

Potencial anaeróbico de aguas rojas de sacrificio bovino para producción biogás y
recuperación de nitrógeno y fósforo

Maryligh Julieth Garnica Patiño, Jenny Alejandra Perea Sierra

Proyecto de grado para optar al título de Ingeniera Química

Director:

Humberto Escalante Hernández

Ingeniero Químico, PhD

Codirectores:

Zamir Sánchez Castro

Ingeniero Químico, MSc

Sergi Astals García

Ingeniero Químico, PhD

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor, por darme sabiduría e inteligencia para terminar este proyecto, por darme la fortaleza para afrontar cada obstáculo que se me presente durante este tiempo de aprendizaje.

A mi mami, Dora Cecilia Patiño por apoyarme en todo, por ser esforzada y valiente por darme ejemplo y enseñarme a que no debo rendirme ante cualquier problema, por siempre mantenerme en sus oraciones, doy gracias a Dios por tu vida y por tu apoyo en todo. Muchas gracias por tu comprensión incondicional por hacer este sueño realidad, mami Te amo.

A mi papi, Raúl Garnica por ser ejemplo de dedicación y estudio, por sus consejos durante este proceso y su apoyo durante mi esta etapa de aprendizaje.

A mi hermana, Tatiana Garnica, por ser la mejor hermana mayor por darme ejemplo en todo, eres la persona que siempre he admirado en todo, por llenarme de alegría y mostrarme el lado bueno de cada situación.

A Juan Diego Santamaria Bareño, por amarme y enseñarme a dedicarme a mis sueño, por apoyarme en muchas decisiones, muchas gracias mi amor por todo, por tus consejos y tu amor durante toda mi etapa universitaria, Dios te puso como una bendición en mi vida

A mi Tía Dolly, Fanny y mis primas Mayra Reyes, Laura Rojas, muchas gracias por sus consejos y enseñanzas en cada etapa de mi vida.

A mi Tía Alix Mayorga y Isabella Niño por ser esas personas que imparten amor, por su ejemplo de esfuerzo y dedicación para realizar lo que se anhela.

A mi Tío Luis José y la profe Elizabeth, muchas gracias por su hospitalidad y su amor por acogerme como una hija más muchas gracias.

A mis amigos Laura, Leydy, Lyda, Camila, Angie, Sindy, Eveling Alex, Álvaro, Sergio y
Herin por formar parte importante durante este proceso de aprendizaje.

A Doña Betty y Jabeth por ser esas mujeres de ejemplo y dedicación por su hospitalidad
durante la pasantía, por su amor.

A mi compañera de Proyecto de grado Jenny Alejandra Perea quien fue un gran apoyo para
terminar con este trabajo.

“¡Se Fuerte y valiente! No tengas miedo ni te desanimas, porque el Señor tu Dios está contigo
dondequiera que vayas”

Josué 1:9

Maryligh Julieth Garnica Patiño

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito esta meta.

A mis padres por ser mi pilar fundamental quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer a las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mi hermano por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mi tía Alicia por estar siempre presente y brindarme sus consejos.

A la señora Miriam por acogerme en su casa gracias infinitas. A Doña Betty y Jabeth por todo el apoyo que me brindaron durante la pasantía por hacerme sentir como en casa, mil gracias.

A mi compañera de trabajo de grado, Marylight por su confianza, apoyo, por haber formado un equipo de trabajo para lograr esta meta, gracias por su generosidad, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A mis amigos y futuros colegas que me acompañaron en esta etapa, gracias por toda su ayuda y buena voluntad.

Jenny Alejandra Perea Sierra

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirnos alcanzar esta meta.

A la Universidad Industrial de Santander por concedernos el espacio para vivir, crecer y aprender.

A nuestro director Humberto Escalante Hernández por la confianza y el compromiso, por su orientación durante este proceso de aprendizaje, por permitirnos crecer como profesionales y como personas.

A la profesora Liliana Castro Molano por guiarnos, compartir sus conocimientos, por las oportunidades que nos brindó, la confianza y ser nuestra guía durante este proyecto.

A nuestros Codirectores Zamir Castro y Sergi Astals por su compromiso, dedicación y apoyo incondicional para terminar con éxito este trabajo. A ustedes les agradecemos enormemente por guiarnos y compartirnos sus conocimientos.

Al grupo de investigación de Biotecnología Ambiental del Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la Universidad de Barcelona (España) por acogernos y brindarnos su colaboración en el desarrollo de la pasantía.

A Don Guillermo y Don Eduardo por la amabilidad y su colaboración.

Al Ingeniero Yoirin y a los operarios del área de tratamiento de aguas residuales de la Planta de Beneficio Rio Frio por la atención y la ayuda brindada.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	16
1. Marco teórico	19
1.1 Digestión anaeróbica.....	19
1.2 Parámetros y variables del proceso de DA	21
1.2.1 Sólidos Volátiles (SV)	21
1.2.2 Temperatura.	21
1.2.3 pH.....	21
1.2.4 Ácidos grasos volátiles (AGV).	21
1.2.5 Alcalinidad total (AT).....	22
1.2.6 Demanda química de oxígeno (DQO).	22
1.3 Actividad hidrolítica específica (AHE)	22
1.4 Actividad metanogénica específica (AME)	22
1.5 Coeficiente de inhibición CI_{50}	23
1.6 Potencial de biometanización (PBM)	23
1.7 Potencial de estruvita (PES).....	23
2. Metodología	24
2.1 Etapa 1. Evaluación de la estabilidad de AR producida en PBB-Río Frío	24
2.2 Etapa 2. Caracterización microbiológica del inóculo	24
2.2.1 Prueba de la actividad metanogénica específica (AME)	25
2.2.2 Prueba de la actividad hidrolítica específica (AHE) del inóculo.	26
2.2.3 Determinación del CI_{50} en la inhibición por amoníaco	26
2.3 Etapa 3. Caracterización bioquímica del sustrato	27
2.3.1 Determinación del Potencial de Biometanización (PBM) de las AR.	27

2.4 Etapa 4. Potencial de recuperación de nutrientes (N y P).....	28
3. Resultados.....	30
3.1 Monitoreo de las aguas residuales	30
3.2 Caracterización fisicoquímica del inóculo.....	31
3.2.1 Determinación de la actividad metanogénica específica (AME).....	32
3.2.2 Determinación de la actividad hidrolítica específica (AHE)	33
3.2.3 Prueba del coeficiente de inhibición.	34
3.3 Caracterización fisicoquímica del sustrato	35
3.3.1 Evaluación del Potencial de Biometanización (PBM) de las AR.....	36
3.4 Determinación del Potencial de estruvita (PES) del digerido.....	39
4. Conclusiones.....	40
5. Recomendaciones	40
Referencias bibliográficas.....	42
Apéndices.....	48

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Resumen de variables.....	29
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del LEB	32
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de las AR	36

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Proceso de beneficio animal implementado en la PBB-Río Frío	17
Figura 2. Variación de los Sólidos Volátiles de las AR.....	30
Figura 3. Variación de la Demanda Química de Oxígeno de las AR	31
Figura 4. Curva de producción de metano acumulada de los ensayos de la AME	32
Figura 5. Dinámica de la DQO en la actividad hidrolítica específica del LEB	33
Figura 6. Curva de metano acumulativa del ensayo de la AHE para el LEB	34
Figura 7. Prueba de inhibición de N-NH ₃ en el inóculo de LEB	35
Figura 8. Relación de AGV/AT y pH	37
Figura 9. Variación de N-NH ₃ y pH.....	37
Figura 10. Potencial de Biometanización de las AR y control	38

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Desplazamiento alcalino	48
Apéndice B. Sólidos totales y Sólidos volátiles	49
Apéndice C. Demanda química de oxígeno	50
Apéndice D. Alcalinidad total y ácidos grasos volátiles	51
Apéndice E. pH	53
Apéndice F. Determinación de la actividad metanogénica específica	54
Apéndice G. Determinación de la actividad hidrolítica específica	56
Apéndice H. Prueba de inhibición	58
Apéndice I. Determinación del potencial de biometanización	60

Lista de Abreviaturas

AR: Aguas rojas

AC: Aguas de corrales

AE: Aguas de lavado estomacal

AV: Aguas verdes

LEB: Lodo de estiércol bovino

DA: Digestión anaeróbica

AGV: Ácidos grasos volátiles

AT: Alcalinidad total

DQO: Demanda química de oxígeno

AME: Actividad metanogénica específica

AHE: Actividad hidrolítica específica

CI₅₀: Coeficiente de inhibición

PBM: Potencial de biometanización

PES: Potencial de estruvita

NH₄⁺: Amonio

PO₄³⁻: Fosfato

RIS: Relación inóculo/ sustrato

Resumen

Título: Potencial anaeróbico de aguas rojas de sacrificio bovino para producción biogás y recuperación de nitrógeno y fósforo*

Autores: Marylight Julieth Garnica Patiño, Jenny Alejandra Perea Sierra**

Palabras claves: Sacrificio bovino, aguas rojas, digestión anaeróbica, potencial de biometanización, inhibición, potencial de estruvita, recuperación de nutrientes.

Descripción

El proceso de beneficio bovino genera cuatro corrientes de aguas residuales entre las que se encuentra las aguas rojas (AR). La digestión anaeróbica (DA) es una tecnología aplicable para el tratamiento de este residuo. Sin embargo, durante la DA de las AR se genera NH_3 , el cual es un agente inhibitorio del proceso. Los estudios realizados hasta la fecha han evaluado la DA de aguas residuales del beneficio animal con inóculos como: lodo de depuración de aguas residuales y lodos granulares. No obstante, se desconoce la tolerancia para el lodo de estiércol bovino (LEB). En este sentido el presente trabajo evaluó la caracterización microbiológica del inóculo y bioquímica del sustrato. Los resultados encontrados mostraron que la actividad metanogénica específica (AME) fue de $0.035 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SV}_{\text{inóculo}} \text{ día}^{-1}$, así como la actividad hidrolítica específica (AHE) $0.019 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SV}_{\text{inóculo}} \text{ día}^{-1}$ destacándose como buen inóculo para la degradación de la materia orgánica. Por otro parte, se desarrolló una prueba de inhibición por amonio para verificar la resistencia del inóculo frente a la máxima concentración de $18.20 \text{ NH}_3 \text{ mgN L}^{-1}$ que se presenta en la DA. Los resultados experimentales demuestran que LEB tuvo un coeficiente de inhibición (CI_{50}) de $19.5 \text{ NH}_3 \text{ mgN L}^{-1}$ lo cual significa que no presenta riesgo de inhibición en el proceso de DA. Además, se determinó el potencial de biometanización (PBM) de las AR a temperatura mesofílica donde se obtuvo un rendimiento de $0.87 \text{ m}^3\text{CH}_4 \text{ kg}^{-1}\text{SV}$. Así mismo, se obtuvo una remoción de demanda química de oxígeno (DQO) 57,45% y sólidos volátiles (SV) de 45,51%, lo anterior demuestra que las AR son un sustrato adecuado para valorizarse por DA. Adicionalmente, se encontró que el digerido de las AR se puede utilizar como materia prima para la recuperación de nutrientes N y P con un potencial de estruvita de $0.27 \text{ kg ES m}^{-3}\text{AR}$.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Humberto Escalante Hernández PhD en Ingeniería Química Codirectores: Zamir Sánchez Castro MSc en Ingeniería Química y Sergi Astals García PhD en Ingeniería Química.

