperaturas de estudio a RIS 1,3; 0,6 y 0,3 respectivamente.	28
Figura 5. Concentración de ART durante la DA para una RIS 1,3	29
Figura 6. Concentración de AGV durante la DA para una RIS 1,3	30
Figura 7. Producción de CH ₄ y SV durante el tiempo de DA para una RIS de 1,331	
Figura 8. pH para RIS 1,3 durante el tiempo DA del BF.	32
Figura 9. Análisis de medias para K _{dis} a las RIS y temperaturas evaluadas	33
Figura 10. Análisis de Pareto	34
Figura 11. Velocidad de reacción para temperaturas de 21°C, 39°C y 55°C.	35
Figura 12. Variación del coeficiente de rendimiento de CH ₄ , (Y _p), con las diferentes RIS para una temperatura de 39°C.	37

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo

AGVT	=Ácidos Grasos Volátiles Totales.
AT	= Alcalinidad Total.
ART	=Azúcares Reductores Totales.
BF	=Bagazo de Fique.
DA	=Digestión Anaerobia.
DNS	=Ácido Dinitrosalicílico.
DQO	=Demanda Química de Oxígeno.
LC	=Lodo de Cerdo.
LR	=Liquido Ruminal.
RIS	= Relación Inóculo Sustrato.
ST	=Sólidos Totales.
STV	=Sólidos Totales Volátiles.
SV	=Sólidos Volátiles.

RESUMEN

TITULO: INFLUENCIA DE LA CARGA DE SUSTRATO Y LA TEMPERATURA SOBRE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ETAPA HDROLÍTICA DE LA DIGESTION ANAEROBIA DEL BAGAZO DE FIQUE*

AUTORES: GÓMEZ PEÑALOZA SERGIO LUIS
PARRA GÓMEZ EDISON ROLANDO**

PALABRA CLAVES: Bagazo de fique, cinético, residuo lignocelulósico, digestión anaerobia, biogás, ADM1.

CONTENIDO:

La industria del beneficio de fique en Colombia genera 15 mil toneladas de residuo (bagazo) por hectárea sembrada, el cual está siendo descartado al ambiente ocasionando problemas de contaminación. La caracterización fisicoquímica indica que este residuo es idóneo como fuente de carbono para la producción de biogás. Una de las alternativas tecnológicas para la producción de biogás es la de digestión anaerobia. Sin embargo no se conoce como la temperatura y la carga de sustrato afecta la velocidad de reacción del proceso en la etapa hidrolítica. Todos los ensayos se realizaron en biodigestores batch de 500 mL a tres temperaturas de operación (21°C, 39°C y 55°), alimentados con una carga orgánica de 1,3; 0,6 y 0,3 g $SV_{inoculo}/g SV_{sustrato}$. Se determinó la K_{dis} , la velocidad de desintegración, propuestas en el ADM1, y se estableció la influencia de la temperatura y la carga orgánica. Se desarrolló un modelo para predecir el rendimiento de metano en función de la relación inóculo sustrato para un tiempo de digestión de diez días.

De los resultados obtenidos se concluye que el proceso alcanza su máximo rendimiento en un rango mesofílico y una relación de 1,3 g $SV_{inoculo}/g SV_{sustrato}$. Además se evidenció que el comportamiento cinético de primer orden para la velocidad de desintegración propuesto en el ADM1 se ajusta apropiadamente a los datos experimentales de un proceso de digestión anaerobia de bagazo de fique.

* Proyecto de Grado. Modalidad investigación.

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

ABSTRACT

TITLE: INFLUENCE OF THE LOADING ORGANIC OF SUBSTRATE AND TEMPERATURE ON THE KINETICS PARAMETERS OF THE STAGE PROCESS HYDROLYTIC ANAEROBIC DIGESTION OF FIQUE'S BAGASSE*

AUTHORS: GÓMEZ PEÑALOZA SERGIO LUIS
PARRA GÓMEZ EDISON ROLANDO**

KEYWORDS: Fique's bagasse, kinetic, lignocellulosic residue, anaerobic digestion, biogas, ADM1.

CONTENTS:

In Colombia, the natural fiber process production generates 15000 tonnes of waste (bagasse) per seeded hectare, which are currently discharged without any treatment for avoiding environmental contamination. The bagasse is suitable as a carbon source to biogas production according to its physicochemical characterization. One of the alternatives for biogas' production is the anaerobic digestion process. However, not known as substrate's load and temperature affects the reaction rate of hydrolytic step process. All test were carried out in batch digesters of 500 mL, at three operating temperatures (21 °C, 39 °C and 55 °), was charged an organic load of 1.3, 0.6 and 0.3g SV_{inoculum} / g SV_{substrate}. K_{dis} and the decay rate was determined, as proposed in ADM1, and established the influence of temperature and organic load. A model was developed to predict the yield of methane in terms of the relationship inoculum substrate for a digestion time of ten days.

The results obtained showed that the process reaches its maximum yield in a mesophilic and a ratio of 1.3 g SV_{inoculum} / g SV_{substrate}. In addition it was shown that first-order kinetic behavior for the decay rate proposed in ADM1 is set appropriately to the experimental data of a process of anaerobic digestion of fique's bagasse.

* Working Grade. Research mode.

** Physicochemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering.

Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Co-director: Ing. Liliana del Pilar Castro Molano.

INTRODUCCIÓN

Colombia es el mayor productor de fique a nivel mundial con un área sembrada de 19.813 ha y una producción de 23.101 t/ha anuales. Santander es el tercer productor a nivel nacional (13,8 % de la producción total) [1]. El proceso del beneficio del fique genera aproximadamente 15.000 t de residuo (bagazo)/ha sembrada [2], las cuales están siendo descartadas al ambiente ocasionando serios problemas de contaminación ambiental [2, 3]. Dado que el Bagazo de Fique (BF), está compuesto por una fracción lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) y una fracción soluble (Azúcares Reductores Totales (ART), Ácidos Grasos Volátiles (AGV)). El BF ha sido utilizado para la producción de biogás, mediante sistemas de bioconversión anaerobia. Cuando la bioconversión del BF se realiza con un inóculo compuesto de una mezcla de Líquido Ruminal (LR) y Lodo de Cerdo (LC) [4].

El rendimiento de la producción de biogás se ve afectado por la Relación Inóculo Sustrato (RIS); expresada como la cantidad de SV de inóculo por SV de sustrato [5]. El rendimiento de la Digestión Anaerobia (DA) del BF, a temperatura de 39°C, utilizando una RIS de uno, reportó un valor de 0,45 m³/kg SV [6]. Anteriores resultados indican que una RIS por debajo de 0,5 reduce drásticamente los rendimientos de la producción de CH₄ [6,7].

La DA de materiales lignocelulósicos, como el BF es descrita como un proceso secuencial que involucra diferentes consorcios microbianos que actúan en simbiosis y comprende las etapas de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis [8]. La primera etapa (hidrólisis) de la biodegradación anaerobia es la conversión del sustrato complejo (polímeros particulados y solubles) en productos solubles por hidrólisis enzimática [9]. La hidrólisis de materiales lignocelulósicos es considerada la etapa limitante del proceso debido al contenido

de lignina, el grado de polimerización de los polisacáridos y la cristalinidad de la celulosa [10].

La segunda etapa corresponde a la acidogénesis en la cual los monómeros producidos en la anterior etapa, principalmente los monosacáridos, son convertidos en ácidos orgánicos y productos intermedios como acetato, propionato, butirato, valerato, entre otros, liberando también CO_2 e H_2 .

