Universidad Nacional del Comahue

Facultad de Ingeniería

Proyecto Integrador Profesional

Ingeniería Química

Montaje y puesta en marcha de Biodigestor Anaeróbico y seguimiento mediante técnicas analíticas asociadas.

Autor: Ariel Damián Acuña

Directora Externa: Mg. Ing. Patricia Ohaco

Directora Local: Dra. Daniela Asensio

Lugar de Trabajo:

INTI SORPAT

(Instituto Nacional de Tecnología Industrial-Subgerencia Regional Patagonia)

Departamento de Servicios Analíticos Industriales

Laboratorio de Medio Ambiente Sede Cipolletti

Año 2026

RESUMEN

Los reactores biológicos, puntualmente los biodigestores anaeróbicos, se utilizan ampliamente en la industria para degradación de materia orgánica, generación de biogás como producto principal y un producto secundario denominado bioabono. Actualmente debido a la escasez de energía convencional como así también a la indiscriminada generación de residuos sin tratamiento adecuado, se ha avanzado en el desarrollo de estos dispositivos, optimizando de esta manera, el aprovechamiento de energías sustentables. En el presente trabajo, se estudió la digestión anaeróbica de residuos orgánicos generados a nivel local, provenientes de desperdicios de frutas y verduras acopiados en el Mercado Concentrador de la Ciudad de Neuquén. Se construyó un biodigestor con capacidad de 30 litros en el laboratorio de Medio Ambiente ubicado en la Sede Cipolletti de INTI SORPAT para investigar el tratamiento y aprovechamiento de los residuos. En adición, se pusieron a punto técnicas analíticas, (complementarias a ensayos existentes en el laboratorio), para determinar cálculos inherentes a la alimentación y funcionamiento del reactor, siguiendo los lineamientos establecidos por el sistema de gestión del laboratorio, bajo Norma ISO/IEC 17025:2017. Previamente se caracterizó el sustrato (materia orgánica a alimentar al reactor), inóculo (consorcio bacteriano necesario para dar arranque a la reacción), como así también las proporciones necesarias de ambos para la puesta en marcha del reactor y correcto funcionamiento. Los resultados obtenidos permitieron estimar la producción de biogás para una determinada cantidad de sustrato - $\%\overline{CH_4} \approx 63{,}8$ - y realizar el estudio de biodegradabilidad del mismo (alcanzando un grado de biodegradabilidad del 52 %). Por último, se analizó y estableció la viabilidad de la aplicación de esta tecnología de tratamiento para residuos orgánicos de frutas y verduras.

Palabras clave: digestión anaeróbica; sustrato; inóculo; biogás.

ABSTRACT

Biological reactors, particularly anaerobic biodigesters, are widely used in industry for the degradation of organic matter, generating biogas as the primary product and biofertilizer as a secondary by-product. Currently, due to the scarcity of conventional energy sources and the indiscriminate generation of untreated waste, significant progress has been made in the development and optimization of these systems to enhance the use of sustainable energy resources. In this study, the anaerobic digestion of locally generated organic waste was evaluated, specifically fruit and vegetable residues collected from the *Mercado Concentrador de la ciudad de Neuquén*. A 30-liter laboratory scale biodigester was constructed at the Environmental Laboratory of INTI SORPAT, Cipolletti, in order to investigate waste treatment and resource recovery processes. Additionally, analytical techniques were developed and validated complementing existing laboratory methods to determine key operational and feeding parameters of the reactor, in accordance with the laboratory management system guidelines established under ISO/IEC 17025:2017 standards. Prior to reactor startup, the substrate (organic matter fed into the reactor) and the inoculum (bacterial consortium required to initiate the digestion process) were characterized, and their optimal proportions were determined to ensure proper system performance. The results obtained allowed for the estimation of biogas production from a defined quantity of substrate - $\%\overline{CH_4} \approx 63{,}8$ - and to carry out a biodegradability study (achieving a biodegradability level of 52%). Finally, the feasibility of applying this treatment technology to fruit and vegetable organic waste was analyzed and established.

Keywords: anaerobic digestion; substrate; inoculum; biogas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre que me impulsó a seguir una carrera y gracias a su esfuerzo y trabajo supo mantener de pie a este estudiante, hoy convertido en profesional.

A mi querida amiga la Señora Verónica Torres de Lobo, alias La Señora Lobo, (que hoy en día no está físicamente presente, pero desde algún lugar del universo estará observando), que me brindaba todo su apoyo y consejos y que seguramente estaría feliz por el logro de haber terminado y le hubiese encantado verme convertido en Ingeniero.

A mi grupo de amigos, que me han apoyado y con su aliento y compañía no dejaron que bajara los brazos cuando no salía todo bien.

A Romi Hergesheimer, mi gran amiga que me dio esta carrera, la cual fue durante la carrera, es hoy en día y será un apoyo incondicional en mi vida.

A Giselle Catalán (hoy amiga además de haber sido una buena compañera de trabajo) la biotecnóloga responsable que con su experiencia y conocimiento ayudó en este proyecto y se pudo concretar.

A mis directoras Patricia Ohaco y Daniela Asensio por guiarme en esta última etapa de la carrera para finalizar esta etapa de estudiante.

A INTI por darme el espacio y permitirme desarrollar este trabajo que se presenta y brindar los recursos necesarios para poder llevarlo a cabo.

A todos, simplemente gracias.

ÍNDICE

RESUMEN ii
ABSTRACT iii
AGRADECIMIENTOS iv
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN 1
1.1 Introducción general 1
1.2 Objetivo General 2
1.3 Objetivos Específicos 2
1.4 Descripción de los contenidos del trabajo 3
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO 4
2.1 Introducción 4
2.2 El proceso de la digestión Anaeróbica 5
2.2.1 Etapas de la digestión anaeróbica 6
2.3 Factores que afectan el proceso de digestión anaeróbica 8
2.3.1 Temperatura 9
2.3.2 pH 9
2.3.3 Contenido de nutrientes 10
2.3.4 Biodegradabilidad anaeróbica del residuo orgánico 10
2.3.5 Razón de carga orgánica (RCO) 11
2.3.6 Tiempo de retención hidráulica (TRH) 11
2.3.7 Condición de Mezclado 12
2.4 Tipos de biodigestores 13
CAPÍTULO 3 CONSTRUCCIÓN DEL REACTOR BIOLÓGICO PARA LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA 16
3.1 Introducción 16
3.2 Diseño del digestor anaeróbico 17
3.3 Técnicas analíticas 23
3.3.1 Protocolo para determinación de pH 24
3.3.2 Protocolo para determinación de Sólidos Totales, Sólidos Fijos y Sólidos Volátiles 24
3.3.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO) 25
3.3.4 Relación entre los ácidos orgánicos volátiles y carbonato inorgánico total (relación FOS-TAC) 32

3.4. Puesta en Marcha del Reactor diseñado 34
CAPÍTULO 4 FUNCIONAMIENTO DEL REACTOR BIOLÓGICO-ANÁLISIS Y EVALUACIÓN 36
4.1 Introducción 36
4.2 Arranque del biodigestor 36
4.3 Medición de biogás 42
4.3.1 Estimación de producción de biogás 45
4.4 Determinación de biodegradabilidad anaeróbica 46
4.5 Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica (AME) 47
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 49
ANEXOS 52
Anexo 1: Detalles accesorios para la construcción del biodigestor 53
Anexo 2: Caracterización de sustrato e inóculo 54
Anexo 3: Determinación volumen de carga inicial de sustrato e inóculo 56
Anexo 4: Cálculo de caudal de alimentación 57
Anexo 5: Segunda caracterización de sustrato e inóculo 58
Anexo 6: Cálculo de caudal de alimentación: segundo arranque 59
Anexo 7: Ensayo Actividad Metanogénica Específica (AME) 60
Referencias bibliográficas 68

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general

Los biodigestores anaeróbicos son reactores biológicos que producen biogás como producto principal y un producto secundario denominado bioabono, a partir de la degradación de la materia orgánica. En ausencia de oxígeno y en presencia de un consorcio bacteriano adecuado, se lleva a cabo el proceso fermentativo responsable de la producción de biogás.