Abstract

Title: Anaerobic potential of bovine slaughter red water for biogas production and nitrogen and phosphorus recovery *

Authors: Marylight Julieth Garnica Patiño, Jenny Alejandra Perea Sierra**

Keywords: Bovine sacrifices, red waters, anaerobic digestion, potential for biomethanization, inhibition, struvite potential, nutrient recovery.

Summary

Bovine slaughterhouse generates four main wastewater streams among which is the red stream (AR). Anaerobic digestion (DA) is a suitable technology for the treatment of this residue. However, NH_3 is generated during the digestion process, which can inhibit the whole process. Studies carried out to-date have evaluated the DA of wastewater from animal benefits with inoculums such as sewage sludge and granular sludge. However, the tolerance to NH_3 for bovine manure sludge (LEB) is unknown. In this sense, the present work evaluated the microbiological characterization of the capacity and resilience of the LEB inoculum and biochemistry of the substrate. The results found showed that the specific methanogenic activity (SMA) was $0.035 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SV}_{\text{inóculo}} \text{ día}^{-1}$, as well as the specific hydrolytic activity (AHE) $0.019 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SV}_{\text{inóculo}} \text{ día}^{-1}$. This results highlighting as a good inoculum for the degradation of organic matter. On the other hand, an ammonium inhibition test was developed to verify the resistance of the inoculum against the maximum concentration of 18.20 mgN L^{-1} presented in the DA. The experimental results show that LEB had an inhibition coefficient (IC_{50}) of 19.5 mgN L^{-1} indicating that it does not present a risk of inhibition in the DA process. In addition, the biomethanization potential (PBM) of the ARs at mesophilic conditions showed a methane yield of $0.87 \text{ m}^3\text{CH}_4 \text{ kg}^{-1}\text{SV}$. Likewise, a removal of chemical oxygen demand (COD) 57.45% and volatile solids (SV) of 45.51% was obtained, the above demonstrates that the ARs are a suitable substrate to be valued by DA. Finally, it was found that the digested AR can be used as a raw material for the recovery of N and P nutrients with a struvite potential of $0.27 \text{ kg ES m}^{-3}\text{AR}$.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Humberto Escalante Hernández PhD en Ingeniería Química Codirector: Zamir Sánchez Castro MSc en Ingeniería Química y Sergi Astals García PhD en Ingeniería Química.

Introducción

Las proyecciones de producción mundial de carne según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO) es de 73 millones de toneladas para el 2019 (Ben-Belhassen & Abbrassian, 2018). Así mismo, se prevé que esta se duplicará para el año 2050 y la mayor parte del crecimiento se concentrará en los países en desarrollo (Bennett, 2016). Por su parte, en Colombia la ganadería de carne contribuye con el 1.4% del producto interno bruto (PIB) nacional, aproximadamente 21% del PIB agropecuario y el 48% del PIB pecuario (Fedegan, 2018).

Santander se encuentra entre los cinco departamentos de Colombia con mayor beneficio de ganado vacuno cuenta con plantas certificadas para el beneficio y exportación de carne entre las que se encuentra la planta de beneficio bovino Río Frío (PBB-Río Frío). Esta empresa está ubicada en la vía Corredor Río Frío (Lat N 7°3'14.82'' Long W 73°7'55.282''), Floridablanca-Santander, y presenta un beneficio promedio de 102,000 bovinos al año. Según el decreto 1500 del 2007 la PBB-Río Frío se constituye como tipo I y está facultada para exportar carne canal. Además, la PBB-Río Frío hace parte del clúster ganadero cárnico del oriente y se estima que en los próximos años aumentará la cantidad de animales beneficiados.

En la figura 1 se presenta el proceso de beneficio de la PBB-Río Frío donde se generan cuatro corrientes de aguas residuales; aguas de lavado de corrales (AC), aguas rojas provenientes de la zona de sacrificio (AR), aguas de lavado estomacal (AE) y aguas verdes generadas en el lavado de vísceras blancas (AV). Anualmente PBB-Río Frío genera alrededor de 125,500 m³ de aguas residuales. Estudios anteriores han reportado cargas orgánicas para este tipo de residuos entre 1.782 y 14.395 kg m⁻³ de sólidos volátiles (SV) y entre 3.163 y 31.6 kg m⁻³ de demanda química de oxígeno (DQO) (Jensen, et al., 2015).

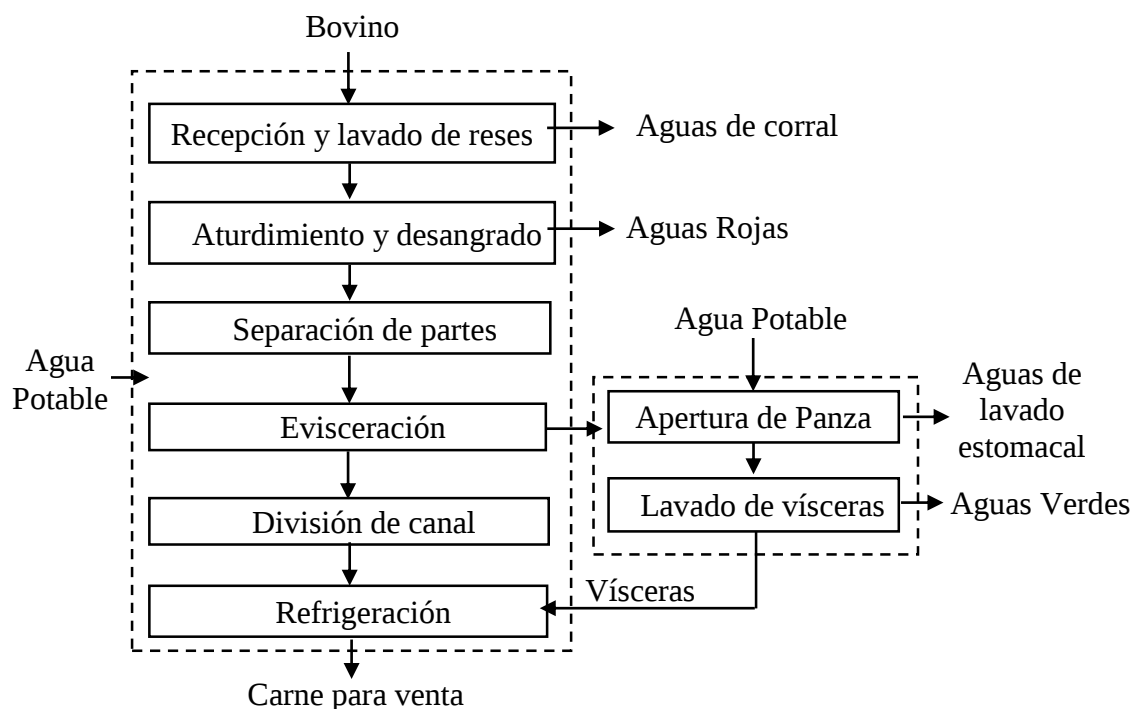


Figura 1. Proceso de beneficio animal implementado en la PBB-Río Frío

En la actualidad PBB-Río Frío realiza un tratamiento fisicoquímico primario a sus aguas residuales, el cual consta de: almacenamiento, tamizado, homogenización, floculación, coagulación y prensado y secado de lodos, con un costo superior a US \$163,000/año. Sin embargo, algunos días de la semana la capacidad de beneficio supera los 500 bovinos/día y el tratamiento de las aguas es insuficiente y su DQO supera los 150 mg L⁻¹ estipulados por la normatividad de vertimientos vigente (Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible, 2018).

Por lo anterior, en la PBB-Río Frío se busca alternativas que le permitan mejorar la gestión de sus aguas residuales, sobre todo teniendo en cuenta el aumento de los sacrificios dada la apertura de futuras exportaciones. En este sentido, la digestión anaeróbica (DA) ha sido utilizada en el tratamiento de este tipo de residuos, dado que no solo permite su gestión, sino también su

valorización energética mediante la obtención de biogás y la recuperación de nutrientes (fósforo y nitrógeno) en forma de estruvita.

Es así que el presente trabajo hace parte del proyecto titulado “*Digestión Anaeróbica alternativa tecnológica para el tratamiento y valorización de las aguas residuales de una planta de beneficio bovino*” y se centra en la DA de las AR utilizando como inóculo lodo de estiércol bovino (LEB) que es residuo generado en la PBB-Río Frío.

El potencial de biometanización (PBM) es una variable de caracterización bioquímica de un sustrato, cuando se desea someter a DA. Así, el PBM es una medida del volumen de CH₄ producido por un sustrato (Angelidaki, et al., 2009).

Las investigaciones en el proceso de tratamiento de aguas residuales de las plantas de beneficio animal han sido objeto de numerosos estudios. Por ejemplo, Angelidaki y Hejnfelt estudiaron la digestión anaeróbica de subproductos de matadero para la producción de biogás (Angelidaki & Hejnfelt, 2009). Ahm et al. investiga los efectos de la variación en la relación inóculo a desecho en el tratamiento anaeróbico de los desechos del matadero, y propone un sistema de tratamiento anaeróbico de bajo costo (Ahm, et al., 2014). En otro estudio, Moukazis et al. se centró en la evaluación de cuatro subproductos animales como sustratos potenciales para la digestión anaeróbica con alta biodegradabilidad (Moukazis, et al., 2018).

Estudios anteriores, reportan PBM para las AR entre 0.22 - 0.44 m³ CH₄ kg⁻¹ SV (Jensen, et al., 2014). No obstante, dado el contenido de sangre presente en las AR, hacen que sean ricas en proteínas, las cuales se degradan durante la DA a amoníaco (NH₃). El NH₃ se difunde libremente en el sustrato del biodigestor y modifica el pH intracelular de los microorganismos anaeróbicos causando desequilibrio de protones, inhibición de las reacciones enzimáticas y aumento en el requerimiento de energía de mantenimiento. El anterior efecto inhibitorio conlleva a operaciones

de DA inestables en los digestores a escala real (Wang, et al., 2016). A la fecha los estudios realizados en DA de aguas residuales de beneficio bovino han utilizado como inóculo lodos de depuración de aguas residuales municipales, los cuales muestran un coeficiente de inhibición del 50% (CI_{50}) el cual representa la concentración a la que la actividad metanogénica específica (AME) es la mitad de máximo para concentraciones de NH_3 de 86 mg N L^{-1} (Astals, et al., 2015). Para el caso de lodos granulares, su CI_{50} se encuentra entre 50 y $17,000 \text{ mg N L}^{-1}$ (Chen, et al., 2008). Sin embargo, a la fecha no se cuenta con datos de la tolerancia del lodo de estiércol bovino al NH_3 durante el proceso de DA.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar si durante la DA de las AR llega a provocarse inhibición por amoníaco debido a que estas son ricas en proteínas, las cuales se degradan a NH_3 . Para esto es necesario la caracterización microbiológica del inóculo utilizado (LEB) desde el punto de vista de su actividad hidrolítica, metanogénica y una prueba de resistencia a diferentes concentraciones de amonio para determinar el CI_{50} , además evaluar la biodegradabilidad bioquímica de las AR mediante la determinación del PBM y recuperación de nutrientes (N y P).

1. Marco teórico

1.1 Digestión anaeróbica

La DA es un tratamiento biológico que se realiza en ausencia de oxígeno para estabilizar la materia orgánica al mismo tiempo que produce biogás, una mezcla formada principalmente por metano (48 - 65%) y dióxido de carbono (36 - 41%) (Amy, et al., 2008). Además, genera una corriente acuosa que sale del biodigestor (digerido) está formada por materia orgánica no degradada,

biomasa microbiana y nutrientes como fósforo y nitrógeno, los cuales son recuperados en forma de estruvita (Lin, et al., 2017).