La tercera etapa se denomina acetogénesis, en la cual se generan acetato mayoritariamente, H_2 y CO_2 . La metanogénesis es el paso final, donde actúa el consorcio metanogénico utilizando el acetato para producir CH_4 y CO_2 principalmente [11, 12]. A pesar de la importancia de la DA de materiales lignocelulósicos, solo un número limitado de estudios se han llevado a cabo para evaluar la cinética de este proceso.

1. MODELO MATEMÁTICO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

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 [13, 14, 15]. En la Tabla 1 se detalla el desarrollo de los últimos modelos utilizados en la DA con su respectivo residuo.

Tabla 1. Evolución de los modelos de DA desde 1996 hasta 2009.

AÑO	AUTOR	MODELO	RESIDUO
1996	Bozinis <i>et al.</i> , [16]	Modelo cinético de Monod (diversos parámetros).	Lodos de PTAR
	Gavala <i>et al.</i> , [17]	Se consideran cuatro etapas de la digestión y tres grupos de bacterias.	Aceite de oliva y EC y aguas residuales.
1997	Kiely <i>et al.</i> , [18]	Se modelaron dos etapas de la digestión, y dos inhibiciones por amonio y ácido acético.	Residuos sólidos municipales y lodos primarios.
	Angelidaki <i>et al.</i> , [19]	Se consideró una etapa enzimática; tres grupos de bacterias y dos inhibiciones por amonio y ácido acético.	Residuos de oliva y estiércol de vaca.
1998	Angelidaki <i>et al.</i> , [20]	Etapas enzimáticas; seis grupos de bacterias, dos inhibiciones (Amonio y ácido acético).	Co-digestión de residuos, como estiércol y glicerol, estiércol con proteínas y gelatina.
2007	Lubken <i>et al.</i> , [21]	ADM1	Estiércol bovino, residuos agroindustriales.
2008	Fezzani y Ben Cheikh [22]	ADM1 incluyendo los AGV e inhibición por acetato.	Residuos de oliva, y residuos sólidos municipales.
	Esposito <i>et al.</i> , [13]	ADM1 basado en una cinética de superficie en la etapa de hidrólisis.	Residuos sólidos urbanos.

2009	Derbal <i>et al.</i> , [23]	ADM1	Residuos de sólidos, lodos anaerobios.
	Fezzani y Ben Cheikh [24]	ADM1 incluyendo degradación de fenoles	Residuos de oliva y residuos de sólidos urbanos.
	Galí <i>et al.</i> , [15]	ADM1 incluyendo inhibición por sulfuros y consumo de acetato.	Combinación de residuos agroindustriales.

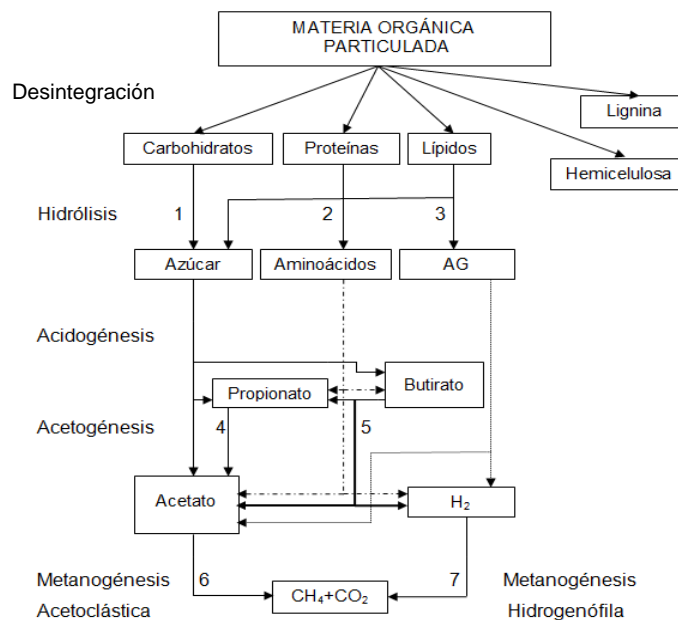
Basado en los modelos encontrados en la literatura, se han desarrollado cinéticas del proceso de DA para materiales lignocelulósicos, como el Cattail (planta acuática), utilizando como inóculo LR a temperatura constante (39 ± 1 °C), se implementó un modelo capaz de simular y predecir la DA, el crecimiento microbiano y la formación de los productos acuosos y gaseosos. Además demostró que la desintegración de las macromoléculas es el paso limitante en la DA del Cattail [25].

De igual forma, en Chile se aplicó el *Anaerobic Digestion Model 1* (ADM1) a residuos sólidos a una temperatura constante (37 °C). La anterior investigación concluyó que el ADM1 se aplica satisfactoriamente en el modelo de la DA de residuos sólidos orgánicos. También se obtuvo una cinética de hidrólisis cercana a la reportada por Batstone (2002) y se demostró que la caracterización del sustrato de alimentación es necesaria para ejecutar el modelo correctamente y con precisión, ya que la fracción biodegradable del sustrato de alimentación es un parámetro significativamente sensible en el modelo [26]. Por lo anterior, para sustratos lignocelulósicos (residuos agroindustriales) la hidrólisis es considerada la etapa limitante del proceso de DA [12, 20, 21], y por consiguiente la producción de CH₄ está directamente relacionada con ella.

Como se observa, diferentes modelos de procesos anaeróbicos han sido desarrollados para aplicaciones específicas en términos de reactores y

características del sustrato. [8, 28]. Sin embargo en el 2002 el grupo de modelamiento matemático de procesos biológicos (*International Water Association* (IWA)) desarrolló un modelo estandarizado ADM1 para describir el comportamiento de la DA de sustratos complejos [27]. En la Figura 1 se muestran los procesos más relevantes de la DA.

Figura 1. Comportamiento de la DA



El modelamiento del proceso de DA es muy complejo. Para facilitar y generalizar la descripción matemática del proceso de DA el grupo IWA incluyó la etapa de desintegración en el modelo ADM 1. La desintegración consiste en la ruptura de material orgánico complejo formando hidratos de carbono, proteínas y lípidos en suspensión, así como una fracción de materia inerte tanto en suspensión como soluble. Se formula como un proceso de primer orden respecto a la concentración de materia orgánica no inerte en suspensión:

$$r_{dis} = K_{dis} * Xc \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde;

Xc = Materia orgánica (BF)/ Volumen de operación [Kg DQO/ m³]

K_{dis} = constante de desintegración [d⁻¹]

r_{dis} = velocidad de desintegración [kg DQO/ m³*d] [12, 21].