En consecuencia, cuando un proceso genera valor y simultáneamente elimina o reduce sensiblemente el uso de recursos naturales, se lo denomina “limpio”. La gestión integral de residuos, que implica la minimización en origen, su valoración (recuperación / reutilización / reciclado), incluyendo la recuperación energética y tratamiento de eliminación es muy importante y generar experiencias exitosas de aplicación de tecnología con equipamiento sencillo que logre este objetivo es esencial.

Los residuos orgánicos muchas veces son causantes de diversos impactos ambientales asociados a una falta de tratamiento adecuado y/o una mala disposición final de los mismos, generando malos olores, lixiviados, proliferación de vectores, gases de efecto invernadero, entre otros. La tendencia a eliminar la disposición en vertederos prioriza la gestión integral de residuos, siendo necesaria la aplicación continua de una estrategia ambiental preventiva e integrada a los procesos, productos y servicios, que permitan aumentar la eficiencia global y reducir los riesgos para la salud humana y el ambiente.

La valorización de residuos, en general, se basa en la recuperación de materiales a partir de desechos para transformarlos en materias primas secundarias o subproductos a utilizar en el mismo proceso o en otro y en la obtención de energía mediante tecnologías y procesos que aseguren un bajo impacto ambiental.

La zona de producción como es el Alto Valle de Rio Negro y Neuquén, donde se emplazan diversas actividades productivas (frutihortícola, crianza de animales, elaboración de bebidas, entre otras) generadoras de una alta cantidad de residuos

orgánicos, constituye una fuente de materia prima que permite realizar el tratamiento de dichos residuos a partir de la utilización de biodigestores anaeróbico. En adición, a la valorización de estos desechos mediante la generación de biogás, que representa un importante recurso que puede aprovecharse como energía térmica, cogeneración eléctrica o biocombustible, reemplazando o complementando a las energías convencionales (gas natural o licuado).

En este contexto, el presente trabajo conlleva a la instalación, puesta a punto y seguimiento de un biodigestor anaeróbico, emplazado en el laboratorio de Medio Ambiente de INTI SORPAT que permita estudiar la factibilidad del tratamiento y generación de energía a partir de residuos orgánicos de frutas y verduras provenientes del Mercado Concentrador de Neuquén. Como así también a desarrollar una serie de técnicas analíticas que proporcionen elementos de juicio para controlar el funcionamiento del reactor, contrastar con información existente y eventualmente validar, dichas técnicas.

1.2 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo comprende la instalación y puesta en marcha de un biodigestor a escala laboratorio, a partir de sustrato de residuos orgánicos de frutas y verduras disponibles en la zona para determinar biodegradabilidad a través de la digestión anaeróbica. Con el propósito de detectar las variables operativas fundamentales que condicionan el rendimiento de la operación a través de la puesta a punto de técnicas analíticas que permitan su seguimiento.

1.3 Objetivos Específicos

- Realizar una revisión exhaustiva y crítica de la bibliografía pertinente.
- Armar la estructura y ensamble de un biodigestor de escala laboratorio.
- Analizar y caracterizar mezclas a utilizar - sustrato e inóculo-.
- Estudiar las técnicas analíticas necesarias para digestión anaeróbica.
- Elaborar la puesta a punto de técnicas analíticas:
  1- Ensayos de repetibilidad

2- Estimación de la incertidumbre
3- Confirmación del método

- Diseñar el proceso de carga y puesta en marcha de un biodigestor.
- Estudiar el comportamiento de un biodigestor en diferentes condiciones operativas (seguimiento/control).

1.4 Descripción de los contenidos del trabajo

A continuación, se describe brevemente el contenido del trabajo

Con el fin de contextualizar el sistema estudiado, en el capítulo 2 se presenta una revisión de aspectos característicos del proceso de digestión anaeróbica (DA), aplicaciones en la industria, tecnología necesaria para el tratamiento de desechos orgánicos y particularmente las ventajas en el aprovechamiento de los subproductos obtenidos. El capítulo 2 incluye, además, la descripción de los parámetros fisicoquímicos relevantes para el diseño y control operacional de un reactor biológico (biodigestor).

En el capítulo 3 se realiza un somero detalle de los elementos que constituyen el reactor biológico, incorporando el montaje y las características del ensamble del mismo. Adicionalmente se especifican, las técnicas analíticas desarrolladas como así también la cuantificación necesaria en lo referente a la alimentación y caracterización de sustrato e inóculo.

En el capítulo 4 se desarrolla la metodología empleada en el seguimiento del reactor. Así mismo, se describen las condiciones de alimentación (cantidades y días en los que se realizaron las cargas al biodigestor) y los resultados obtenidos a partir de las mediciones realizadas.

Finalmente, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones extraídas en base a los resultados obtenidos y las perspectivas para la realización de futuros trabajos vinculados al tema del presente trabajo.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

La gran generación de residuos biomásicos provenientes de actividades productivas en la región patagónica constituye una fuente de materia prima como alternativa en el desarrollo de nuevas energías con bajo impacto ambiental. Teniendo en cuenta que la matriz energética argentina mayoritariamente está conformada por combustible fósiles, promover la utilización de residuos de biomasa como fuentes renovables de energía implica una opción de interés en el contexto de crisis energética a nivel regional, nacional e internacional. A partir de diferentes reportes la biomasa posee condiciones agroecológicas por lo que la generación de energía derivada de la misma respeta y protege el medio ambiente, como así también reduce la emisión de gases de efecto invernadero en adición a la conversión en recurso y valoración del residuo.

En las últimas décadas la conversión biológica ha demostrado ser una solución eficaz en el reciclaje de los nutrientes esenciales para la conservación del manto orgánico del terreno fértil y el tratamiento de residuos orgánicos biodegradables (Galí y col., 2009). La digestión anaeróbica es ampliamente reconocida como un proceso maduro y de bajo costo para la producción de biogás, el cual es una valiosa fuente renovable de energía primaria (Angelidaki y col., 1993). El biogás puede obtenerse a través de la digestión anaeróbica de diversos residuos agrícolas tales como hierbas, maderas, pastos, hojas, cascaras de frutas, desechos de hortalizas, residuos sólidos y líquidos de las explotaciones ganaderas, algas, lodos de depuradora, residuos de la industria agroalimentaria e incluso de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (Branks y col., 2007). También se debe mencionar que este proceso es de gran interés en lo relativo a la gestión y manejo de residuos orgánicos desde el punto de vista energético debido a que el biogás producido contiene una mezcla de gases compuesta principalmente por dióxido de carbono y metano (proporción en volumen superior al 60 %, Castells, 2005), y en menor medida trazas de sulfuro de hidrogeno, nitrógeno e hidrogeno.