El proceso de DA incluye cuatro etapas diferentes: Hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. La hidrólisis implica la transformación de materiales orgánicos insolubles en el sustrato en sus derivados solubles. Las enzimas extracelulares de los microorganismos permiten la biodegradación de macromoléculas durante esta etapa, así la celulosa, hemicelulosa, polisacáridos, proteínas y grasas se convierten en aminoácidos, azúcares y ácidos grasos. (Khan, et al., 2018).

La acidogénesis es la etapa donde los compuestos solubles relativamente pequeños se difunden dentro de las células bacterianas a través de la membrana celular y posteriormente se fermentan anaeróbicamente. En esta fase se producen ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes, ácido láctico, CO_2 , H_2 , NH_3 y H_2S , así como material celular nuevo (Amy, et al., 2008).

En la acetogénesis, los ácidos y alcoholes orgánicos superiores producidos por acidogénesis se digieren adicionalmente por acetógenos para producir principalmente ácido acético, CO_2 y H_2 . Esta conversión está condicionada en gran medida por la presión parcial de H_2 en la mezcla (Appels, et al., 2008).

La etapa final, la metanogénesis se produce metano por dos grupos de arqueas metanogénicas. El primer grupo divide el acetato en metano y dióxido de carbono y el segundo grupo utiliza hidrogeno como donador de electrones y dióxido de carbono como aceptor para producir metano (Appels, et al., 2008).

1.2 Parámetros y variables del proceso de DA

El rendimiento y la estabilidad de los procesos de DA son sensibles a múltiples factores ambientales como el pH, la temperatura, AGV, la presencia de macro y micronutrientes e inhibidores (Lu, et al., 2018).

1.2.1 Sólidos Volátiles (SV). Los sólidos volátiles representan el peso perdido por ignición de la muestra calcinada a 550°C. Son los sólidos que se volatilizan durante la calcinación (APHA, 2005).

1.2.2 Temperatura. La temperatura tiene un efecto importante en las propiedades fisicoquímicas de los componentes que se encuentran en el sustrato de digestión. La temperatura influye en la tasa de crecimiento y el metabolismo de los microorganismos y por ende en la dinámica de la población en el reactor anaeróbico (Appels, et al., 2008).

1.2.3 pH. El pH es un factor fundamental que afecta la eficiencia de la producción de metano. El pH del sistema depende de la velocidad a la que se forman los intermedios durante la fermentación. Un pH fuera del rango 6.0 – 8.5 presenta un efecto tóxico para la población de metanógenos. La caída de pH por debajo de 6.6 afecta adversamente las actividades de los metanógenos mientras que un pH de 6.2 se vuelve tóxico (Zhai, et al., 2015).

1.2.4 Ácidos grasos volátiles (AGV). Los ácidos grasos volátiles (AGV), que incluyen principalmente el ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico, son los principales productos intermedios durante la DA de los desechos orgánicos. En general, los AGV producidos en el proceso anaeróbico podrían transformarse finalmente en CH₄ y CO₂ mediante acetógenos sintróficos y bacterias metanogénicas (Cunsheng, et al., 2014).

1.2.5 Alcalinidad total (AT). La alcalinidad es una medida de la capacidad de un sustrato para neutralizar ácidos. Los carbonatos y bicarbonatos son los compuestos que más contribuyen a la alcalinidad total y se forman por reacción del dióxido de carbono con la materia orgánica, además puede ayudar a mantener un pH neutro y en consecuencia evitar la inhibición de los AGV que puede ocurrir durante la DA (Dennehy, et al., 2016).

1.2.6 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 proceso (Amy, et al., 2008).

1.3 Actividad hidrolítica específica (AHE)

La AHE es una medida de la capacidad de la microbiota presente en el inóculo, para hidrolizar un polímero en condiciones óptimas de laboratorio. La AHE es medida a partir de una concentración determinada de un sustrato específico y en función de la máxima velocidad de consumo del sustrato o de la generación de productos (Mshandete, et al., 2005).

La AHE se determina en función de la máxima velocidad de generación de producción de metano, expresada como gramos DQO por unidad de biomasa como sólidos volátiles (SV) por unidad de tiempo ($\text{g DQO CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV día}^{-1}$).

1.4 Actividad metanogénica específica (AME)

La AME determina la capacidad que tienen las arqueas metanógenicas presentes en el inóculo, de transformar en metano un sustrato específico (acetato), medida en la zona de máxima actividad. La AME se expresa como la masa de sustrato en términos de demanda química de oxígeno que es convertida en metano, por unidad de biomasa y por unidad de tiempo (Hussain & Shashi, 2017).

1.5 Coeficiente de inhibición CI_{50}

La inhibición es un efecto bioestático que produce un deterioro reversible de la función de la biomasa, el potencial de inhibición de un compuesto se determina a partir de la reducción de la AME a medida que aumenta la concentración de inhibidor (Astals, et al., 2015). Un material puede ser juzgado como inhibitorio cuando causa un cambio adverso en la población microbiana o inhibición del crecimiento bacteriano. La inhibición suele estar indicada por una disminución de la tasa de producción de gas metano en el estado estacionario y la acumulación de ácidos orgánicos (Chen, et al., 2008). El potencial de inhibición se describe típicamente mediante un coeficiente de inhibición (CI_{50}), que representa la concentración a la que el AME es la mitad del máximo (Batstone, et al., 2002).

1.6 Potencial de biometanización (PBM)

El PBM es la cantidad de metano ($m^3 CH_4 kg^{-1} SV$) producido a partir de un peso dado de un determinado sustrato en condiciones anaeróbicas (Angelidaki, et al., 2009). El PBM permite evaluar la viabilidad del proceso anaerobio y proyectar su diseño en función de los parámetros operacionales: producción de metano y fracción de materia degradable (Jensen, et al., 2011).

1.7 Potencial de estruvita (PES)

La cristalización de nitrógeno y fósforo en forma de fosfato de magnesio y amonio hexahidrato ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$), también conocido estruvita (ES), es una de las técnicas que se pueden utilizar para eliminar y / o recuperar nutrientes en los efluentes como aguas residuales, agroindustriales y digerido obtenido de la DA (Hidalgo, et al., 2015).

La estruvita es un mineral cristalino inorgánico blanco que se precipita en sistemas acuosos por la interacción de los iones de magnesio, amonio y ortofosfatos, como se indica en la ecuación 1 (Stratful, et al., 2001).



La medida de la máxima producción de estruvita a partir de sustrato ricos en nitrógeno y fósforo se conoce como potencial de estruvita (PES) y constituye una variable fundamental para evaluar la viabilidad de aplicar la precipitación de este mineral como método de tratamiento de lodos.

2. Metodología

2.1 Etapa 1. Evaluación de la estabilidad de AR producida en PBB-Río Frío

Las muestras de AR fueron recolectadas de la PBB-Río Frío ubicada en el área metropolitana de Bucaramanga. Se tomaron muestras de 300 ml cada dos horas durante el día de mayor beneficio (sábado). Las muestras fueron almacenadas a 4°C para su preservación y traslado al laboratorio, homogenizadas y caracterizadas en términos de SV y la DQO según los protocolos establecidos por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 2005) método gravimétrico SM 2450E y método colorimétrico SM 5220D, respectivamente. El monitoreo se repitió durante 4 semanas conservando el día y las horas de muestreo. De esta manera se estableció la variación de la carga orgánica de las AR horaria y semanal, durante un mes de operación de la planta.

2.2 Etapa 2. Caracterización microbiológica del inóculo

Como inóculo se utilizó LEB de un biodigestor activo ubicado en la finca Marcella en Girón-Santander, a una (altitud de 959 m.s.n.m, Lat N 7°01'0.07' Long. W 73°08'13.3''). Se le determinaron SV, DQO, AGV, pH y NH_4^+ . La AT y los AGV fueron cuantificados por titulación de acuerdo con el protocolo propuesto por Purser y col (Jobling, et al., 2014). El pH se determinó mediante el método potenciométrico SM 4500B (APHA, 2005) y el contenido de NH_4^+ se

determinó mediante colorimetría utilizando los protocolos 4500-NH₃ y 4500-P E respectivamente (APHA, 2005).

2.2.1 Prueba de la actividad metanogénica específica (AME) del inóculo. Para determinar la AME del LEB se utilizó como sustrato una solución de 200g L⁻¹ de acetato de sodio a una relación inóculo/sustrato (RIS) de 5 en términos de los SV, siguiendo el protocolo establecido por Astals et al., (2015). Los ensayos se realizaron por triplicado en digestores Batch de 100 ml con 60 ml de volumen de trabajo e incubadas a condiciones mesofílicas (37 ± 2°C). Tres digestores contenían una cantidad designada de inóculo y sustrato. Adicionalmente, se prepararon blancos (solo inóculo) para restar la producción endógena del inóculo. Para asegurar anaerobiosis, los digestores se gasearon con nitrógeno y se sellaron con tapones de butilo y agrafe de aluminio. El volumen de CH₄ producido se midió cada 12 horas por desplazamiento alcalino (ver apéndice A) y convertido a condiciones estándar de presión y temperatura mediante la ecuación 2.

$$V_o = V \cdot \frac{(p - p_w) \cdot T_o}{p_o \cdot T} \quad (2)$$

Donde:

V_o: volumen de gas seco en condiciones normales [m³]

V: volumen registrado de biogás [m³]

p: presión ambiente en el momento de la lectura [Pa]

p_w: presión de vapor en función de la temperatura ambiente [Pa]

T_o: temperatura normal [273.15 K]

p_o: presión normal [101,325 Pa]

T: temperatura ambiente [K]

Los resultados de las mediciones fueron reportados en g DQO CH₄ g⁻¹ SV del inóculo, teniendo en cuenta que 350 ml de CH₄ a condiciones estándar corresponde a 1 g de DQO. A partir de la

gráfica del cambio dinámico de la DQO versus el tiempo, mediante la determinación de la pendiente se obtiene la AME ($\text{gDQO CH}_4 \text{ g}^{-1}\text{SVinóculo día}^{-1}$).

2.2.2 Prueba de la actividad hidrolítica específica (AHE) del inóculo. Las pruebas se realizaron en botellas de 100 ml (volumen de trabajo de 60 ml) se determinó de acuerdo con el método de (Yap, et al., 2018). Se utilizó como sustrato celulosa microcristalina (CAS 9004-34-6) (por su composición bien definida y su propiedad de polímero implica todos los pasos importantes de degradación de la DA, incluida la hidrólisis) a una RIS de 5 en términos de SV. Al igual que las pruebas de AME, se prepararon blancos y pruebas destructivas para determinar la concentración diaria de la DQO soluble. Además, se midió el volumen de metano producido cada 24 horas por desplazamiento alcalino, estas mediciones fueron reportadas en $\text{g DQO CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV}$ del inóculo, teniendo en cuenta que 350 ml de CH_4 a condiciones estándar corresponde a 1 g de DQO. Los datos se graficaron con respecto al tiempo y se determinó como AHE ($\text{g DQO CH}_4 \text{ g}^{-1}\text{SVinóculo día}^{-1}$) la pendiente de la zona lineal.