Para los residuos lignocelulósicos, la K_{dis} es un parámetro cinético que está relacionado directamente con el rendimiento específico de CH_4 (Y_p) de cada sustrato. En este sentido, la ecuación 1 se define como:

$$B(t) = B_{\alpha} * (1 - e^{(-K_{dis} * t)}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde;

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

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

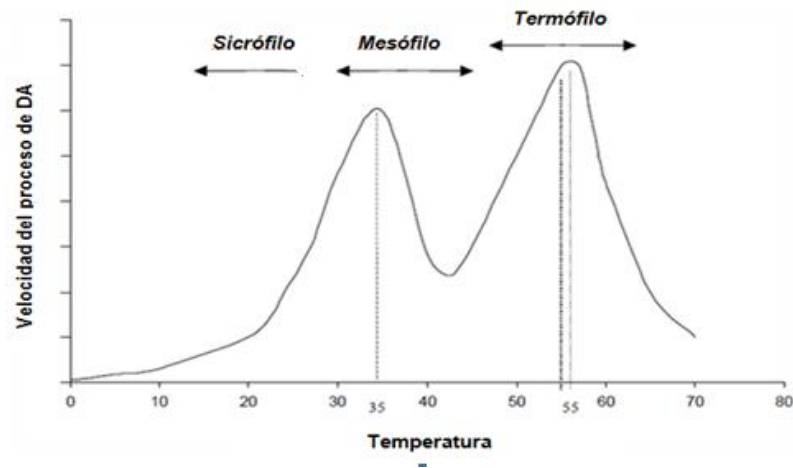
K_{dis} = Constante de desintegración (hidrólisis) de primer orden ($días^{-1}$) y el tiempo t .

t = Tiempo (días) [15].

Teniendo en cuenta que la K_{dis} está en función del Potencial de Biometanización (PB) del sustrato, esta constante puede verse afectada por las condiciones de operación del proceso como la carga orgánica alimentada al digestor (RIS) y la temperatura de incubación [12, 29, 30, 31]. Sin embargo, Galí *et al.*, y Angelidaki *et al.*, (2009), aseguran que la carga orgánica alimentada al digestor y la temperatura influyen sobre los rendimientos específicos de CH_4 (Y_p), pero no presentan incidencia sobre la K_{dis} .

Por otra parte, desde el punto de vista termodinámico y cinético la temperatura tiene mucha influencia sobre los rendimientos del proceso de DA. Siendo la metanogénesis la etapa más afectada por esta variable. En la Figura 2 se presenta un esquema de los rendimientos del proceso de DA frente a la temperatura.

Figura 2. Rangos óptimos para la producción de CH₄



En la Figura 2, se aprecian 2 rangos óptimos para el máximo rendimiento de la producción de CH₄: mesofílico, (alrededor de 35°C) y termofílico (alrededor de 55°C) [27].

La temperatura del reactor no solo afecta la velocidad de reacción de los procesos fisicoquímicos sino también la velocidad de conversión de los procesos bioquímicos. Cuando se produce un cambio de temperatura de un rango a otro, existen consorcios microbianos que no son compatibles con estos cambios, lo cual ocasiona que su metabolismo sea más lento y como consecuencia de esto se disminuye la velocidad de la reacción del proceso [28].

Las expresiones clásicas de la variación de la velocidad de reacción (r) con la temperatura T se basan en la ecuación de Arrhenius, la cual se representa en la ecuación:

$$r_T = r_o * e^{C/(T)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde;

r_o = Velocidad de reacción a una temperatura de referencia T_o

r_T = Velocidad de reacción a la temperatura T

C = coeficiente que toma en cuenta la energía de activación y la temperatura; y que en un rango usual de temperatura en una DA puede considerarse constante.

La ecuación 3 puede ser utilizada para describir como la velocidad de reacción de la etapa de desintegración puede verse afectada por la temperatura de operación del digester [27]. Veeken and Hamelers (1999) estudiaron la dependencia de la temperatura sobre la etapa hidrolítica para seis sustratos sólidos y estimaron la energía de activación promedio usando la ecuación de Arrhenius, en este estudio se concluyó que en el rango mesofílico se tienen los valores más altos de K_{dis} [32].

Vavilin *et al.*, 2007 realizaron un análisis del comportamiento cinético de la etapa hidrolítica de materia orgánica particulada (residuos agroindustriales), en este estudio se reportaron valores de K_{dis} para digestiones mesofílicas de 0,1; 0,34 y 0,54 d^{-1} para desechos de cocina, residuos sólidos urbanos y pastos respectivamente; en el rango termofílico los valores de K_{dis} varían entre 0,02 y 0,2 d^{-1} y para temperaturas termofílicas los valores de K_{dis} se encuentran entre 0,066 y 0,1 d^{-1} . Los anteriores resultados permiten concluir que existe una variación de la K_{dis} con la temperatura [30].

La descripción del proceso de DA del BF requiere el desarrollo de un modelo cinético de la etapa de hidrolítica, que permita evaluar la influencia de la carga orgánica de sustrato y de la temperatura sobre el rendimiento del proceso.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto de la temperatura y la RIS sobre la velocidad de reacción de la etapa de hidrolítica del proceso de DA del BF; y de esta forma determinar las constantes cinéticas del modelo que permitan conocer la velocidad de reacción y entender de los mecanismos de las reacciones de la DA del BF.

2. METODOLOGÍA

El desarrollo del modelo matemático de la etapa hidrolítica de la DA del BF requirió de datos experimentales de rendimiento y producción de CH₄ versus tiempo; a diferentes RIS y temperaturas. Se realizaron experimentos de DA utilizando como sustrato BF y como inóculo una mezcla de Líquido Ruminal (LR) y Lodo de Cerdo (LC).

La muestra de BF utilizado en el estudio procede de la planta de beneficio; ubicada en el municipio de Mogotes, Santander. Las muestras se almacenaron en recipientes herméticos refrigerados, y se transportaron a las instalaciones del laboratorio de biotecnología de la UIS. Antes de ser utilizado el BF se desfibró logrando un tamaño de partícula adecuado para la biodigestión. En la Tabla 2 se muestran las principales características analizadas del BF.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de BF

Parámetro	Unidades	Resultado
pH		4
ST	mg/L	22,6
SV	mg/L	20,92
C/N		63
Alcalinidad (AT)	mgCaCO ₃ /L	3.300
AGV	mg/L	10.800
Celulosa	%	41,81
Hemicelulosa	%	22,17
Lignina	%	15,56

La Tabla 2 muestra la composición fisicoquímica del BF, indicando que este residuo posee elevadas concentraciones de material orgánico lo que lo convierte en un sustrato adecuado para ser tratado por sistemas de bioconversión anaeróbica para la producción de biogás [6].

Teniendo en cuenta la composición elemental de C (35,58); H (6,02); O (47,44), N(1,32) (en porcentaje) del BF, se obtuvo como fórmula empírica para el BF $C_{32,9}H_{66,9}O_{32,9}N_{1,0}$.

Como inóculo para el proceso de producción de CH_4 se utilizó una mezcla de LR y EC en proporción 1:1 (v/v). El LR se adquirió en el frigorífico “El Vijagual”, (Rionegro-Santander). El LC se recolecto de la porcícola “Portoferrayo” ubicada en el municipio Mesa de los Santos, Santander. En la Tabla 3 se muestra las propiedades fisicoquímicas del consorcio microbiano utilizado en los diferentes ensayos, se observa que el alto valor de pH compensa la acidez del BF, convirtiéndose en el inóculo idóneo para la DA.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del inóculo utilizado.

Parámetro	LR-LC	Unidades
pH	8	
ST	25,770	mg/L
SV	20,22	mg/L
ALC	3.100	mgCaCO ₃ /L
AGV	7.200	mg/L

La influencia de la RIS y de la temperatura sobre la producción de CH_4 se evaluó mediante un diseño factorial 3^2 . A partir de una base fija de inóculo expresada en g SV (6,1 g SV) y variando la carga orgánica (4,6 g SV; 10,4 g SV; 18,8 g SV) se determinaron las RIS experimentales (Tabla 4). Las r y la K_{dis} se determinaron mediante la Ecuación 1 y 2 respectivamente, para cada una de las RIS y temperaturas evaluadas.