El proceso global de digestión anaeróbica ocurre mediante la acción conjunta (sintrófica) de varias poblaciones de microorganismos; las cuales realizan la conversión de la materia orgánica mediante una serie de etapas que transcurren tanto en paralelo como en serie (Vogt y col., 2002). Este proceso biológico también conocido como respiración anaeróbica o fermentación anaeróbica se desarrolla naturalmente tanto en ecosistemas formados por la naturaleza como pantanos, lagos, manglares, lechos de los ríos; así como en ecosistemas formados por el hombre como los rellenos sanitarios, pozos sépticos, cultivos de arroz, lagunas anaeróbicas para la acumulación de residuos ganaderos y biodigestores (Watanabe y col., 2009).

Si se particulariza el caso para generar las condiciones imprescindibles del proceso de digestión anaeróbica, la utilización de equipos con prestaciones especiales denominados biodigestores es necesaria. Estos son reactores biológicos especialmente diseñados para maximizar la eficiencia de conversión de los sustratos en energía y obtener subproductos con valor agregado, como son los biofertilizantes.

2.2 El proceso de la digestión anaeróbica

El proceso anaeróbico ha sido estudiado con bastante profundidad desde el punto de vista bioquímico y microbiológico, estableciéndose dos fases principales constituidas por varios subprocesos mediante los cuales se desarrolla la transformación de las moléculas que conforman la materia orgánica biodegradable. Estas fases son: la fase no metanogénica y la fase metanogénica respectivamente. La clasificación de cada una de estas fases se realiza de acuerdo a las características que presentan los conjuntos de poblaciones que desarrollan los subprocesos que conforman cada fase, los cuales pueden ser tanto del tipo facultativo como de naturaleza anaeróbica estricta (Madigan y col., 1999, Prescott y col., 2002). En el diagrama presentado en la figura 2.1 se esquematiza las transformaciones bioquímicas que se suscitan en el proceso de digestión anaeróbica, como así también los productos obtenidos.

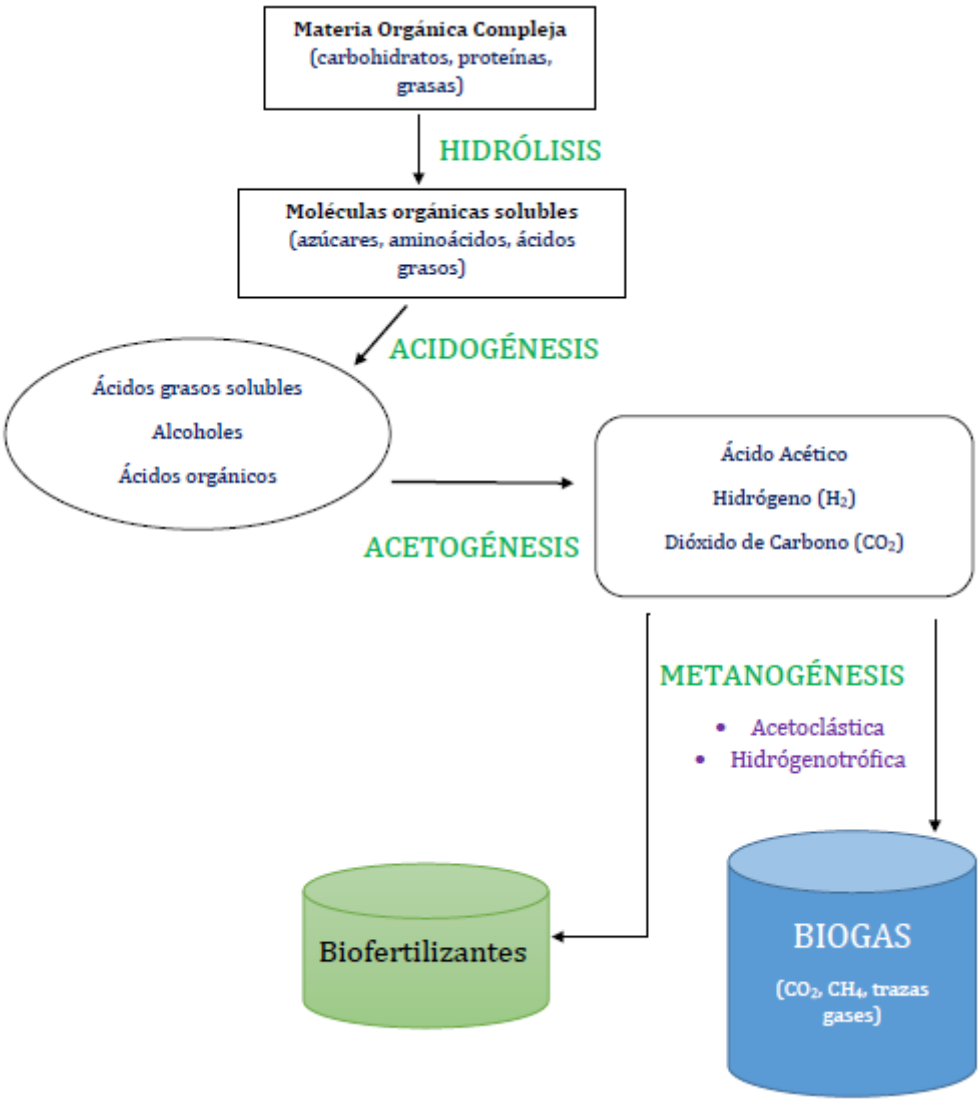


Figura 2.1: Esquema general de transformaciones bioquímicas durante el proceso digestión anaeróbica con producción de biogás y biofertilizantes

2.2.1 Etapas de la digestión anaeróbica

En los digestores las reacciones ocurren en simultáneo, sin embargo, el proceso global de la digestión anaeróbica puede ser dividido para su estudio en cuatro etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, las cuales se describen a continuación:

- **Hidrólisis**: constituye el primer paso necesario para la degradación de sustratos orgánicos complejos, debido a que la materia orgánica polimérica, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, no puede ser utilizada directamente por los

microorganismos a menos que se hidrolicen en compuestos solubles, que puedan atravesar la pared celular. La hidrólisis de estas moléculas complejas es llevada a cabo por las enzimas extracelulares e intracelulares de los microorganismos aerobios facultativos. De esta manera las biomoléculas complejas serán degradadas para dar lugar a elementos componentes como por ejemplo azúcares, aminoácidos, ácidos grasos lo que generarán sustratos para la siguiente etapa.

- **Etapa Acidogénica:** durante esta etapa tiene lugar la fermentación de las moléculas orgánicas solubles en compuestos que puedan ser utilizados directamente por las arqueas metanogénicas (acético, fórmico, H_2) y compuestos orgánicos más reducidos (propiónico, butírico, valérico, láctico y etanol principalmente) que serán oxidados por bacterias acetogénicas en la siguiente etapa del proceso. Este grupo de microorganismos, se compone de bacterias facultativas y anaeróbicas obligadas, eliminan cualquier traza de oxígeno disuelto en el sistema. Dado que la acidogénesis es considerada la etapa más rápida del proceso global, resulta necesario controlarla para evitar que el descenso del pH (acidificación) del medio interfiera con la acción del consorcio microbiano.