2.2.3 Determinación del CI50 en la inhibición por amoníaco. Para determinar la tolerancia del LEB al NH_3 , se evaluó su AME sometiéndolo a diferentes concentraciones, según la metodología de Astals et al. (2015). Los ensayos de inhibición se realizaron en digestores de 100 ml (volumen de trabajo 60 ml) a condiciones mesofílicas. Cada digestor se llenó con una cantidad designada de inóculo, sustrato (acetato de sodio) a RIS 5 e inhibidor cloruro de amonio (NH_4Cl) en concentraciones de: 0 (control), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 3, 5 y 7 g L^{-1} . Una vez agregado el NH_4Cl se determinó el pH y la concentración de NH_4^+ en la solución (Inóculo+ sustrato+ NH_4Cl), estas mediciones se realizaron al inicio y final de la prueba.

La relación entre N-NH₃ (nitrógeno como amoníaco) y N- NH₄⁺ (nitrógeno como amonio) se determinó de acuerdo al protocolo de Astals, *et al.*, (2018) a partir de la ecuación 3.

$$N-NH_3 = \frac{K_a \cdot TAN \cdot \gamma_1}{K_a \cdot \gamma_1 + 10^{-pH}} \quad (3)$$

Donde:

TAN: nitrógeno amoniacal total [N-NH₃ + N-NH₄⁺] [mg L⁻¹]

γ_1 : coeficiente de actividad

K_a: constante de equilibrio ácido-base para el nitrógeno amoniacal a 37°C [1.27·10⁻⁹].

pH: promedio entre el inicial y el final.

Así, el coeficiente de inhibición CI₅₀ se determinó como la concentración de N-NH₃ a la cual el AME medida se reduce a un 50% con respecto al control.

2.3 Etapa 3. Caracterización bioquímica del sustrato

Dada la variabilidad de la carga orgánica, las AR como sustrato fueron utilizadas en las pruebas de DA fueron muestras compuestas tomadas durante un día completo de operación de la PBB-Río Frío. se les determinaron SV, DQO, AGV, AT, pH, PO₄³⁻ y NH₄⁺. La AT y los AGV fueron cuantificados por titulación de acuerdo con el protocolo propuesto por Purser y col (Jobling , et al., 2014). El pH se determinó mediante el método potenciométrico SM 4500B (APHA, 2005) y el contenido de PO₄³⁻ y NH₄⁺ se determinó mediante colorimetría utilizando los protocolos 4500-NH₃ y 4500-P E respectivamente (APHA, 2005).

2.3.1 Determinación del Potencial de Biometanización (PBM) de las AR. Los ensayos de biodegradabilidad anaeróbica de las AR se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Holliger *et al.*, (2016). Los experimentos se realizaron por triplicado en digestores de 100 ml (volumen de trabajo de 60 ml), a un RIS de 2 de acuerdo con (Jensen, et al., 2011). Tres digestores contenían (LEB + AR) y tres denominados blancos donde las AR fueron reemplazadas por agua

destilada (LEB + agua destilada). Los digestores se lavaron con gas de nitrógeno durante un minuto para garantizar las condiciones de anaerobiosis, se sellaron con un tapón de butilo y agraes de aluminio y se almacenaron en incubadoras a temperatura controlada ($37 \pm 1^\circ\text{C}$).

Para verificar que el montaje de la prueba fue correcto se realizaron controles positivos para evaluar la respuesta del LEB frente a un sustrato conocido. El sustrato utilizado fue celulosa microcristalina (CAS 9004-34-6) estándar. La producción de CH_4 se midió diariamente hasta que el rendimiento de metano acumulado durante tres días consecutivos fuera menor al 1% (Holliger, et al., 2016). Los volúmenes se reportaron acumulados como $\text{m}^3 \text{CH}_4 \text{kg}^{-1} \text{SV}$ de sustrato agregado al digestor. Para analizar la estabilidad del proceso se prepararon muestras destructivas a las cuales se les midió SV, N-NH_3 , pH, AGV/AT (Castro, et al., 2016).

2.4 Etapa 4. Potencial de recuperación de nutrientes (N y P)

En esta etapa se determinó el Potencial de Estruvita (PES), evaluando el contenido de amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}) en el digerido mediante el método fotométrico (APHA, 2005). A partir de estos datos se determinó que el ion limitante para la precipitación de estruvita es el PO_4^{3-} y se realizó el cálculo con base a este según la ecuación 4, considerando la estequiometría de la reacción (ecuación 1) (Amaya & Jaimes, 2017).

$$\text{PES} = \frac{V_{\text{digerido}}}{V_{\text{AR añadido}}} \cdot C_{\text{limitante}} \cdot \frac{0.245 \text{ kg ES}}{PM_{\text{limitante}}} \quad (4)$$

Donde:

$PM_{\text{limitante}}$: Peso molecular del ion limitante $[0.018 \text{ kg NH}_4^+]$ o $[0.095 \text{ kg PO}_4^{3-}]$

$C_{\text{limitante}}$: Concentración del ion limitante $\left[\frac{\text{kg NH}_4^+}{\text{m}^3 \text{digerido}} \right]$ o $\left[\frac{\text{kg PO}_4^{3-}}{\text{m}^3 \text{digerido}} \right]$

$V_{\text{AR añadido}}$: Volumen de AR $[5 \cdot 10^{-5} \text{m}^3 \text{AR}]$

V_{digerido} : Volumen del digerido $[6 \cdot 10^{-5} \text{m}^3 \text{digerido}]$

PES: Potencial de Estruvita del digerido $\left[\frac{\text{kg ES}}{\text{m}^3 \text{AR}} \right]$

En la tabla 1 se presenta el resumen de las variables utilizadas en la metodología indicando las unidades y el método empleado.

Tabla 1.

Resumen de variables

Variable	Sigla	Unidades	Método	Apéndice
Sólidos volátiles y totales	SV	kg m^{-3}	(APHA, 2005)	B
	ST			
Demanda química de oxígeno	DQO	kg m^{-3}	(APHA, 2005)	C
Ácidos grasos volátiles	AGV	$\text{kg CH}_3\text{COOH m}^{-3}$	(Jobling , et al., 2014)	D
Alcalinidad total	AT	$\text{kg CaCO}_3 \text{m}^{-3}$	(Jobling , et al., 2014)	D
pH	pH	-	(APHA, 2005)	E
Actividad metanogénica específica	AME	$\text{gDQO g}^{-1}\text{SV}_{\text{inóculo}} \text{día}^{-1}$	(Astals, et al., 2015)	F
Actividad hidrolítica específica	AHE	$\text{gDQO g}^{-1}\text{SV}_{\text{inóculo}} \text{día}^{-1}$	(Yap, et al., 2018)	G
Coeficiente de inhibición	CI ₅₀	$\text{NH}_3 \text{mg N L}^{-1}$	(Astals, et al., 2018)	H
Potencial de biometanización	PBM	$\text{m}^3 \text{CH}_4 \text{kg}^{-1}\text{SV}$	(Holliger, et al., 2016)	I

Potencial de estruvita	PES	kg ES m ⁻³ AR	(Amaya & Jaimes, 2017)	-
Amonio	NH ₄ ⁺	kg m ⁻³	(APHA, 2005)	-
Fosfato	PO ₄ ³⁻	kg m ⁻³	(APHA, 2005)	-

3. Resultados

3.1 Monitoreo de las aguas residuales

En la figura 2 y 3 se presentan los resultados del monitoreo del contenido de materia orgánica para cuatro semanas, conservando la hora para cada evento de muestreo. La figura 2 muestra el comportamiento de SV, los cuales variaron en el rango de 2.16 y 8.87 kg m⁻³ y la figura 3 corresponde a la DQO con mediciones que fluctuaron entre 2.16 y 8.50 kg m⁻³.

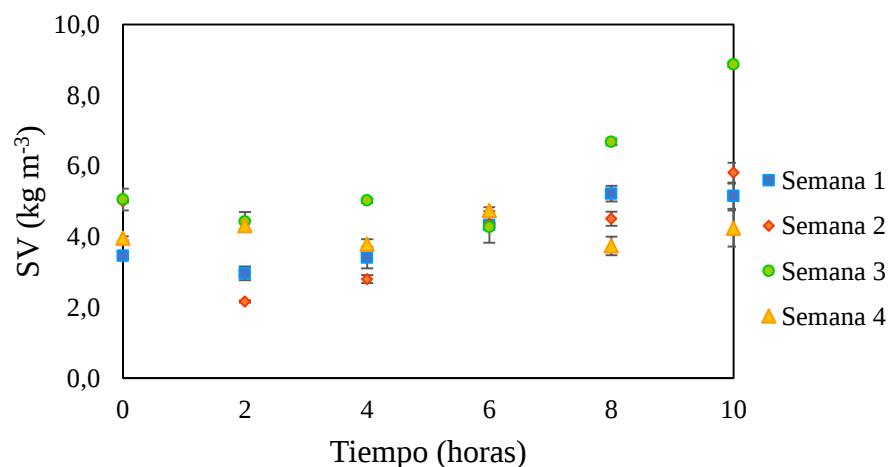


Figura 2. Variación de los Sólidos Volátiles de las AR

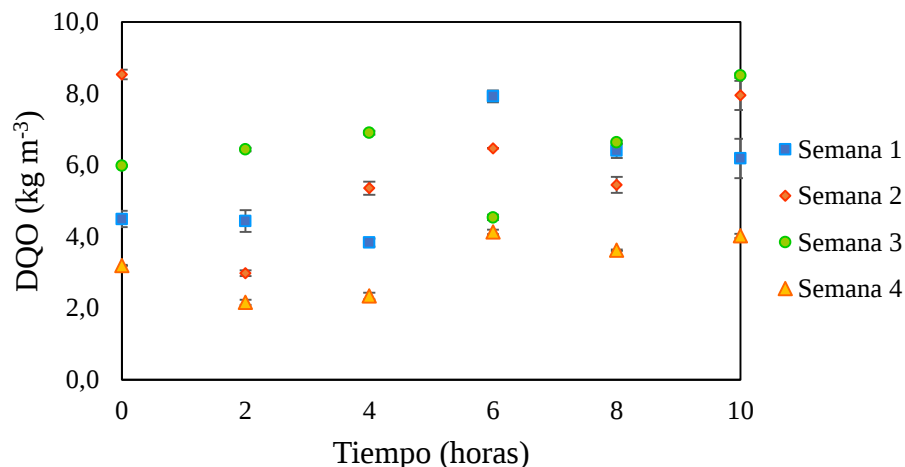


Figura 3. Variación de la Demanda Química de Oxígeno de las AR

Tanto los SV como la DQO presentaron una gran variación semanal, así como con respecto al tiempo de operación. Esto debido a que la dosificación del agua potable en la planta se realiza de forma manual. Sin embargo, se evidencia que la carga orgánica al finalizar fue levemente superior a la inicial, posiblemente dado que al finalizar la jornada de trabajo se realiza una limpieza más exhaustiva, removiendo con mayor vigorosidad la materia orgánica del suelo de la zona de beneficio. En este sentido, una futura aplicación de un sistema de DA en la PBB-Río Frío requerirá de tanques homogeneizadores para reducir las fluctuaciones de la carga orgánica.

3.2 Caracterización fisicoquímica del inóculo

Los parámetros fisicoquímicos del LEB presentados en la tabla 1, evidencian que este posee un pH cercano a la neutralidad, AGV menores a $1 \text{ kgCH}_3\text{COOH m}^{-3}$ y una concentración de amonio inferior a $0.015 \text{ kg N m}^{-3}$, por lo tanto, el LEB posee las condiciones adecuadas para su uso como inóculo dado que se encuentra en los rangos de referencia (Holliger, et al., 2016).