Tabla 4. Diseño factorial

			Niveles de experimentación		
Variables		Unidades	Bajo	Medio	Alto
Factores	RIS	g SV/g SV	0,3	0,6	1,3
	T	°C	21	39	55
Respuesta	K_{dis}	d ⁻¹			

La DA se llevó a cabo en reactores tipo batch de 0,5 L. Para cada RIS la secuencia de funcionamiento fue: 10 reactores alimentados con tres cargas de sustrato a tres temperaturas. Para estudiar la evolución de la DA se determinó diariamente la concentración de ART 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 [33]. La producción de CH₄ se determinó mediante el método de desplazamiento alcalino [36], y se llevó a condiciones normales de acuerdo:

$$V_{NTP} = V * \frac{(P_0 - P_v) * T_0}{P_{atm} * T} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde;

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

V = Volumen de gas generado (mL)

P_0 = Presión del CH₄ en condiciones normales

P_v = Presión de vapor a la temperatura del test (mbar) [34].

La cuantificación de los SV se realizó de acuerdo al *Standard Methods* (APHA) [33]. Las variables de estabilidad del proceso fueron pH y la relación Ácidos Grasos Volátiles Totales con respecto Alcalinidad Total (AGVT/AT). El pH fue determinado por método directo. La concentración de AGVT se estableció de acuerdo al procedimiento de titulación descrito por Anderson y Yang [36,37].

El ajuste de los datos experimentales se realizó en *Matlab 7.9.0.529* con la herramienta *curvefitting* y el análisis de los resultados se realizó con mediante el software *StatGraphics Centurion XV, StatPoint Inc., Virginia, EE.UU.*

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DA del BF

En las Figuras 3 y 4 muestran los comportamientos del proceso de DA a partir del BF para cada una de las cargas orgánicas alimentadas al digestor: RIS (1,3; 0,6; 0,3) operados en tres temperaturas 21°C, 39°C, y 55°C. En la Figura 3 se aprecia el consumo de ART para las RIS a diferentes temperaturas, la concentración inicial es igual en todos los ensayos. Inicialmente se observa un rápido consumo logrando una estabilidad en el cuarto día de la DA, por otra parte el mayor consumo de ART se ve reflejado a una temperatura de 39°C, de esta manera, la producción de CH₄ se ve afectada por la etapa hidrolítica [8, 13]. Además una remoción alta de SV, se refleja en el volumen de CH₄ reportando una mayor producción a una temperatura de 39 ° C. En la Figura 4 se observa la relación AGVT/AT, la RIS 0,3 alcanzan valores muy altos lo cual se traduce en un desbalance en la DA, generando una acumulación de AGV [8, 32]; dicha acumulación se refleja en los bajos volúmenes de CH₄ y baja remoción de SV. Por lo anterior la temperatura de 39 °C es la mejor para llevar a cabo el proceso de DA de BF, logrando una mayor rendimiento en la producción de CH₄ a una RIS de 1,3.

A continuación se describe cada la evaluación de las etapas de la DA y la estabilidad del proceso para la relación de 1.3 que fue la que alcanzó los mayores rendimientos en la producción de CH₄

Figura 3. a) b) y c) Concentración de ART en el tiempo de DA a las tres temperaturas de estudio a RIS 1,3; 0,6 y 0,3 respectivamente. d), e) y f) volumen acumulado de CH₄ (—) y SV (---) a las tres temperaturas de estudio a la RIS 1,3; 0,6 y 0,3.

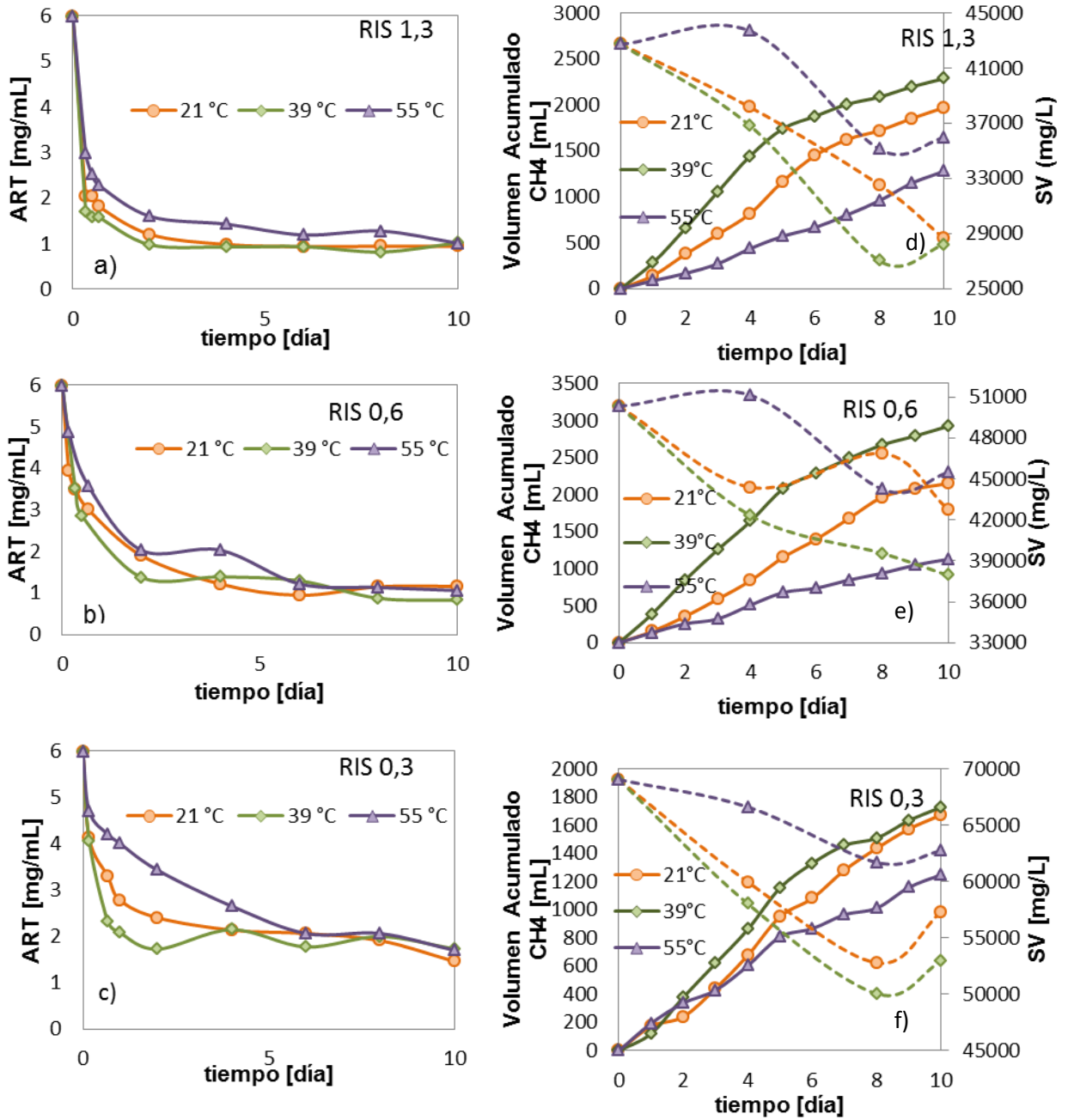
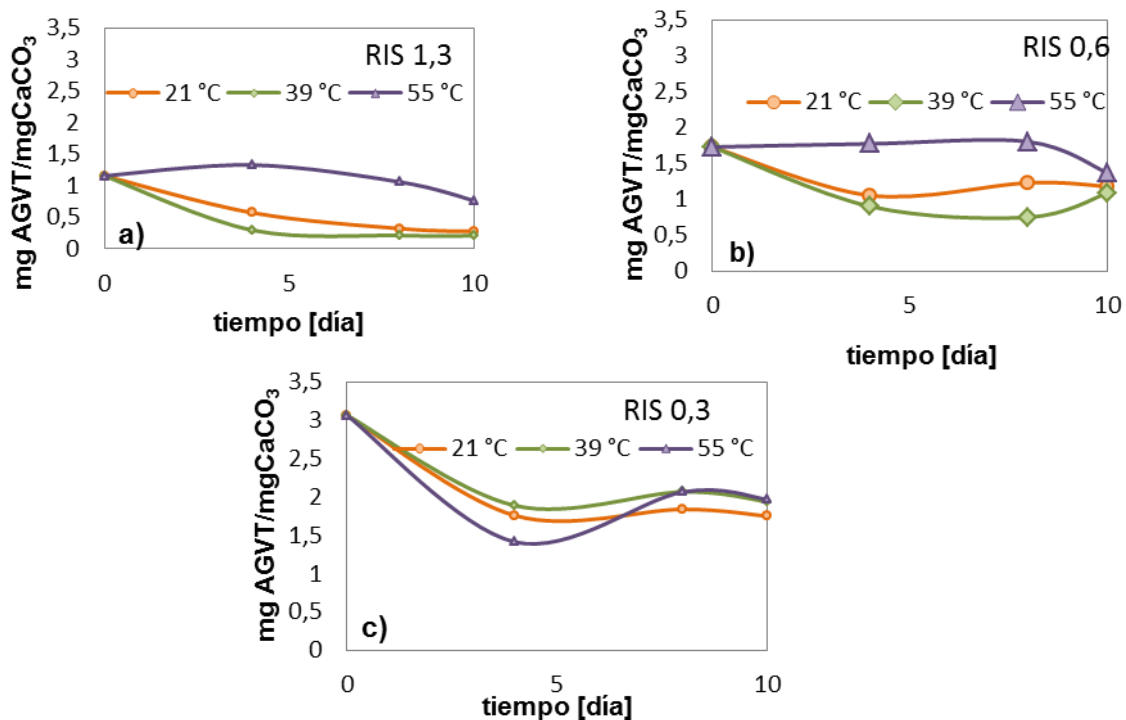