- **Etapa Acetogénica**: en esta etapa intervienen dos tipos de microorganismos con dos vías metabólicas diferentes, pero con el mismo fin: generar el ion acetato que pueda ser consumido por las arqueas metanogénicas.
  - Las bacterias acetogénicas transforman algunas moléculas (etanol, ácidos grasos volátiles y algunos compuestos aromáticos) en acetato e hidrógeno.
  - Las bacterias homoacetogénicas también generan acetato, pero lo hacen consumiendo CO_2 y H_2. El hecho de que consuman H_2, permite mantener bajas presiones parciales de este gas.

- **Etapa Metanogénica:** un amplio grupo de arqueas anaerobias estrictas completan el proceso de digestión anaeróbica formando metano a partir de los compuestos que excretaron los microorganismos en las etapas anteriores. Se

pueden establecer dos grandes grupos de microorganismos, en función del sustrato principal que metabolizan:

- Los hidrogenotróficos, que consumen H_2/CO_2 transformándolos en metano (producen el 30% del CH_4).
- Los acetoclásticos que generan metano a partir de ácido fórmico, metanol, algunas aminas (producen el 70% del metano).

Estas arqueas son muy sensibles a los cambios de temperatura y pH, por lo cual es la etapa más importante y delicada de la biodigestión, además de ser una de las etapas más lentas.

Las transformaciones químicas y físicas de la materia orgánica descriptas en estas etapas producen biogás y un residuo estabilizado (digerido) que tiene propiedades adecuadas para ser usado como fertilizante. Para alcanzar la máxima eficiencia del proceso, es necesaria la comprensión adecuada de las bases físicas, químicas y biológicas de la digestión anaeróbica, teniendo en cuenta que los procesos biológicos en todos los biodigestores son similares, es esencial conocer cuáles son los factores que influyen en el proceso.

2.3 Factores que afectan el proceso de digestión anaeróbica

La degradación de la materia orgánica por la acción de microorganismos implica aspectos de carácter energético que pueden ser analizados desde los puntos de vista termodinámico y cinético. El análisis termodinámico de este proceso biológico permite conocer los requerimientos energéticos de las reacciones y la dirección de estas de acuerdo con el criterio de energía libre (Ward y col., 2008). Por su parte el análisis cinético de las reacciones bioquímicas permite establecer la influencia de los parámetros fisicoquímicos sobre el desempeño global del proceso (Siles y col., 2010). La producción de metano es uno de los índices de comparación establecidos para evaluar la eficiencia del proceso de digestión anaeróbica. Durante el desarrollo del proceso este parámetro es afectado por algunos factores fisicoquímicos tales como: temperatura, pH, alcalinidad, tipo y calidad del sustrato, condición de mezclado, entre otros. A continuación, se presentan los factores que ejercen mayor influencia sobre el desempeño de un sistema anaeróbico (Molnar y col., 1989).

2.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros fisicoquímicos más importantes que afecta directamente el desarrollo del proceso de digestión anaeróbica como así también el funcionamiento de un biodigestor. En este contexto es necesario considerar a priori para la elección de la temperatura de operación del reactor biológico diversas variables como: el tipo de tecnología del biodigestor, los materiales utilizados en la construcción, la región y el clima en el cual se emplaza el equipo y la temperatura de la mezcla empleada en la alimentación. Existen tres rangos de temperatura establecidos para el desarrollo del proceso; psicrofílico (<25ºC), mesofílico (entre 25ºC y 45ºC) y termofílico (>45ºC) (El-Mashad y col., 2004).

Adicionalmente la temperatura afecta otros parámetros bioquímicos y fisicoquímicos del proceso como la actividad de los microorganismos, la constante de equilibrio de cada una de las reacciones químicas, la solubilidad de los gases generados en el proceso y el pH (Ward y col., 2008). Aunque la digestión anaeróbica realizada en el rango termofílico (Van Lier y col., 1996) presenta algunas ventajas sobre el desarrollo del proceso en el rango mesofílico, reportadas en bibliografía como altas velocidades de crecimiento y conversión metabólica, también se asocia con mayores razones de mortandad de las poblaciones bacterianas, menor estabilidad del proceso y un requerimiento energético mayor respecto al rango mesofílico (Rodríguez y col., 2004, Romero y col., 1991). Debido a la fuerte dependencia que presenta el proceso de digestión anaeróbica respecto a la temperatura, es este uno de los parámetros críticos que es necesario mantener en un rango controlado (Fannin y col., 1987, Chen y col., 2008).

2.3.2 pH

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una determinada solución, por lo que ejerce una gran influencia sobre la estabilidad del proceso, considerándose como una de las variables que regula la coexistencia de las poblaciones conformadas por microorganismos. A pesar de que dentro del ecosistema anaeróbico cada uno de los grupos microbianos presenta un grado distinto de sensibilidad respecto a este parámetro, se ha establecido el rango óptimo de pH para el desarrollo del proceso de digestión

anaeróbica entre - 6,5 y 7,5- (Khanal y col., 2008; Madigan y col., 1999). Algunas investigaciones han señalado que el rango óptimo del pH para los microorganismos formadores de metano se encuentra entre - pH 6,7 a 7,4 - (Chen y col., 2008); únicamente el microorganismo metanosarcina es capaz de soportar un valor de pH= 6,2 o ligeramente menor; no obstante, los otros metanógenos suprimen considerablemente su metabolismo a valores de pH < 6,7 (Ward y col., 2008). Si el valor del pH cae por debajo de pH= 6,5, entonces la deficiencia en el consumo de los ácidos orgánicos conduce a un decremento adicional del pH lo cual faculta el cese de la fase metanogénica (Prescott y col., 2002). Los valores de pH menores a 4,5 y superiores a 8,3 presentan inhibición de la actividad de todos los microorganismos implicados en el proceso; debido a que las enzimas que regulan los procesos vitales de las poblaciones microbianas son afectadas por los cambios de estado de los grupos ionizables (grupos carboxilo y amino), junto con la desnaturalización de estructuras proteicas. Se considera que el pH es uno de los parámetros esenciales en la evaluación del funcionamiento de un sistema de digestión anaeróbica, la facilidad de medida y la rapidez de obtención del resultado, conllevan al óptimo para el control y seguimiento de los procesos que se desarrollan en el interior del reactor anaeróbico.

2.3.3 Contenido de nutrientes

La biomasa celular responsable del desarrollo del proceso de digestión anaeróbica requiere de una serie de nutrientes minerales además de una fuente de carbono y una fuente de energía para su correcto desarrollo (Prescott y col., 2002). Los principales nutrientes esenciales en un sistema anaeróbico son carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, hierro, cobalto, níquel, molibdeno, selenio entre otros; los cuales generalmente se encuentran presentes en los sustratos orgánicos biodegradables en cantidades superiores a las necesarias para suplir los requerimientos de las diversas poblaciones bacterianas (Baumann y col., 1997).