Tabla 2.

Caracterización fisicoquímica del LEB

Parámetro	Unidad	LEB
SV	kg m ⁻³	45.9 ± 0.27
AGV	kg CH ₃ COOH m ⁻³	0.36 ± 0.00
pH	-	7.2 ± 0.02
N-NH ₃	kg m ⁻³	0.0013

3.2.1 Determinación de la actividad metanogénica específica (AME). Los resultados del AME se presentan en la figura 4. Se puede apreciar que el comportamiento de la producción de CH₄ se acercó a la linealidad, demostrando una actividad constante de los microorganismos. A partir de la zona lineal mostrada el valor del AME para LEB fue 0.035 g DQO g⁻¹ SV_{inóculo} día⁻¹. Este valor cae dentro del rango reportado para este tipo de inóculo (0.02 y 0.04 g DQO g⁻¹ SV_{inóculo} día⁻¹) (Castro, et al., 2017), corroborando su correcto desempeño.

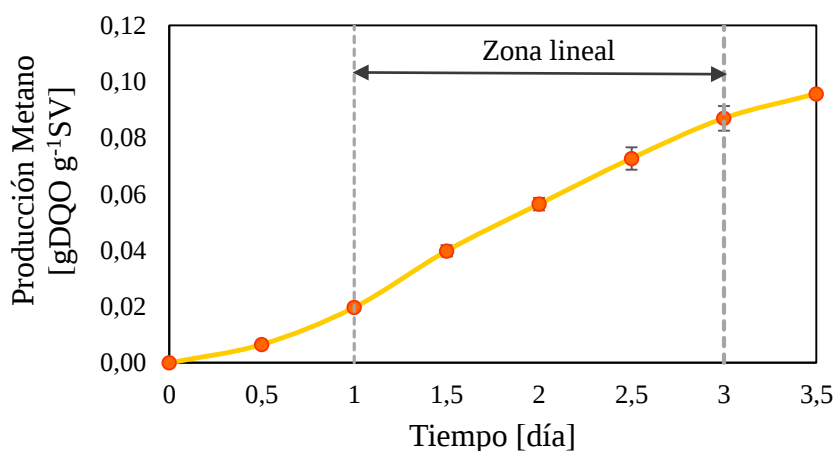


Figura 4. Curva de producción de metano acumulada de los ensayos de la AME

3.2.2 Determinación de la actividad hidrolítica específica (AHE). La figura 5 presenta la degradación de la DQO de la celulosa durante la prueba de AHE del LEB. En 15 días de prueba la DQO de la celulosa pasó de 0.6579 g a 0.0297 g, demostrando que el LEB tuvo la capacidad de degradar el 96% de este sustrato. El 93% de la DQO de la celulosa (0.61368 g) se transformó completamente a CH_4 y el restante (3%) se mantuvo como DQO soluble.

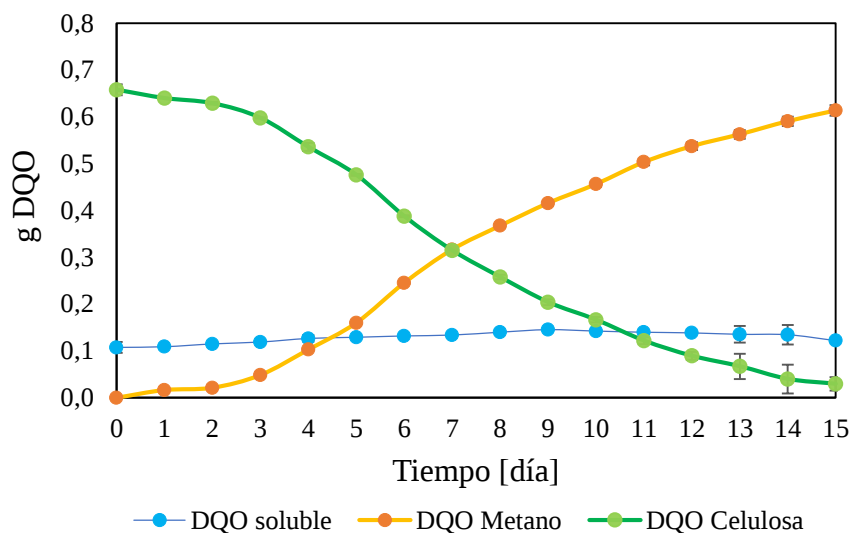


Figura 5. Dinámica de la DQO en la actividad hidrolítica específica del LEB

En la figura 6 se aprecia la producción acumulada de CH_4 en la prueba de la AHE. A partir de la pendiente de la gráfica se estimó la AHE en $0.019 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV día}^{-1}$. Así, la AHE corresponde al 54% del valor del AME, indicando que la hidrólisis es la etapa limitante para este tipo de inóculo. El valor de AHE para el LEB es inferior al encontrado por Quintero et al. (2012) ($0.039 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV día}^{-1}$) dado que en ese estudio, se utilizaron aditivos como cisteína, NaHCO_3 y Na_2S , los cuales no fueron considerados para el presente trabajo.

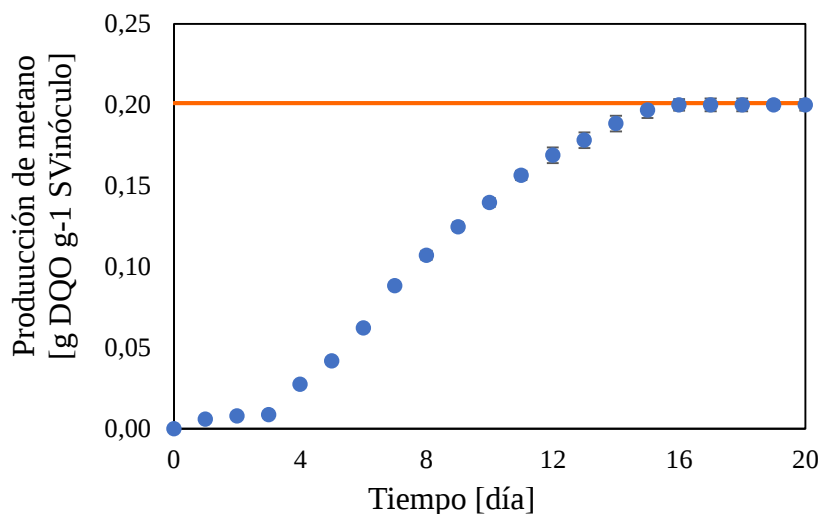


Figura 6. Curva de metano acumulativa del ensayo de la AHE para el LEB

3.2.3 Prueba del coeficiente de inhibición. Los resultados de las pruebas de AME con cloruro de amonio como inhibidor se muestran en la figura 7. El LEB se inhibió al aumentar la concentración de nitrógeno amoniacal; dado que la curva tiene una forma cóncava. Los valores del AME variaron de 0.022 a 0.055 g DQO g⁻¹ SV día⁻¹. El valor de CI₅₀ fue de 19.5 NH₃ mg N L⁻¹ calculado por regresión lineal con un coeficiente de determinación de R² > 0.99. Por lo anterior, se puede concluir que el LEB es resistente a la concentración de amonio máxima 18.20 NH₃ mg N L⁻¹ durante el proceso de la DA.

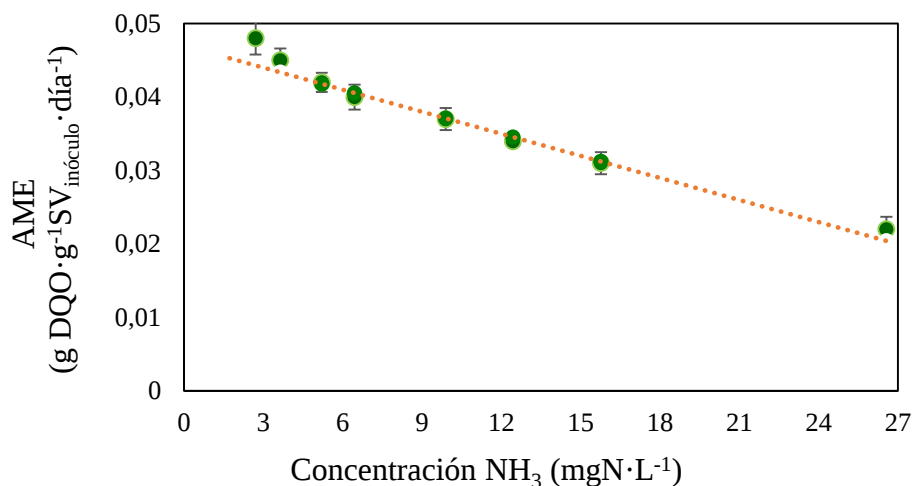


Figura 7. Prueba de inhibición de N-NH_3 en el inóculo de LEB

3.3 Caracterización fisicoquímica del sustrato

Con respecto al sustrato, en la tabla 3 se puede observar que la relación SV/ST para las aguas rojas es del 89%, lo cual indica su disponibilidad de materia degradable para la producción de biogás, dado que al analizar la DQO, se encuentra en el rango de 5 - 10 kg m^{-3} reportado por Jensen, *et al.*, (2014) y Gannoun, *et al.*, (2009), respectivamente. Así mismo, las AR poseen proporciones importantes de proteínas cercanos a los 1.97 – 3.6 kg m^{-3} reportados por la literatura y lípidos en el rango de 0.04 - 0.41 kg m^{-3} (Gannoun, *et al.*, 2009).

Por su parte el pH de las AR se encuentra en el rango de 6.24 – 7.85, el cual se considera óptimo para el proceso de DA (Castro, *et al.*, 2016). No obstante, la capacidad buffer, relación AGV/AT, es superior a 0.4, por lo cual se podrían esperar variaciones de pH durante el proceso de DA, generando algunas inestabilidades (Callaghan, *et al.*, 2002). Adicionalmente, a pesar de que los valores de NH_3 son bajos, estos aumentarán dada la amonificación del nitrógeno de las proteínas, el cual se ha encontrado que varía entre (54 y 75%) (Bayr, *et al.*, 2012); (Pitk, *et al.*, 2014). Por otra parte, se evidencia la disponibilidad de fósforo, en forma de PO_4^{3-} , para la obtención de estruvita.

Tabla 3.

Caracterización fisicoquímica de las AR

Parámetro	Unidad	AR
SV	kg m ⁻³	4.29 ± 0.21
ST	kg m ⁻³	4.85 ± 0.1
DQO	kg m ⁻³	8.53 ± 0.22
AGV	kg CH ₃ COOH m ⁻³	0.4 ± 0.00
AT	kg CaCO ₃ m ⁻³	0.66 ± 0.00
pH	-	7.7 ± 0.014
N-NH ₃	kg m ⁻³	0.008
P-PO ₄	kg m ⁻³	0.00057
Carbohidratos	kg m ⁻³	0.06
Proteínas	kg m ⁻³	0.97
Lípidos	kg m ⁻³	0.35

3.3.1 Evaluación del Potencial de Biometanización (PBM) de las AR. En la figura 8 se muestra la estabilidad del proceso anaeróbico de las AR. En los cinco primeros días de la digestión se observó un descenso del pH dado la producción inicial de los AGV. No obstante, el pH posteriormente se incrementó de nuevo, manteniendo el rango entre 7.5 y 7.8, lo cual aumentó la alcalinidad del sistema hasta valores tales que la capacidad buffer (AGV/AT) fue en promedio 0.27. Este valor se encuentra entre el rango reportado para DA estables (0.2 – 0.4) (Díaz Báez, et al., 2002) sin riesgo de acidificación. Por lo tanto, a pesar de que la capacidad buffer de las AR por sí sola no es adecuada, la adición del inóculo y el NH₃ producido en la DA, permitieron equilibrar los AGV y la AT mejorando la estabilidad sin requerir aditivos para controlar el pH.