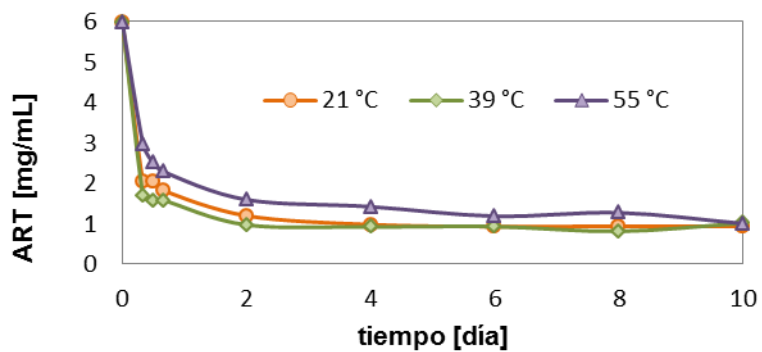
Figura 4. a) b) y c) Relación AGV/AT en el tiempo de DA a las tres temperaturas de estudio a RIS 1,3; 0,6 y 0,3 respectivamente.



3.1.1 Etapa Hidrolítica-Acidogénica

En la Figura 5 se observa que inicialmente existe una alta concentración de ART, esto significa que dentro del reactor hay materia orgánica soluble disponible para arrancar el proceso de digestión, lo cual es favorable teniendo en cuenta que todas las etapas del proceso son simultaneas y dependientes unas de otras [11].

Figura 5. Concentración de ART durante la DA para una RIS 1,3

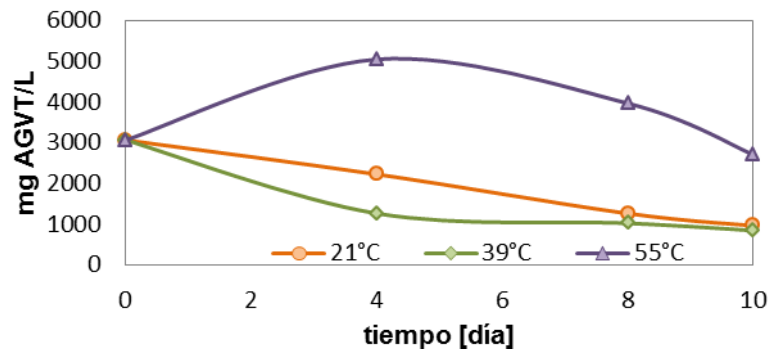


Se observa el rápido consumo de ART por parte de los microorganismos durante los primeros días de digestión. Sin embargo en el rango termofílico (55°C) se aprecian concentraciones de ART mayores durante el tiempo de digestión, lo cual indica un menor consumo por parte de las bacterias acidogénicas responsables de esta etapa. De estos resultados se puede inferir que los microorganismos consumidores de azúcares tienen un metabolismo más eficiente en el rango mesofílico (39°C). La estabilización de la etapa hidrolítica-acidogénica se alcanza el cuarto día para cada uno de los rangos de temperatura estudiados. Esta estabilización dentro del reactor origina condiciones adecuadas para la siguiente de la etapa de la DA, donde los monosacáridos son convertidos en ácidos orgánicos.

3.1.2 Evaluación de la etapa Acidogénica-Acetogénica

Los AGV son productos intermedios de la DA y la rápida respuesta a cualquier cambio en su concentración es un indicador eficaz de la evolución del proceso [11]. Una acumulación de AGV en el sistema indica la disminución de la velocidad de degradación de los mismos, por parte de las bacterias acetogénicas.

Figura 6. Concentración de AGV durante la DA para una RIS 1,3

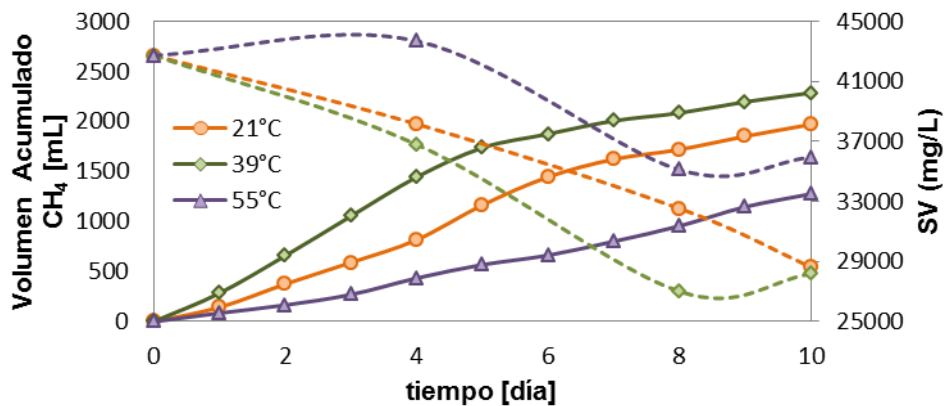


En la gráfica 6 se observa que para las temperaturas de 21°C y 39°C la concentración de AGV disminuye durante el tiempo de digestión, siendo mayor el

consumo de ácidos a 39°C. Estos resultados muestran que para el rango mesofílico el proceso de DA se desarrolla convenientemente para convertir los AGV en acetato y subsecuentemente a CH₄. Este comportamiento es contrario al que se distingue para la temperatura de 55°C, en la cual se presenta un incremento significativo en la producción de AGV, lo que significa que esta temperatura favorece la producción de AGV en el reactor, ocasionando acumulación y desestabilización en el proceso y como consecuencia una disminución en los rendimientos de la producción de CH₄.