2.3.4 Biodegradabilidad anaeróbica del residuo orgánico

La biodegradabilidad anaeróbica de un residuo orgánico representa el grado de variación de la estructura molecular y de las características fisicoquímicas de este residuo debido a la degradación en condiciones anaeróbicas por parte de los

microorganismos (Hongwei y col., 2006); siendo dependiente de factores como son: la composición química (carbohidratos, proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos grasos volátiles, entre otros), el tipo de población microbiana utilizada como inóculo y las condiciones fisicoquímicas durante el desarrollo del proceso de digestión anaeróbica (Montusiewicz y col., 2008). La biodegradabilidad anaeróbica de un residuo orgánico puede ser evaluada a partir de los cambios en las características fisicoquímicas del residuo (Vallecillo y col., 1999), la cantidad y composición de los productos finales del proceso (International Organization for Standardization [ISO], 1995) y la actividad de los microorganismos (Yang y col., 2002). Por lo tanto, se han establecido métodos para la determinación de la misma en un compuesto o residuos orgánico a partir de la medición de las concentraciones de los metabolitos que se generan en el proceso o la cantidad de productos finales de la transformación bioquímica como el biogás y el gas metano (Owen y col., 1978; Owens y col., 1993, Shelton y col., 1984, ISO, 1995).

2.3.5 Razón de carga orgánica (RCO)

La razón de carga orgánica representa la cantidad de materia orgánica que es alimentada al sistema de tratamiento de flujo continuo en términos de la Demanda Química de Oxígeno por unidad de volumen del reactor en una unidad de tiempo establecida. Sin embargo, en los sistemas de tratamiento de flujo discontinuo o en los reactores utilizados en los ensayos de biodegradabilidad anaeróbica, la razón de carga orgánica se determina mediante la fracción entre la Demanda Química de Oxígeno soluble del residuo orgánico y el contenido de Sólidos Volátiles del lodo utilizado como inóculo (Ward y col., 2008). La constitución de una razón de carga orgánica máxima en un sistema de digestión anaeróbica depende de varios parámetros dentro de los cuales se encuentran el diseño del reactor, la capacidad de asentamiento de la biomasa, el grado de actividad microbiana, y las características del afluente (Speece, 1996).

2.3.6 Tiempo de retención hidráulica (TRH)

El tiempo de retención hidráulica hace referencia al tiempo promedio de permanencia de la alimentación líquida en un digestor anaeróbico de funcionamiento continuo. También puede definirse el tiempo de retención de sólidos (TRS), el cual indica el tiempo de permanencia promedio de la biomasa microbiana en el interior del

digestor. Estos parámetros de funcionamiento dependen típicamente del reactor que sea utilizado, por lo tanto, el tiempo de retención hidráulica, así como la razón de carga orgánica y el tipo de sustrato, son los principales parámetros de funcionamiento que determinan el volumen del reactor (Fannin y col., 1987). La importancia del parámetro de retención hidráulica subyace en que al aumentar el TRH se incrementa la fracción de materia orgánica degradada, sin embargo, la producción volumétrica de biogás disminuye después de que se ha superado el TRH óptimo para un residuo orgánico en particular.

2.3.7 Condición de Mezclado

El grado de agitación o mezclado es un punto clave en el diseño del sistema de digestión anaeróbica, puesto que este parámetro es esencial para un correcto funcionamiento del proceso debido a que estimula el contacto directo del sustrato orgánico con las poblaciones bacterianas que desarrollan el proceso (Ward y col., 2008). Como se ha mencionado previamente, la biodigestión es un proceso netamente biológico que procede con una gran variedad de microorganismos, evidenciando la necesidad de especificar puntualmente en el mezclado la intensidad y frecuencia de la agitación en función de: los sustratos a degradar, los procesos y las tecnologías aplicadas al material orgánico.

Otros factores y /o aspectos físicos y químicos inherentes al funcionamiento de un biodigestor que deben ser tenidos en cuenta con el propósito de entender y estimar rendimientos potenciales son: niveles de Sólidos Totales y Sólidos Volátiles, relación ácidos orgánicos volátiles/carbonato inorgánico total, relación carbono/nitrógeno del sustrato; como así también la presencia de compuestos inhibidores del proceso. Toda la materia orgánica está compuesta de agua y una fracción sólida llamada Sólidos Totales (ST). El porcentaje y / o nivel de Sólidos Totales contenidos en la mezcla con que se carga el digestor es muy importante, ya que la movilidad de las bacterias se ve crecientemente limitada a medida que se aumenta el contenido de sólidos y por lo tanto puede verse afectada la eficiencia y producción de gas. La porción de Sólidos Totales que se libera de una muestra, volatilizándose cuando esta se calienta a altas temperaturas (superiores a 500 ºC) se denominan Sólidos Volátiles (SV). Los compuestos orgánicos que teóricamente se convierten en metano se encuentran

puntualmente en los Sólidos Volátiles, razón por la cual el nivel de Sólidos Volátiles en una muestra faculta a realizar comparaciones entre distintos sustratos y tecnologías con el objeto de favorecer la producción de biogás. La valoración de la relación entre los ácidos orgánicos volátiles (FOS) y carbonato inorgánico total (TAC) posibilita medir el riesgo de acidificación de un biodigestor (capacidad reguladora de pH de un reactor). Este parámetro de control se utiliza para evaluar el proceso de fermentación; y la determinación del valor de la relación FOS-TAC permite detectar problemas en la fase biológica del digestor, considerando que valores de 0,3 a 0,4 son en general normales para este parámetro para el tipo de sustrato e inóculo utilizado en ese estudio (Ulrich y col., 2008). El carbono y el nitrógeno son los principales nutrientes que necesitan las bacterias para vivir (carbono fuente de energía, nitrógeno formación nuevas células), por lo tanto, ambos nutrientes deben estar equilibrados y la relación carbono / nitrógeno en el sustrato debe ser óptima, más aun teniendo en cuenta que esta proporción es importante para la actividad microbiana en un biodigestor. La presencia de sustancias tóxicas puede inhibir el proceso de digestión anaeróbica, estas sustancias pueden estar presentes en la materia prima que alimenta al biodigestor o ser subproductos de la actividad metabólica de los microorganismos anaeróbicos. Motivo por el cual es necesario identificar algunos de los principales inhibidores y /o limitantes de la biodigestión: metales pesados, antibióticos, detergentes, desinfectantes, amoniaco, falta de nutrientes.

2.4 Tipos de biodigestores

Los biodigestores pueden tener tecnologías muy variadas, que incluyen desde construcciones caseras con diversos materiales, hasta plantas con tecnología de punta completamente automatizadas. Es por eso que la elección de la tecnología más adecuada depende de múltiples factores: la finalidad del reactor biológico, los recursos disponibles y principalmente la clase de sustrato que alimentará al biodigestor, entre los aspectos más relevantes. Según reportes bibliográficos no existe una forma estandarizada de clasificar a estos equipos, pudiendo clasificarlos según la diferencia de tamaño, por alguna característica relevante del proceso, por ejemplo, el desarrollo en el crecimiento de los microorganismos al interior del reactor (Nichols, 2004) o por el nivel

tecnológico. En diferentes publicaciones, se explicitan características que permiten diferenciar a los biodigestores a partir de:

- Modalidad de carga, admitiendo que la carga puede realizarse completa en una única vez *(batch)* o administrarse de manera semicontinua o continua.
- Contenido de materia seca de la mezcla de alimentación, define si el digestor se considera húmedo, semihúmedo o seco.
- Grado de mezclado, permite distinguir entre mezcla completa, mezcla parcial o nula.
- Manejo del sustrato, hay digestores en los cuales se realiza y otros que no.
- Etapas del manejo, considerada en los casos en que se presenta manejo de sustrato, puede ser de una o dos etapas.