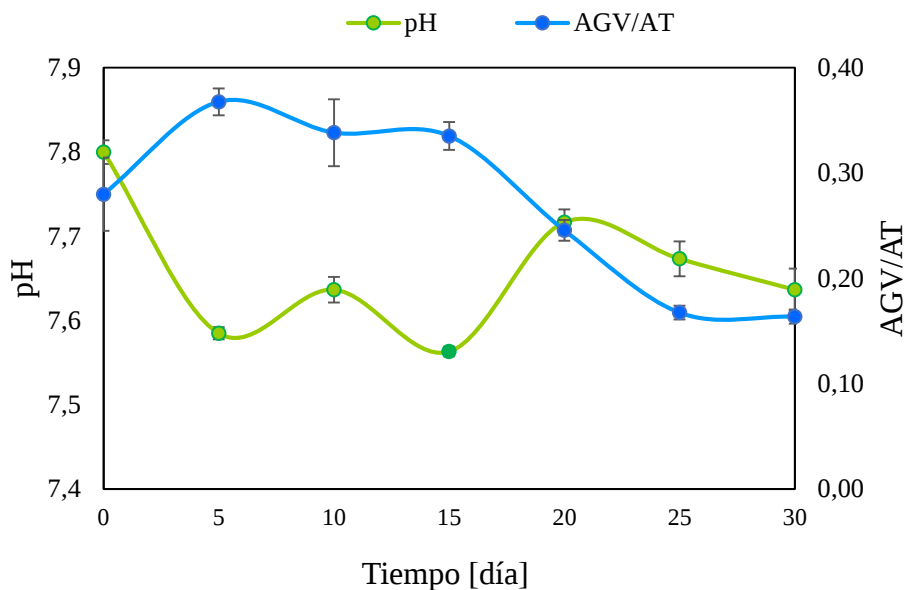


Figura 8. Relación de AGV/AT y pH

En la figura 9 se puede ver que una vez la concentración de NH_3 incrementó a su valor máximo ($18.20 \text{ mg N L}^{-1}$) y se reduce hacia el final del proceso a $12.25 \text{ mg N L}^{-1}$. Esta reducción puede estar relacionada con adsorción del NH_3 en la biomasa o la precipitación de estruvita en el digestor (Chen, et al., 2008). Con respecto a la inhibición, en ningún caso la concentración de NH_3 supera el valor del CI_{50} .

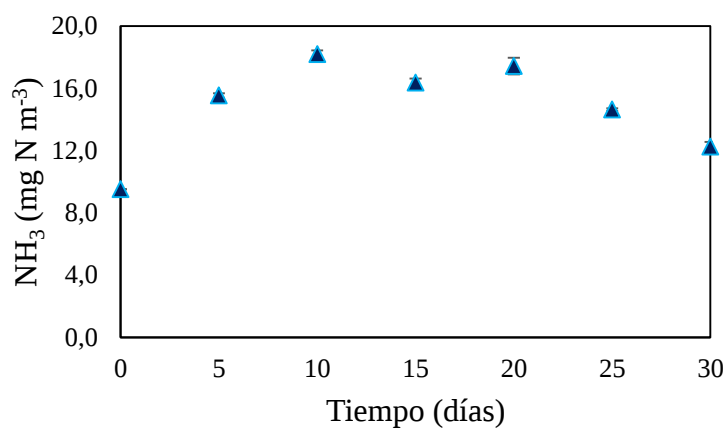


Figura 9. Variación de N-NH_3 y pH

En la figura 10 se observa la curva del PBM para las AR y el control, ambos ajustados a condiciones estándar. En total la prueba duró 45 días.

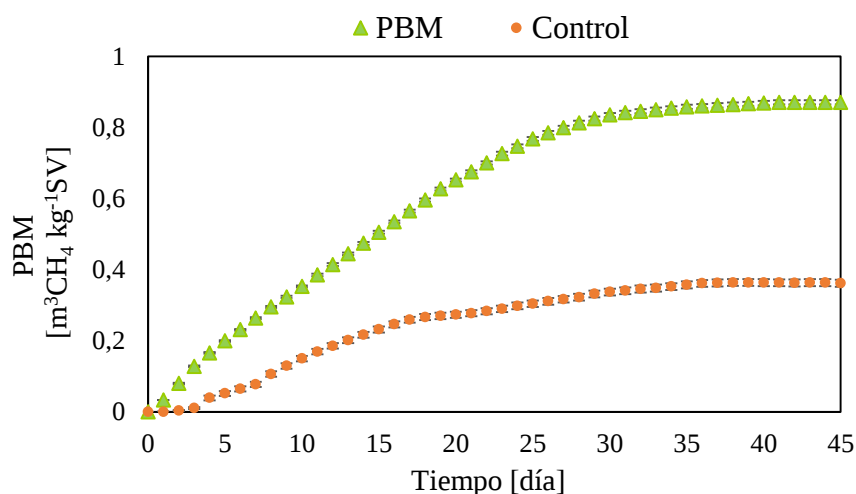


Figura 10. Potencial de Biometanización de las AR y control

La concentración de materia orgánica fácilmente biodegradable presente en las AR permitió que la producción de CH_4 iniciara a partir del día 1. De esta manera, se logró una producción acumulada de $0.87 \text{ m}^3\text{CH}_4 \text{ kg}^{-1}\text{SV}$. Este valor fue el doble al reportado por Jensen et al., (2014) para el mismo tipo de aguas y $0.73 \text{ m}^3\text{CH}_4 \text{ kg}^{-1}\text{SV}$ para aguas residuales de beneficio bovino (Castro, et al., 2016). La veracidad de la prueba se comprobó con el PBM de la celulosa (control) cuyo valor fue el 94% de su valor teórico ($0.37 \text{ m}^3\text{CH}_4 \text{ kg}^{-1}\text{SV}$) (Jensen, et al., 2014).

Por su parte, como resultado del proceso de degradación de la DA de las AR se alcanzaron remociones de 45.51% de SV y 57.45% de DQO, estos porcentajes de remoción están acordes a los reportados por Castro, et al., (2016) (45% SV y 48% DQO) para aguas residuales combinadas. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento de las AR por separado permite una mayor remoción de materia orgánica y un alto potencial de biometanización.

3.4 Determinación del Potencial de estruvita (PES) del digerido

En la figura 11 se muestra la concentración de NH_4^+ y PO_4^{3-} al inicio y al final del proceso de DA de las AR. Se observa que la concentración del NH_4^+ incrementó de 0.16 a 0.31 kg m^{-3} debido a la degradación de compuestos nitrogenados como las proteínas, durante el proceso de biodegradación en forma de amonio y amoníaco libre.

Además, se evidencia que en el efluente resultante presentó un mayor contenido de NH_4^+ superando el de PO_4^{3-} . Es decir que para la precipitación de estruvita el PO_4^{3-} se consumiría en su totalidad (0.088 kg ES m^{-3}), lo cual lo convierte en el ion limitante para el proceso, recuperando el 48.39% del NH_4^+ .

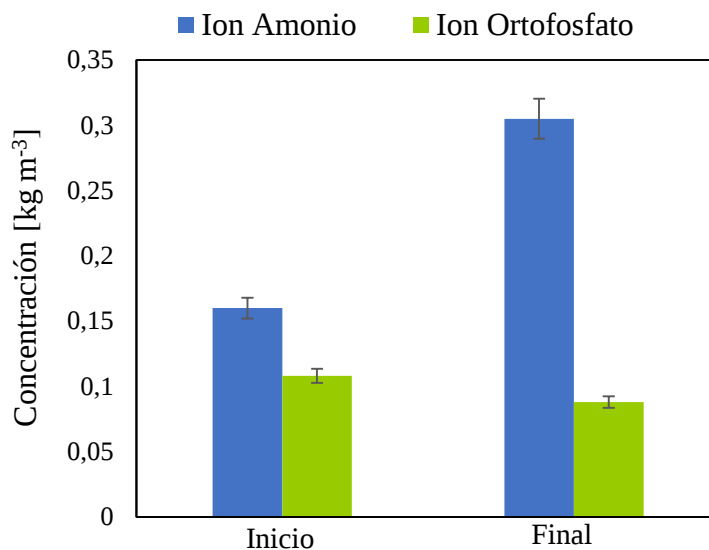


Figura 11. Contenido de ion amonio y ortofosfato de la carga inicial y final

El PES del digerido obtenido fue de 0.27 kg ES m^{-3} AR el cual presenta un valor cercano al reportado por la literatura (0.24 – 1.37 kg ES m^{-3}) (Jensen, et al., 2014) (Álvarez & Buitrago, 2018). Esta diferencia se atribuye a que el potencial que reporta dichos autores esta dado para aguas residuales de beneficio bovino. Por tanto, se evidencia el aumento de la disponibilidad de nutrientes durante la DA (Jensen, et al., 2014) (Kataki, et al., 2016).

4. Conclusiones

La biodegradabilidad anaeróbica de las aguas rojas de la planta de beneficio Río Frío presenta un PBM de $0.87 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ SV}$ con remociones de DQO de 57.45% y SV de 45.51%. El valor de PBM de las AR de la PBB-Río Frío fue superior al reportado para mezclas de aguas residuales del beneficio animal; y comparable con el PBM de residuos sólidos de este proceso. En este sentido, el tratamiento individual de las aguas rojas presenta ventajas desde el punto de vista ambiental (remoción de carga orgánica).

La caracterización microbiológica del lodo de estiércol bovino demuestra que la AHE es el 54% de la AME, por tanto, la hidrólisis es la etapa limitante para este tipo de inóculo. Por otra parte, el lodo de estiércol bovino presenta una inhibición del 50% de su AME para concentraciones de NH_3 del $19.5 \text{ NH}_3 \text{ mg N L}^{-1}$. Dado que durante la DA de las aguas rojas la concentración de NH_3 fue de $18.20 \text{ NH}_3 \text{ mg N L}^{-1}$, la inhibición del inóculo no supero el 46% por tanto, no se observaron efectos apreciables durante la prueba.

El digerido de la digestión anaeróbica de las AR, presenta un potencial de estruvita de $0.27 \text{ kg ES m}^{-3} \text{ AR}$, con una recuperación completa del PO_4^{3-} y una remoción de 8.7% de NH_4^+ . Así las cosas, la digestión anaeróbica es una tecnología adecuada para la recuperación de nutrientes.

5. Recomendaciones

Las aguas residuales rojas de la planta de beneficio Río Frío presenta una gran variabilidad de carga orgánica debido a la dosificación manual de agua potable durante el proceso. Por lo anterior, para una futura implementación del sistema de DA en la planta Río Frío se recomienda el uso de un tanque homogeneizador para disminuir las perturbaciones al proceso.

Se recomienda profundizar el análisis de la inhibición de forma separada para las aguas verdes, de lavado estomacal y de corral generadas en la planta de beneficio bovino Río Frío, teniendo en cuenta, que estas aguas presentan características diferentes entre sí.

Para una mejor aproximación a condiciones de escala real, se recomienda implementar el proceso de digestión anaeróbica de las AR en reactores tubulares a escala laboratorio.