3.1.3 Evaluación de la etapa metanogénica

Figura 7. Producción de CH₄ y SV durante el tiempo de DA para una RIS de 1,3



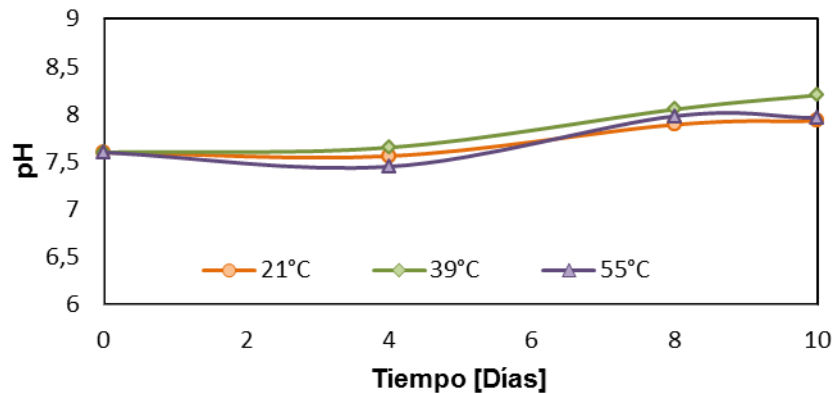
En la Figura 7 se evidencia el proceso de DA a partir del BF; a medida que disminuye la concentración de SV aumenta la producción de CH₄, este es un comportamiento propio de los procesos de DA. La mayor producción de CH₄ se alcanza cuando el reactor se opera en rango mesofílico, lo que significa que el consorcio microbiano compuesto por LR+LC tiene una mayor actividad enzimática en este rango de temperatura.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos para la evaluación de las etapas anteriores de la DA, lo que demuestra que las variables empleadas para la evaluación del proceso describen de forma correcta el comportamiento de la DA.

3.1.4 Estabilidad del proceso de DA.

Como se puede observar en la Figura 8, el pH osciló entre 7,5 y 8 manteniéndose siempre en el rango de valores de pH compatibles con el crecimiento normal de los microorganismos anaerobios [6]. No se observó un desequilibrio en el pH, incluso cuando la temperatura de operación fue de 55°C.

Figura 8. pH para RIS 1,3 durante el tiempo DA del BF.



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 [13, 31]. En este estudio se obtuvieron valores más altos (0,8-1,0), debido a que el BF es un sustrato ácido comparado con otros sustratos estudiados. Sin embargo, Los rendimientos de CH₄ obtenidos son comparables con los encontrados en la literatura [40].

En el intervalo (0,8-1,0) el proceso no presentó inhibición, mostrando una mejor capacidad buffer en el rango mesofílico. Para relaciones AGVT/AT mayores a 1,2 este proceso se inhiben por acidificación.

3.2 EFECTO DE RIS Y TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE CONSUMO DE BF.

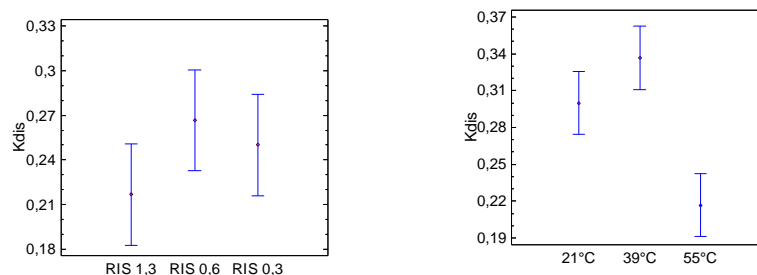
Para cada una de las RIS y temperatura se calculó la K_{dis} , mediante la Ecuación 2 (Tabla 5). Los resultados obtenidos muestran que la constante de desintegración del BF es más alta a una temperatura de 39°C y más baja a 55 °C lo cual concuerda con la producción de CH_4 . Las K_{dis} del BF (Tabla 5) son similares a las reportadas para diversos sustratos como: estiércol de cerdo, rape, cebada y torta de aceite de girasol con valores de 0,17; 0,24; 0,23 d^{-1} y producción de CH_4 0,150; 0,250; 0,200 m^3/kg SV respectivamente [13, 27] estos resultados muestran la alta capacidad de biodegradación del BF para la producción de CH_4 .

Tabla 5. K_{dis} calculadas para el diseño experimental.

RIS[g SV _{inóculo} /g SV _{sustrato}]	1,3			0,6			0,3		
Temperatura [°C]	21	39	55	21	39	55	21	39	55
K_{dis} BF [d^{-1}]	0,30	0,34	0,22	0,32	0,32	0,27	0,27	0,29	0,25

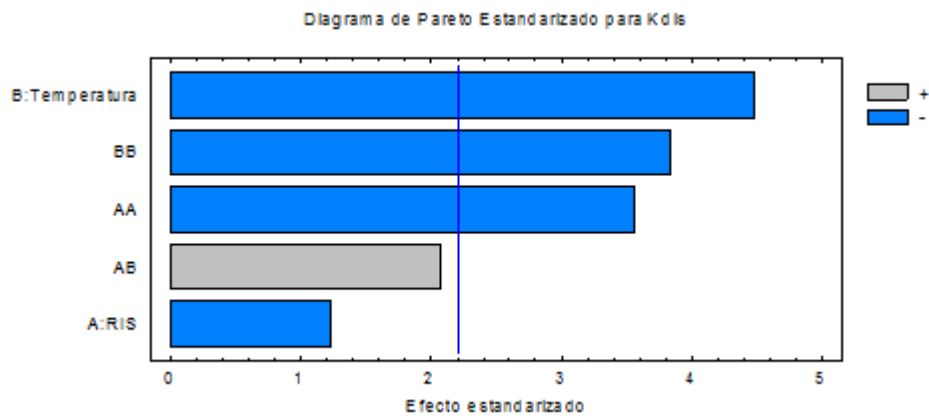
En la figura 9 se observa que al realizar un análisis de medias para las K_{dis} con diferentes RIS a una misma temperatura el valor de la función probabilidad (P) para una temperatura de 21°C, 39°C y 55°C es 0, 2291; 0,0955 y 0,2630 respectivamente; los anteriores valores son superiores a 0,05, por lo tanto no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel de confianza del 95,0%.

Figura 9. Análisis de medias para K_{dis} a las RIS y temperaturas evaluadas



Para evaluar el efecto de la temperatura en la K_{dis} se realizó el mismo tratamiento descrito anteriormente arrojando un valor de P (0,0032) inferior a 0,05; demostrando que si existen diferencias estadísticamente significativas. El anterior análisis estadístico se correlaciona con el análisis de Pareto (Figura 10) que mostró un efecto negativo para la temperatura y la no significancia de la RIS.