También es posible clasificarlos como biodigestor con nivel tecnológico bajo, medio o alto, siendo esta característica la que evalúa la viabilidad de controlar el grado de mezclado, la temperatura del proceso, la automatización y los sistemas de medición de la operación. Teniendo en cuenta que en todas las tecnologías posibles de utilizar en este tipo de reactores biológicos se especifica un volumen libre para el biogás (entre 20% y 50%). A continuación, se describen brevemente los distintos modelos de biodigestores que pueden ser implementados para el tratamiento de residuos orgánicos:

- Biodigestores de flujo continuo: tienen una geometría alargada, asemejándose al sistema digestivos de un ser vivo (animal o humano), incrementándose el grado de descomposición del residuo con el eje horizontal del biodigestor. Se implementan cuando el diseño supera volúmenes de 15 m^3.
- Biodigestores de mezcla perfecta: este diseño consiste en un recipiente cerrado con entrada de alimentación (continuo o en ciclos de tiempos preestablecidos y salidas, el sustrato que ingresa al biodigestor se dispersa inmediatamente en todo el volumen del mismo (Polanco y col., 2015). La composición de la corriente de descarga - masa digerida y biogás producido- es de características similares a la mezcla interna del biodigestor, se puede garantizar siempre que existan buenas condiciones de mezclado. Para este modelo es necesario disponer de una superficie cilíndrica o esférica y equipar al mismo con un sistema de agitación (mecánica o neumática) para conseguir una buena homogeneización de la fase

de digestión. Dos ejemplos de estos modelos son los biodigestores “modelo hindú” y “modelo chino” siendo la principal diferencia entre ambos la forma de almacenar el biogás; utilización de cubierta flotante (gasómetro) o fija respectivamente.

CAPÍTULO 3

CONSTRUCCIÓN DEL REACTOR BIOLÓGICO PARA LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA

3.1 Introducción

El desarrollo de tecnologías de biodigestión eficientes ha promovido la utilización de reactores biológicos para el tratamiento integral de diversos residuos orgánicos utilizando el proceso de digestión anaeróbica. Sin embargo, la mayoría de los reactores anaeróbicos en pequeña escala existentes en la región del Alto Valle de Rio Negro y Neuquén se encuentran localizados en zonas rurales, utilizando los residuos in situ de granjas agropecuarias como materia prima. La necesidad del tratamiento de desechos en zonas urbanas, puntualmente en las grandes urbes donde la acumulación de residuos de origen orgánico ha crecido en las últimas décadas de manera exponencial, conllevan a la realización de un estudio de aplicación de la tecnología antes mencionada. Esto permitirá comprobar la factibilidad del aprovechamiento de residuos de frutas y verduras generados en el Mercado Concentrador de la ciudad Neuquén como alternativa de tratamiento al volumen de residuos originados disminuyendo el impacto ambiental y agregando valor al residuo a través de los productos obtenidos.

Estudios realizados a matrices similares o de las mismas características de sustratos constituidos con residuos orgánicos de frutas y verduras permiten estimar la cantidad de biogás -litros de metano producidos en función de los kilogramos de Sólidos Volátiles- (Forster-Carneiro y col., 2007) que pueden producir estos desechos, a partir de la aplicación de la biodigestión anaeróbica como tecnología. Teniendo en cuenta que las condiciones climáticas de la zona geográfica en la cual se emplazará el reactor biológico registran una amplitud térmica de dimensiones consideradas a lo largo del año (valores de temperatura por debajo de 0°C en invierno y temperaturas por encima de 30°C en verano) es necesario realizar a priori un exhaustivo análisis que permita establecer las condiciones óptimas para el desarrollo del proceso.

En el contexto antes descripto un modelo de biodigestor tanque agitado de carga semicontinua en pequeña escala se construyó para un sistema de digestión anaeróbica. El diseño experimental que se presenta fue realizado ajustando las variables principales

que afectan el proceso anaeróbico en función de reportes técnicos y publicaciones científicas, y adecuando las condiciones operativas y de diseño según la disponibilidad y accesibilidad de equipamiento del laboratorio.

3.2 Diseño del digestor anaeróbico

El biodigestor en pequeña escala construido, sobre la base de un modelo de reactor tanque agitado de carga semicontinua, consiste en un recipiente y/o tanque cerrado (con tapa roscada y de 30 litros de capacidad) donde se produce el proceso biológico en ausencia de oxígeno, particularmente el material utilizado para el recipiente es plástico clasificado tipo 2, polietileno de alta densidad (HDPE), resistente a: los ácidos orgánicos que se generan en el proceso como así también al ataque químico que produce el ácido sulfhídrico contenido en el biogás. La forma adoptada es del tipo cilíndrico y al estar construido con un tanque la disposición es vertical, como se puede apreciar en la figura 3.1 se adicionó, con el objetivo de mantener un ciclo continuo, tres conexiones con brida de dimensiones adecuadas que constituyen junto con los accesorios necesarios la: entrada de alimentación, salida del digerido, y salida del biogás producido (ver Anexo 1, tabla A.1). Para permitir que se logre un mejor contacto entre el material a degradar y las bacterias existentes en el biodigestor e impedir que se formen costras en la interfase líquido-gas, el reactor posee un sistema de agitación mecánica diseñado a partir de relaciones adimensionales establecidas en función del diámetro del tanque a utilizar, el material disponible en el laboratorio y el espacio de emplazamiento del reactor. En este caso particular, se consideraron las equivalencias descriptas en la tabla 1 construyendo el agitador con un eje envuelto por un caño de ½ pulgada (caño camisa) con recubrimiento epoxi, para garantizar su durabilidad, y dos secciones rectangulares en chapa de dimensiones 4,5 cm x 6,5 cm con un espesor de 0,5 mm que conforman las paletas del agitador (ver detalle figura 3.1).