Referencias bibliográficas

Ahm, M. I. y otros, 2014. Anaerobic digestion of waste from a slaughterhouse. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), pp. 1317-1320.

Álvarez, L. & Buitrago, E., 2018. *Capacidad de biodegradabilidad anaerobica y potencial de estruvita de las aguas verdes generadas en la planta de beneficio Rio Frío (Tesis de pregrado)*, Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga.

Amaya Palencia, M. P. & Jaimes Carrillo, L. V., 2017. *Potencial Anaeróbico del lactosuero: biogás y recuperación de nutrientes (N y P) (Tesis de pregrado)*, Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga.

Amy, G. y otros, 2008. Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Desing. En: J. B. Lier, N. Mahmoud & G. Zeeman, edits. *Anaerobic Wastewater Treament*. Primera ed. Cambridge: IWA Publising, pp. 415-456.

Angelidaki, I. y otros, 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: : a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*, pp. 927-934.

Angelidaki, I. & Hejnfelt, A., 2009. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. *Biomass and Bioenergy*, 33(8), pp. 1046-1054.

APHA, A. & W., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater.. *American Public Health Association*.

Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J. & Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, pp. 756-761.

ASSOCIATION, A. P. H., 2005. *APHA Method 4500-P: Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*. Washington: Arnold E. Greenberg, APHA.

Astals, S., Batstone, D. J., Tait, S. & Jensen, P. D., 2015. Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Research*, pp. 208-215.

Astals, S. y otros, 2018. Characterising and modelling free ammonia and ammonium inhibition in anaerobic systems. *Water Research*, pp. 127-135.

Batstone, D. y otros, 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, 45(10), pp. 65-73.

Bayr, S., Rantanen, M., Kaparaju, P. & Rintala, J., 2012. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of rendering plant and slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*, Volumen 104, pp. 28-36.

Ben-Belhassen, B. & Abbrassian, A., 2018. Perspectivas Alimentarias. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, pp. 1-9.

Bennett, A., 2016. *Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html> [Último acceso: 2 Abril 2019].

Callaghan, F., Wase, D., Thayanithy, K. & Forster, C., 2002. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy*, 22(1), pp. 71-77.

Castro, L., Escalante, H., Gómez-Serrato, O. J. & Jiménez-Piñeres, D. P., 2016. Analysis of methanogenic and energetic potential from slaughterhouse wastewater using anaerobic digestion. *Dyna*, Volumen 83, pp. 41-49.

Castro, L. y otros, 2017. Low cost digester monitoring under realistic conditions: Rural use of biogas and digestate quality. *Bioresource Technology*, Volumen 28, pp. 311-317.

Chaux, G., Rojas, G. & Bolaños, L., 2009. Cleaner production and feasibility of biological treatment for slaughterhouses effluents in small towns. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, pp. 102-114.

Chen, Y., Cheng, J. & Creamer, K., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, Volumen 99, pp. 4044-4064.

Cunsheng, Z., Haijia, S., Jan, B. & Tianwei, T., 2014. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 38, pp. 383-392.

Dennehy, C. y otros, 2016. Synergism and effect of high initial volatile fatty acid concentrations during food waste and pig manure anaerobic co-digestion. *Waste Management*, pp. 173-180.

Díaz Báez, M. C., Espitia Vargas, S. E. & Molina Pérez, F., 2002. *Digestión Anaerobia, una aproximación a la tecnología*. Primera ed. Bogotá: ISBN 958-701-196-1.

Fedegan, 2018. *Cifras de referencia del sector ganadero colombiano*. [En línea] Available at: www.fedegan.org.co

Gannoun, H. y otros, 2009. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of biologically pretreated abattoir wastewaters in an upflow anaerobic filter. *Journal of hazardous materials*, Volumen 170, pp. 263-271.

Hidalgo, D. y otros, 2015. Resource recovery from anaerobic digestate: struvite crystallisation versus ammonia stripping. *Desalination and Water Treat*, Volumen 57, pp. 2626-2632.

Holliger, C. y otros, 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science & Technology*, 74(11), pp. 2515-2522.

Hussain, A. & Shashi, K. D., 2017. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Applied Water Science*, pp. 532-542.

Jain, S. y otros, 2015. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, pp. 142-154.

Jensen, P. D., Sullivan, T., Carney, C. R. & Batstone, D. J., 2014. Analysis of the potential to recover energy and nutrient resources from cattle slaughterhouses in Australia by employing anaerobic digestion. *Applied Energy*, pp. 23-31.

Jensen, P. D. y otros, 2015. Anaerobic membrane bioreactors enable high rate treatment of slaughterhouse wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, pp. 132-141.

Jensen, P., Ge, H. & Batstone, D., 2011. Assessing the role of biochemical methane potential tests in determining anaerobic degradability rate and extent. *Water science and technology*, 64(4), pp. 880-886.

Jobling, B. y otros, 2014. An improved titration model reducing over estimation of total volatile fatty acids in anaerobic digestion of energy crop, animal slurry and food waste.. *Water Environment Research*, pp. 162-170.

Kataki, S., West, H., Clarke, M. & Wai Chong, L., 2016. Phosphorus recovery as struvite:Recent concerns for use of seed, alternative Mg source, nitrogen conservation and fertilizer potencial. *Resources,Conservation and Recycling*, Volumen 107, pp. 142-156.

Khan, M. y otros, 2018. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. *Renewable Energy*, pp. 754-768.

Kumar Khanal, S., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: principles and applications*. Primera ed. Ames, Iowa: Office.

Lin, X., Han, Z., Yu, H. & Ye, Z., 2017. Struvite precipitation from biogas digestion slurry using a two-chamber electrolysis cell with a magnesium anode. *Journal of Cleaner Production*, Volumen 174, pp. 1598-1607.

Lombardi, M. & Tricase, C., 2009. State of the art and prospects of Italian biogas production from animal sewage: Technical-economic considerations. *Renawable Energy*, pp. 477-485.

Lu, Y. y otros, 2018. Relationship between microbial community, operational factors and ammonia inhibition resilience in anaerobic digesters at low and moderate ammonia background concentrations. *New Biotechnology*, pp. 23-30.

Mata-Álvarez, J. y otros, 2014. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and sustainable energy reviews*, pp. 412-427.

Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible, 2018. Resolución No. 0883 18 Mayo 2018. En: Bogotá: Minambiente, pp. 1-13

Moukazis, I., Frantseska, M. P. & Gidakos, E., 2018. Slaughterhouse by-products treatment using anaerobic digestion. *Waste Management*, Volumen 71, pp. 652-662.

Mshandete, A. y otros, 2005. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. *Water Research*, pp. 1569-1575.

Pitk, P. y otros, 2014. Mesophilic co-digestion of dairy manure and lipid rich solid slaughterhouse wastes: Process efficiency, limitations and floating granules formation. *Bioresource Technology*, Volumen 166, pp. 168-177.

Planta Ecológica de Beneficio Animal Río Frío S.A.S, 2013. [En línea] Available at: <http://www.frigorificoriofrio.com/secciones-37-s/info-de-organizacion-.htm> [Último acceso: 2019 Abril 2019].

Quintero, M. y otros, 2012. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. *Bioresource Technology*, Volumen 108, pp. 8-13.

Rodríguez Martínez, J. y otros, 2002. Kinetics of anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in batch and upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology*, Volumen 85, p. 235-241.

Stratful, I., Scrimshaw, M. & Lester, J., 2001. Conditions influencing the precipitation of magnesium ammonium phosphate. *Water Research*, 35(17), pp. 4191-4199.

Wang, H., Zhang, Y. & Angelidaki, I., 2016. Ammonia inhibition on hydrogen enriched anaerobic digestion of manure under mesophilic and thermophilic conditions. *Water Research*, pp. 314-319.

Yap, S. D. y otros, 2018. Humic acid inhibition of hydrolysis and methanogenesis with different anaerobic inocula. *Waste Management*, Volumen 80, pp. 130-136.

Zhai, N. y otros, 2015. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. *Waste Management*, pp. 126-131.

Apéndices

Apéndice A. Desplazamiento alcalino

Materiales

Una manguera larga con regulador de flujo y aguas hipodérmicas en cada extremo.

Una manguera corta con agua en un solo extremo

Una botella de vidrio con 500ml de NaOH con fenolftaleína y pH mayor a 12

Un soporte metálico para la botella y una probeta.

Procedimiento

1. La botella con NaOH se sujeta al soporte con la tapa hacia abajo. Introducir la aguja de la manguera corta, debajo de la manguera ubicar la probeta.
2. Introducir una aguja de la manguera larga con el tapón de la botella con NaOH, teniendo en cuenta que el regulador de flujo esté cerrado el paso del aire. La aguja del otro extremo se introduce en el tapón del biorreactor.
3. Deslizar el regulador de flujo de la manguera larga, para permitir el paso del biogás del biorreactor hacia la botella con solución alcalina.
4. El CO_2 del biogás reacciona con el NaOH y queda atrapado en la solución. El CH_4 no reacciona con la solución y pasa hasta la parte superior de la botella, desplazando un volumen equivalente de solución alcalina, la cual sale por la manguera corta hasta la probeta. Se apunta el volumen desplazado en ml.

Apéndice B. Sólidos totales y Sólidos volátiles

Definición

Los sólidos totales incluyen todos los sólidos contenidos en una muestra, tanto suspendidos como disueltos. Los sólidos volátiles representan el peso perdido por ignición de la muestra calcinada a 550°C; son los sólidos que se volatilizan durante la calcinación.

Procedimiento

1. Llevar al horno tres crisoles por cada muestra y dejarlos durante dos horas a 103-105°C. dejarlos enfriar en el desecador y pesarlos (A).
2. Depositar en cada crisol una cantidad de muestra específica bien homogenizada (B).
3. Llevarlos al horno a 103-105°C durante 15-24 horas hasta que la muestra esté seca. Dejar enfriar en el desecador y pesarlos (C).
4. Llevar los crisoles a una mufla a 550°C durante 1 hora. Apagar la mufla.
5. Dejar y dejar que baje la temperatura. Sacar los crisoles y enfriar en el desecador
6. Pesar los crisoles (D).

Cálculos

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

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

Apéndice C. Demanda química de oxígeno

Definición

La demanda química de oxígeno es una medida de la cantidad de oxígeno necesario para la oxidación total de la materia orgánica presente en la muestra.

Procedimiento

1. Usar tubos de ensayo de 16 x 100 mm con tapa rosca. Enjuagarlos previamente con ácido sulfúrico al 20% para prevenir contaminación.
2. Agregar a cada tubo de ensayo 2.5 ml de muestra, adicionar 1,5ml de solución digestora y 3.5 ml de solución catalítica. Preparar un blanco remplazando la muestra con agua destilada. Analizar las muestras por triplicado.
3. Cerrar herméticamente los tubos, agitarlos con cuidado (reacción exotérmica) y llevarlos al termoreactor durante 2 horas a 150°C.
4. Sacar los tubos de ensayo, agitar y dejar enfriar.
5. Medir la absorbancia de las muestras contra el blanco en el espectrofotómetro a 600 nm para DQO altas y 420 nm para DQO bajas.

Apéndice D. Alcalinidad total y ácidos grasos volátiles

Definición

La alcalinidad es una medida de la capacidad de una muestra de neutralizar los ácidos. Los ácidos grasos volátiles son ácidos orgánicos producto de la fermentación de carbohidratos, lípidos y proteínas por bacterias acidogénicas durante la digestión anaeróbica.