Figura 10. Análisis de Pareto



Por lo anterior la K_{dis} no depende de la carga orgánica alimentada al reactor si no de la temperatura de DA.

Una vez determinada la K_{dis} se calculó X_c (materia orgánica BF) con la fórmula empírica del BF ($C_{32,9}H_{66,9}O_{32,9}N_{1,0}$), el valor fue de 1,03 g DQO/g BF \cdot m³.

La velocidad de desintegración (r) del BF se calculó de acuerdo a la Ecuación 1 (Tabla 6). La velocidad de desintegración del BF depende de la carga orgánica alimentada al biorreactor, la composición de la materia orgánica en términos de DQO y la temperatura del digestor.

Es de notar que una mayor velocidad de reacción de desintegración hace que la concentración de AGV aumente en el biodigestor, lo que ocasiona inhibición por acidificación para la RIS de 0,3. Esta inhibición se debe a que las bacterias acetogénicas y metanogénicas son más lentas y más sensibles que las bacterias

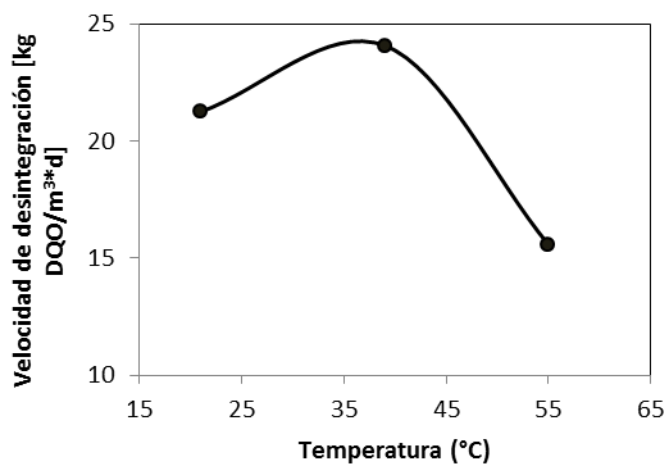
acidogénicas, por lo tanto su crecimiento y metabolismo se ve afectado por la acidez del medio [28].

Debido a que la RIS de 1,3 fue la que alcanzó la mayor rendimiento de CH₄, se analizó la influencia de la temperatura sobre la velocidad de desintegración para esta relación. La velocidad de desintegración se puede asociar a una velocidad de reacción enzimática [17]. Considerando esto para las reacciones enzimáticas, la velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente con la temperatura hasta la temperatura óptima, seguido por un decaimiento exponencial si se excede la misma [37]. Este comportamiento se observa en la Figura 11 donde la velocidad de desintegración varía al aumentar la temperatura (Figura 11). Esto significa que la temperatura tiene un efecto relevante sobre la velocidad de desintegración. Siendo el valor favorable 39°C.

Tabla 6. Velocidad de desintegración para el BF.

RIS	1,3			0,6			0,3		
Temperatura [°C]	21	39	55	21	39	55	21	39	55
r[kg DQO/m ³ *d]	21,24	24,08	15,58	47,09	47,09	39,73	64,18	68,93	59,42

Figura 11. Velocidad de reacción para temperaturas de 21°C, 39°C y 55°C.



Debido a que la velocidad de desintegración del BF depende de la carga orgánica alimentada (RIS) al biodigestor y es la etapa limitante del proceso, los rendimientos de metanización se ven influenciados por esta variable. Por lo anterior, se estableció el efecto de la RIS sobre el coeficiente de rendimiento de CH₄ (Y_p).

3.3 EFECTO DE LA RIS SOBRE EL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y_p) DE CH₄.

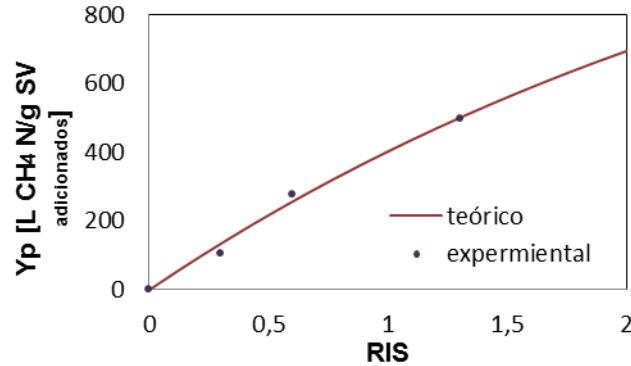
El coeficiente de rendimiento de CH₄ (Y_p); (L CH₄/Kg SV adicionado) fue determinado de forma experimental y se expresa como el volumen de CH₄ acumulado durante los diez días de digestión por la cantidad de sustrato en SV adicionado. En la Tabla 7 se demuestra la marcada influencia de la RIS sobre la productividad de CH₄. Se puede afirmar que una RIS debajo de 0,6 reduce substancialmente los rendimientos de la producción de CH₄ a partir del BF. Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura para sustratos como frutas y vegetales, residuos de cocina, residuos de torta de aceite de girasol y BF [13].

Tabla 7. Rendimientos (Y_p) calculados para tres RIS y tres temperaturas.

RIS	1,3			0,6			0,3		
Temperatura [°C]	21	39	55	21	39	55	21	39	55
Y _p [L/kg SV adicionado]	427,9	496,5	277,1	205,4	279,2	107,7	88,8	91,7	66,3

Las máximas producciones de CH₄ se alcanzaron cuando los digestores fueron operados a 39°C lo cual coincide con el análisis discutido anteriormente. Por esta razón se empleó esta temperatura como referencia para calcular la variación de Y_p con cada una de las RIS (Figura 12).

Figura 12. Variación del coeficiente de rendimiento de CH₄, (Y_p), con las diferentes RIS para una temperatura de 39°C.



Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo matemático en periodo de digestión de 10 días, con una correlación de 0,99 obteniendo la siguiente ecuación:

$$Y_p = 1467 * (1 - e^{(-0,3207 * RIS)}) \text{ Ecuación 5}$$

Donde Y_p = Volumen específico de CH₄ acumulado a 10 días de digestión [L CH₄ N / g SV_{adicionado}]

RIS= [g SV_{inóculo}/g SV_{sustrato}].

La ecuación 5 puede ser usada para predecir el rendimiento de CH₄ para el BF a diferentes RIS a temperatura de 39°C. Esta ecuación demuestra que la RIS es un factor relevante que incide en la producción de CH₄ y por ende en el rendimiento global del proceso.

4. CONCLUSIONES

La producción de CH_4 a partir del BF alcanza el máximo rendimiento ($0,5 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{Kg}$) cuando los biodigestores son alimentados con una carga orgánica de $1,3 \text{ g SV inóculo/g SV de sustrato}$ y operados dentro del rango mesofílico.

Se confirmó experimental y estadísticamente que la constante de desintegración del BF depende de la temperatura de operación del digestor y no de la carga orgánica alimentada.

Se evidenció que el comportamiento cinético de primer orden para la velocidad de reacción de la etapa de desintegración propuesta en el ADM1 se ajusta apropiadamente a los datos experimentales de un proceso de DA de BF. Además se concluye que la velocidad de desintegración depende de la composición del sustrato (BF), de la RIS y de la temperatura.