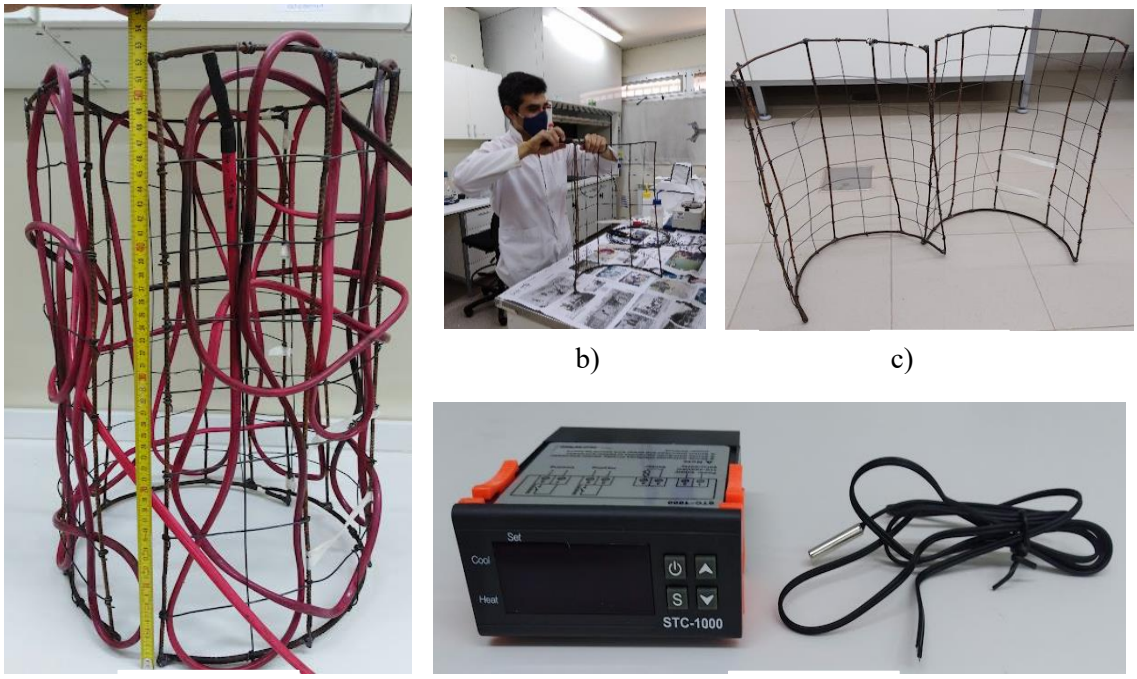
Tabla 1: Relaciones adimensionales en función del diámetro del tanque utilizado

	RELACIÓN ADIMENSIONAL EQUIVALENTE
diámetro del agitador/ diámetro de tanque	3/5
relación ancho/ largo de paletas	5/7
relación largo de paletas/ radio agitador	5/6
altura del agitador/ altura nivel de liquido	2/5

Figura 3.1: Reactor tanque agitado de carga semicontinua - Detalle del Agitador

Además, se adoptó como tecnología para la calefacción del biodigestor, un sistema de calefacción externo que permite generar un intercambio de calor a través de un dispositivo –cable calefactor- fuera del digestor, dispuesto sobre una estructura metálica (constituida de alambre y hierro), siendo esta opción versátil en lo referente al mantenimiento y reparación debido a la independencia del sistema (figura 3.2 a) b) y c)). Este sistema de calefacción posibilita la operación estable del proceso en las condiciones de temperaturas internas necesarias para que se desarrollen las reacciones biológicas, debido a la amplia variación térmica que se registran en la zona geográfica (-10°C; 40°C). El cable calefactor se conecta a un controlador de temperatura provisto de

un sensor, que permite medir la temperatura en el interior del reactor y activar la calefacción del sistema, según la temperatura de seteo (figura 3.2 d)). Es importante hacer mención que, al incorporar un sistema de intercambio de calor en el biodigestor, resulta también razonable aislarlo térmicamente, para evitar pérdidas del calor generado, puntualmente en este diseño se utilizó un recubrimiento aislante exterior de material plástico.



a) b) c) d)

Figura 3.2: Dispositivo de intercambio de calor-controlador de temperatura y sensor. a) cable calefactor, b)-c) estructura metálica, d) controlador de temperatura

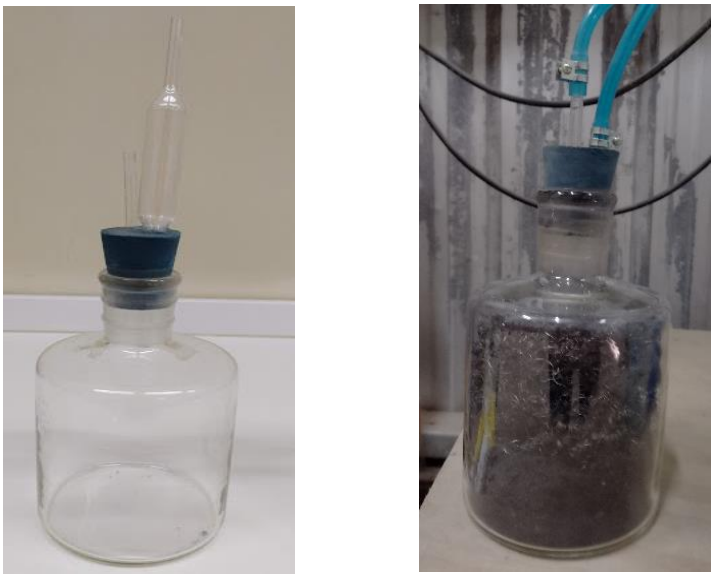
El biodigestor debe constar también con una válvula de seguridad (figura 3.3), que puede funcionar al mismo tiempo como trampa de agua y regulador de presión dentro del sistema. El gas proveniente del digestor posee un alto contenido de humedad y las diferencias de temperaturas entre la zona de reacción y la salida del biogás, al contacto con la temperatura del medio ambiente, conllevan a que el agua se condense, siendo necesario que la válvula actué como una trampa de agua que permita recolectar este condensado. La válvula de seguridad se diseñó y construyó con material de vidrio existente en el laboratorio, la misma se compone de: un matraz de vidrio (kitasato con capacidad de 1000 ml), un tapón de goma con perforación (figura 3.3 a)) y

particularmente se reutilizaron pipetas de vidrio rotas, las cuales se colocan en el tapón perforado como canal de egreso de biogás de la trampa de agua y de conexión de las mangueras correspondientes del sistema (figura 3.3b)).

a) b)

Figura 3.3: Trampa de agua. a) matraz de vidrio y tapón perforado; b) trampa de agua con conexiones

Otro aspecto relacionado con la seguridad, inherente a la escala del diseño del reactor biológico, es la eliminación de productos sulfurados, fundamental en toda instalación de biogás, si bien puede realizarse por distintas vías en este proyecto se utilizó una trampa de sulfhídrico o filtro de absorción resultando sencillo y económico. El material empleado que permitirá el proceso de filtrado son virutas de hierro que se complementa con la adición de carbón activado para facilitar el proceso de adsorción contenidos en una botella de vidrio con tapón de goma con dos perforaciones (figura 3.4 a)). Los conectores que se utilizan, para acoplar la trampa de sulfhídrico a la corriente gaseosa proveniente de la salida del reactor y el efluente de biogás sin compuestos sulfurados son también pipetas de vidrio rotas reutilizadas (figura 3.4 b)).



a) b)

Figura 3.4: Trampa de sulfhídrico. a) botella y tampón perforado; b) trampa de sulfhídrico con relleno de viruta de hierro y carbón activado.

Al diseño del reactor se le anexó un recipiente rígido que permite almacenar el biogás producido por el biodigestor e incrementar la presión denominado gasómetro o gasómero. Debido a la facilidad de construcción y eficiencia, se utilizó un gasómetro tipo campana, que consiste en un tanque invertido colocado dentro de otro de mayor diámetro. Se puede observar en la figura 3.5 a) que en la parte superior del tanque invertido se colocó un sistema de contrapeso, además de instalar guías laterales para evitar movimientos y caídas durante el desplazamiento del mismo. Los recipientes utilizados son del mismo material plástico, que está constituido el reactor, con capacidades de 20 y 60 litros respectivamente (figura 3.5 b)), incluyendo en el contenedor invertido (almacena el biogás) una válvula de purga (colocada en la parte superior en el recipiente de menor tamaño) y tres codos de ½ pulgada que permiten la conexión de un caño de PVC de ½ pulgada para el ingreso del biogás, que toma forma de U (figura 3.5 c)). Con el fin de generar un sello hidráulico, el tanque de mayor capacidad (contención del primer tanque) se llenó con agua.

a) b) c)

Figura 3.5: Gasómetro. a) estructura soporte gasómetro; b) recipientes y válvula de purga; c) conexión de PVC para ingreso de biogás.