Procedimiento

1. Centrifugar entre 7 y 20 ml de muestra a 5000 rpm por 30 minutos en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Pasar el sobrenadante a un vaso de precipitado y medir el pH inicial
3. A 5 ml de la muestra, adicionar 25 ml de agua destilada, luego llevar a la plancha de agitación usando un agitador magnético en un vaso de 50 ml.
4. Medir nuevamente el pH. Si es mayor a 6.5 agregar HCl 0.1N hasta pH 6.5 para iniciar la titulación con HCl hasta llevarlos a pH 3.0. Anotar el valor del volumen utilizado (A).
5. Seguidamente la muestra se lleva a un balón de destilación, conectar el equipo y calentarlo con una estufa hasta ligera ebullición durante 2 minutos.
6. Retirar el balón del destilador y someterlo a un choque térmico con hielo.
7. Pasar la muestra a un vaso de precipitado y medir el pH y se adiciona NaOH 0.1N hasta llevar el pH 6.5. Anotar el volumen gastado (B).

Cálculos

Para hallar la concentración de AT y AGV, se despeja de la siguiente ecuación

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Alcalinidad total (AT): se expresa como carbonato de calcio (mg CaCO₃ L⁻¹)

$$AT \left[\frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}} \right] = \frac{A * N \text{ HCl}}{\text{Vol. muestra}} * 50000$$

Donde:

A: Volumen de HCl utilizado

N HCl: 0.1

Vol. muestra: 5 ml

50000: 50 mg CaCO₃/meq x 1000ml L⁻¹

Ácidos grasos volátiles (AGV): se expresa como ácido acético (mg ácido acético L⁻¹)

$$\text{AGV} \left[\frac{\text{mg Ac. Acético}}{\text{L}} \right] = \frac{B * N \text{ NaOH}}{\text{Vol.muestra}} * 60000$$

Donde

B: Volumen de NaOH utilizado

N NaOH: 0,1

Vol.muestra: 5ml

60000: 60mg Ac.Acético/meq x 1000 ml L⁻¹

Apéndice E. pH

Definición

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una muestra y ésta depende de la concentración de iones de hidrógeno presentes.

Procedimiento

1. Calibración del pH-metro con soluciones tampón
2. Luego de calibrar el equipo, introducir el electrodo en la muestra y esperar que el valor aparezca en la pantalla y se estabilice.
3. Registrar el dato, sacar el electrodo, enjuagarlo con agua destilada y guardarlo en la solución correspondiente.

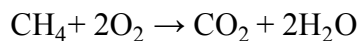
Apéndice F. Determinación de la actividad metanogénica específica

El procedimiento que se lleva a cabo para la determinación de la actividad metanogénica específica es sugerido por (Astals, et al., 2015). Los experimentos se realizan por triplicado.

1. El ensayo se realizó en botella de vidrio de 100 ml con un volumen de trabajo de 60 ml.
2. Agregue a cada botella una cantidad designada de inóculo (60 ml), 0.6 ml acetato de sodio como fuente de carbono. Además, preparar un blanco que contendrá la misma cantidad de inóculo y 0.6 ml de agua destilada.
3. Luego enjuagar con 99.99% de gas nitrógeno durante 30 segundos, después de lavar las botellas se sellan rápidamente con tapón de butilo y agrafes de aluminio.
4. Colocar las botellas en una incubadora a temperatura controlada ($37 \pm 1^\circ\text{C}$).
5. Las pruebas se mezclaron mediante agitación manual antes de cada evento de muestreo.
6. Medir la producción de metano en aproximadamente 0.5, 1.0 y 1.5 días, después del comienzo del ensayo, la experimentación terminara cuando la producción diaria de metano este por debajo del 1% de la producción acumulada de metano durante tres días consecutivos.
7. La producción de metano se midió utilizando el método de desplazamiento alcalino.
8. Trace la producción acumulada de metano específico en base a DQO ($\text{g DQO} \cdot \text{SV}^{-1}_{\text{inóculo}}$) en el curso de tiempo. Teniendo en cuenta que 350 ml de metano en condiciones estándar (0°C , 1 bar) es 1 gramo de DQO, se demuestra con el siguiente balance estequiométrico (Kumar Khanal, 2008):

- Paso 1. Cálculo del equivalente de DQO de CH_4

En necesario calcular el equivalente de DQO del metano considerando su oxidación completa, como se muestra en las siguientes ecuaciones:



$$16 \text{ g} \quad 64 \text{ g}$$

$$16 \text{ g CH}_4 \rightarrow 64 \text{ g O}_2 \text{ (DQO)}$$

$$1 \text{ g CH}_4 \rightarrow 64/16 = 4 \text{ g DQO}$$

- Paso 2. Conversión de metano a volumen equivalente

Según la ley del gas ideal, 1 mol de cualquier gas en STP ocupa un volumen de 22.4 L

$$16 \text{ g CH}_4 \rightarrow 22.4 \text{ L CH}_4$$

$$1 \text{ g CH}_4 \rightarrow 22.4/16 = 1.4 \text{ L CH}_4$$

- Paso 3 Generación de metano por unidad de DQO

$$1 \text{ g CH}_4 \rightarrow 4 \text{ g DQO} \rightarrow 1.4 \text{ L CH}_4$$

$$1 \text{ g DQO} \rightarrow 1.4/4 = 0.35 \text{ L CH}_4 = 350 \text{ ml CH}_4$$

9. Determine la pendiente y la incertidumbre de la zona lineal.

Apéndice G. Determinación de la actividad hidrolítica específica

El procedimiento que se lleva a cabo para la determinación de la actividad hidrolítica específica es sugerido por (Yap, et al., 2018). Los experimentos se realizan por triplicado.

1. El ensayo se realizó en botella de vidrio de 100 ml con un volumen de trabajo de 60 ml.
2. Cada botella lleva una cantidad de inóculo y sustrato (celulosa) manteniendo una RIS de 5 en términos de SV. Cada muestra se analizó por triplicado, tres botellas para medir la producción de metano y tres botellas que contenían solo inóculo (blancos).
3. Luego enjuagar con 99.99% de gas nitrógeno durante 30 segundos, después de lavar las botellas se sellan rápidamente con tapón de butilo y agrafes de aluminio.
4. Además, se prepararon quince replicas para evaluar la concentración diaria de DQOs.

Para medir la DQOs se realizan los siguientes pasos:

- Centrifugar la muestra durante 30 minutos a 5000 rpm
- Pasar el sobrenadante por filtro de 0.45 μm
- Agregar a cada tubo de ensayo 2.5 ml de muestra, adicionar 1.5ml de solución digestora y 3.5 ml de solución catalítica. Preparar un blanco remplazando la muestra con agua destilada. Analizar las muestras por triplicado.
- Cerrar herméticamente los tubos, agitarlos con cuidado (reacción exotérmica) y llevarlos al termoreactor durante 2 horas a 150°C.
- Sacar los tubos de ensayo, agitar y dejar enfriar.
- Medir la absorbancia de las muestras contra el blanco en el espectrofotómetro a 600 nm para DQO altas y 420 nm para DQO bajas.

5. Medir al inicio la DQOs del blanco.
6. Colocar las botellas en una incubadora a temperatura controlada (37 $\pm$ 1°C).

7. Las pruebas se mezclaron mediante agitación manual antes de cada evento de muestreo.
8. Medir la producción de metano diaria durante hasta que alcance la fase estacionaria.
9. La producción de metano se midió utilizando el método de desplazamiento alcalino.
10. Luego graficar la degradación de celulosa, producción de metano y g DQOs AHE versus el tiempo.

Apéndice H. Prueba de inhibición

La prueba de inhibición se llevó a cabo por triplicado siguiendo el protocolo descrito por (Astals, et al., 2015).

1. El ensayo se realizó en botella de vidrio de 100 ml con un volumen de trabajo de 60 ml.
2. Cada botella se agrega una cantidad designada de inóculo (60 ml), 0.6 ml acetato de sodio como fuente de carbono para una RIS de 5 e inhibidor (cloruro de amonio) a diferentes concentraciones.
3. Se realiza pruebas de control (inoculo y acetato de sodio).
4. Medir el pH y la concentración de amonio de cada botella.
5. Luego enjuagar con 99.99% de gas nitrógeno durante 30 segundos, después de lavar las botellas se sellan rápidamente con tapón de butilo y agrafes de aluminio.
6. Colocar las botellas en una incubadora a temperatura controlada ($37 \pm 1^\circ\text{C}$).
7. Las pruebas se mezclaron mediante agitación manual antes de cada evento de muestreo.
8. Medir la producción de metano en aproximadamente durante seis eventos de muestreo cada 12 horas. Después de la última medición abrir las botellas se mide el pH final y la concentración de amonio.
9. Para convertir la concentración de NH_4 a N-NH_3 se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{N-NH}_3 = \frac{K_a \cdot \text{TAN} \cdot \gamma_1}{K_a \cdot \gamma_1 + 10^{-\text{pH}}} \quad (8)$$

Donde:

$$\text{TAN} = \text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4$$

$$K_a = 1.27 \cdot 10^{-9}$$

γ_1 : Coeficiente de actividad

$$\text{Log}\gamma_1 = -0.5 \cdot Z_i^2 \cdot \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.20 \cdot I \right)$$

$Z_i = 1$ (Ion amonio)

$I = \frac{1}{2} \sum Z_i^2 \cdot C_i$; fuerza iónica media

C_i = Concentración de amonio en la mezcla $\left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right)$

Despejando ecuación 8

$$\text{N-NH}_3 = \frac{K_a \cdot (\text{N-NH}_4) \cdot \gamma_1}{10^{-\text{pH}}}$$

10. La producción de metano se midió utilizando el método de desplazamiento alcalino.

11. Trace la producción acumulada de metano específico en base a DQO ($\text{g DQO g}^{-1} \text{SV}_{\text{inóculo}}$) en el curso de tiempo. Teniendo en cuenta que 350 ml de metano en condiciones estándar (0°C , 1 bar) es 1 gramo de DQO.

Apéndice I. Determinación del potencial de biometanización

El procedimiento que se lleva a cabo para la determinación del potencial de biometanización es sugerido por (Angelidaki, et al., 2009; Holliger, et al., 2016).

1. El ensayo se realizó en botellas de vidrio de 100 ml con un volumen de trabajo de 60 ml.
2. Cada botella lleva una cantidad de inóculo y sustrato manteniendo una RIS de 2 en términos de SV. Cada muestra se analizó por triplicado.
3. Es necesario el montaje de blancos para evaluar el metabolismo endógeno del inóculo y el montaje de controles para determinar la producción de metano de un sustrato químicamente definido.
4. Adicionalmente se incluyó un experimento denominado destructivas para evaluar el comportamiento de la DA de las AR en términos de SV y las variables de estabilidad (pH y AGV/AT).
5. Luego los biorreactores se mantuvieron en incubadora a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se realizó seguimiento y medición cada 24 horas, las pruebas se mezclaron mediante agitación manual antes de cada evento de muestreo cuantificando diariamente la producción de metano por el método de desplazamiento alcalino hasta que la producción de metano durante tres días consecutivos fue menor al 1% del volumen acumulado.
6. El PBM se reportó en unidades de volumen de metano acumulado a condiciones estándar por masa de SV agregados ($\text{m}^3 \text{CH}_4 \text{kg}^{-1} \text{SV}$), con su correspondiente desviación estándar.