Se desarrolló un modelo matemático con base en datos experimentales para describir la marcada influencia de la RIS sobre el coeficiente de rendimiento de CH_4 . De acuerdo con este modelo una RIS menor a $0,6$ reduce significativamente los rendimientos de la producción de CH_4 para residuos lignocelulósicos como el BF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Finagro. Fique. Producción y zonas de producción. [Online] [Cited: Enero 24, 2011. www.finagro.com.co.
2. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Ministerio nacional de planeación. Guía ambiental del subsector fiquero.2006.
3. MOJICA P. A., PAREDES V. J., El cultivo del fique en el departamento de Santander. Bucaramanga: Centro regional de estudios económicos, 2004.
4. CASTRO L., ESCALANTE H., QUINTERO M., ORTIZ C., GUZMÁN C., Producción de Biogás a partir del bagazo de fique generado durante el beneficio de fique. Cuarto Simposio de química aplicada SIQUIA. [Cuarto Simposio de química aplicada SIQUIA]. 2009. ISBN 978-958-8593-12-8.
5. O'KEEFE D., CHYNOWETH D., Influence of phase separation, leachate recycle and aeration on treatment of municipal solid waste in simulated landfills cells. 2000, Bioresource Technology, Vol. 72, pp. 55-66.
6. CASTRO L., QUINTERO M., VELÁSQUEZ A., ORTIZ C., GUZMAN C., ESCALANTE H., Influence of particle size and temperature on methane production from fique"s bagasse. Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia; 2010.
7. BARRERA P., SALAS X., CASTRO L., ORTIZ C., ESCALANTE H., Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso de beneficio del fique. 2009, Revista ION, Vol. 22, pp. 53-61.
8. BATSTONE D., KELLER J., ANGELIDAKI I., KALYUZHNYI S.V., PAVLOSTATHIS S.G., ROZZI A., SANDERS W.T.M., SIEGRIST H., VAVILIN

V.A., The IWA anaerobic digestion model No 1 (ADM1). 2002, Water Science and Technology, Vol. 45, pp. 65-73.

9. MATA-ALVAREZ J., MACÉ S., LLABRES P., Anaerobic digestión of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. 2000, Bioresource Technology, Vol. 74, pp. 3-16

10. HENDRIKS A.T.W.M., ZEEMAN G., Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. 2009, Bioresource Technology, Vol. 100, pp. 10-18.

11. DIAZ BÁEZ M., ESPITIA V. y MOLINA P., ed. Digestión anaerobia, una aproximación a la tecnología. Bogotá: Unibiblios, 2002.

12. RAPOSO F., BORJA R., MARTÍN M.A., MARTÍN A., DE LA RUBIA M.A., RINCÓN B., Influence of onoculum-substrate ratio on the anaerobic digestión of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation. 2009, Chemical Engineering Journal, Vol. 149, pp. 70-77.

13. ESPOSITO G., FRUNZO L., PANICO A., ANTONIO G., Mathematical modelling of desintegration-limited co-digestion of OFMSW and sewage sludge. 2008, Wat. Sci. Tech. Vol. 58, pp. 1513-1519.

14. MATA-ALVARES J., Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. 2003, IWA Publishing, pp.1-30.

15. GALÍ A., BENABDALLAH T., ASTALS S., MATA-ALVAREZ J., Modified version of ADM1 model for agro-waste application. 2009, Bioresource Technology, Vol. 100, pp. 2783-2790.

16. BOZINIS N.A., ALEXIOU I.E., PISTIKOPOULOS E.N., Optimal design and operation of an anaerobic co-digestion plant. 1996, Wat. Sci. Tech. Vol. 34, pp. 383-392.

17. GAVALA H.N., SKIADAS I.V., BOZINIS N.A., LYBERATOS G., Anaerobic codigestion of agricultural industries wastewaters. 1996, *Wat. Sci. Tech.* Vol. 34, pp. 67-75.
18. KIELY G., TAYFUR G., DOLAN C., TANJI K., Physical and mathematical modeling of anaerobic digestion of organic wastes. 1997, *Wat. Res.*, Vol. 31, pp. 534-540.
19. ANGELIDAKI I., ELLEGAARD L., AHRING B.K., Modelling anaerobic codigestion of manure with olive oil mill effluent. 1997, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 36, pp. 263-270.
20. ANGELIDAKI I., ELLEGAARD L., AHRING B.K., A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. 1998, University of Denmark. Lyngby, Denmark.
21. 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. 2007, *Water Research*, Vol. 41, pp. 4085-4096.
22. FEZZANI B., RIDHA B.H., Modelling of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste using anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). 2008, *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 6565-6577.
23. DERBAL K., BENCHEIKH-LEHOCINE M., CECCHI F., MENIAI A.H., PAVAN P., Application of the IWA ADM1 model to simulate anaerobic co-digestion of organic waste with waste activated sludge in mesophilic condition. 2009, *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 1539-1543.
24. FEZZANI B., Cheikh R.B., Extension of the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1) to include phenol compounds biodegradation processes for simulating the anaerobic co-digestion of olive mill wastes at mesophilic temperature. 2009, *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 172, pp.1430-1438.

25. ZHAO B.H., YUE Z.B., NI B.J., MU Y., YU H.Q., HARADA H., Modeling anaerobic digestion of aquatic plants by rumen cultures: Cattail as an example. 2009, Water Reserarch, Vol. 43, pp. 2047-2055.
26. CHACANA J., TAPIA P., ZEPEDA O., SÁNCHEZ O., Modelación de la digestión anaerobia de residuos sólidos orgánicos utilizando ADM1. Ingeniería civil ambiental, Universidad Católica del Norte. Antofagasta, Chile; 2008.
27. BASTONE D.J., KELLER J., ANGELIDAKI I., KALYUZHNYI S.V., PAYLOSTATHIS S.G., ROZZI A., SANDER W.T.M., SIEGRIST H., VAVILIN V.A., Anaerobic digestión modelo No.1 IWA Task group for mathematical modelling of anaerobic digestión processes.
28. MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J., Brock biología de los microorganismo. 2006, Pearson Prentice Hall. Vol. 10, pp. 151-159.
29. GUNASEELAN V.N., Effect of inoculum/substrate ratio and pretreatments on methane yield from parthenium. 1995, Biomass and Bioenergy, Vol. 8, pp. 39-44.
30. 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 test. 2006, Process Biochemistry, Vol. 41, pp.1444-1450.
31. VAVILIN V.A., FERNANDEZ B., PALATSI J., FLOTATS X., Hidrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. 2009, Waste Management, Vol. 28, pp. 939-951.
32. HASHIMOTO A.G., Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and production rate from straw. 1989, Biol Wastes, Vol. 28, pp. 247-255.

33. APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1998, Water and wastewater, Vol.18 (20), pp. 25-32.
34. ANGELIDAKI M., ALVES M., BOLZONELLA D., BORZACCONI L., CAMPOS J.L., GUWY A.J., KALYUZHNYI S., JENICEK P., VAN LIER J.B., Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. 2009, Water Science and Technology. Vol. 59, pp. 927-934.
35. SANDOVAL C., MENDOZA M., CARREÑO M., CASTILLO E., Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobic sludges used in urban solid waste treatment. 2009, Waste Management. Vol 29, pp. 704-711.
36. ANDERSON, G; YANG, G; Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digester using a simple titration. Water Environment Research 64. 1992.
37. MSHANDETE A., KIVAISI A., RUBINDAMAYUGI M., MATTIASSON B., Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes. 2004, Bioresource Technology. Vol. 95, pp. 19-24.