Previo a la instalación del equipo, es necesario realizar una prueba hidráulica y una prueba neumática, de manera de garantizar los requisitos mínimos de seguridad y funcionamiento en el proceso a llevar a cabo. La prueba hidráulica permite verificar que no existen perdidas de líquido en el biodigestor, puntualmente este ensayo se realizó cargando el reactor, en este caso el tanque, con agua hasta llegar al nivel de la boca de salida, comprobando si el sellado de las partes es efectivo. Realizando en primera instancia una inspección visual en el sellado de las tres conexiones con brida (entrada de alimentación, salida del digerido, y salida del biogás), repitiendo la inspección a las 24 horas. La prueba neumática consiste en verificar que no existan pérdidas de biogás, con el biodigestor lleno de líquido hasta nivel de descarga, se conectaron todos los dispositivos entre sí (trampa de agua y de sulfhídrico, gasómetro) y a través de un inflador se inyecto aire al sistema hasta que el gasómetro llego al límite superior. La evaluación se realizó empleando una esponja y detergente, colocando espuma en cada una de las uniones y observando si se forman burbujas (la formación de burbujas implica la existencia de pérdidas).

Finalizados estos ensayos, que permitieron validar la capacidad hermética y la resistencia estructural del reactor biológico diseñado, se procedió al montaje final del biodigestor y los accesorios necesarios (figura 3.6) para su posterior puesta en marcha.

Figura 3.6: Biodigestor y accesorios

3.3 Técnicas analíticas

Una vez instalado el biodigestor y previo a la puesta en marcha del proceso biológico, se requirió determinar y poner a punto técnicas analíticas que permitieron: caracterizar la materia prima a utilizar -sustrato e inóculo- realizar los cálculos pertinentes en relación a cantidades necesarias de materia prima para iniciar el proceso, carga inicial de inóculo, como así también el monitoreo del mismo. Cabe aclarar que las técnicas analíticas asociadas puntualmente al proceso de digestión anaeróbica de determinación de: pH, Sólidos Totales, Fijos y Volátiles ya se encontraban desarrolladas y validadas por el laboratorio de Medio Ambiente perteneciente al INTI-SORPAT al momento de la puesta en marcha del reactor biológico diseñado. A continuación, se realiza una descripción somera de los protocolos que se utilizan en las mismas.

3.3.1 Protocolo para determinación de pH

En primer lugar, se realizan y registran mediciones de pH sobre el sustrato y el inóculo antes de la carga en el reactor. Luego se procede con mediciones de pH posterior a la carga, transcurrido un lapso determinado de tiempo previamente estipulado para realizar el seguimiento correspondiente y monitoreo pertinente del proceso. Estas mediciones se realizaron siguiendo el método MEFQ2 308 "Determinación de pH por medición directa", según protocolo validado del laboratorio[1]. El instrumental utilizado es un pH-metro de mesada, marca OAKTON pH2700[2], el cual se verifica y ajusta antes del uso con soluciones buffer de referencias trazables a NIST de pH 4, 7 y 10.

3.3.2 Protocolo para determinación de Sólidos Totales, Sólidos Fijos y Sólidos Volátiles

El método que permite determinar los Sólidos Totales (ST), Sólidos Fijos (SF) y Sólidos Volátiles (SV) utilizado en el laboratorio según norma (SM 2540 A/B/C/D/E/F) está estandarizado con nomenclatura MEFQ2 309 "Determinación de Sólidos Totales, Fijos y Volátiles y Sedimentables". El protocolo comienza con la determinación de ST, para lo cual se toma una porción analítica del sustrato en estudio como así también del inóculo a utilizar (previamente homogeneizado), ambos tratados como muestras independientes, seguidamente ambas muestras se colocan en cápsulas de porcelana (adecuadas según protocolo), se llevan a estufa de secado[3] - Estufa SAN JOR- para evaporación del contenido de agua (tiempo mínimo 12 horas) a una temperatura de 105°C ± 5°C, (condiciones determinadas en el procedimiento específico del laboratorio) transcurrido el tiempo de secado se realiza y registra el peso de las cápsulas, repitiendo el procedimiento sucesivamente hasta obtener un peso constante. Finalizado el ensayo de determinación de Sólidos Totales se continúa con la técnica que permite determinar Sólidos Fijos y Volátiles, siguiendo el protocolo se utiliza una Mufla[4] en la cual el contenido de las cápsulas -muestra seca- se calcinan en un rango de temperatura de 550°C ± 30°C, estipulado según el método de ensayo establecido por protocolo durante

[1] Basado según norma *AOAC Official Methods of Analysis 973.41*
[2] Identificado según el sistema de Gestión de Calidad del laboratorio como: INTI-SORPAT N°186
[3] Identificado según el sistema de Gestión de Calidad del laboratorio como: INTI-SORPAT N°15
[4] Identificado según el sistema de Gestión de Calidad del laboratorio como: INTI-SORPAT N°30

4 horas. El residuo de ceniza que queda en la cápsula corresponde a los SF, siendo la diferencia de masas registradas entre los ST y SF lo que determina y proporciona el valor de Sólidos Volátiles.

En adición a las técnicas analíticas previamente descriptas fue necesario con el objetivo de complementar el análisis fisicoquímico inherente al proceso de digestión anaeróbica poner a punto nuevas técnicas analíticas relevantes que conlleven a comprender cómo está funcionando el sistema y estimar los rendimientos potenciales en la generación de biogás. Puntualmente se decidió sumar las técnicas que permiten determinar: Demanda Química de Oxigeno (DQO) y relación entre los ácidos orgánicos volátiles y carbonato inorgánico total (relación FOS-TAC). A continuación, se describe la propuesta metodológica junto con el diseño experimental de las técnicas mencionadas que se realizó ajustando los métodos estandarizados según la disponibilidad y accesibilidad de equipamiento del laboratorio.

3.3.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO es una medida del equivalente de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica e inorgánica de una muestra mediante un oxidante químico fuerte; para la determinación de este parámetro la técnica que se puso a punto se basó en el STANDARD METHOD 5220-D - Método Colorimétrico - Reflujo cerrado -[5] con la siguiente metodología:

1.- Se coloca una porción analítica (2,5 ml) de muestra de efluente a ensayar (diluida según requerimiento del método) en tubos o viales de digestión con tapa que contiene reactivos identificados como: Solución 1: ácido sulfúrico / sulfato de plata, Solución 2: dicromato de potasio/ sulfato de mercurio / ácido sulfúrico.

2.- Se cierran los tubos herméticamente y se mezcla varias veces con movimientos invertidos con los reactivos mencionados.

3.- Se colocan los tubos en un termoreactor - Reactor de DQO HACH[6] - a una temperatura de 150°C ± 2°C durante 2 horas (tiempo de digestión). Dejar enfriar.

[5] MEFQ2 332 - Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO) según SM 5220-D
[6] Identificado según el sistema de Gestión de Calidad del laboratorio como: INTI-SORPAT N°86

4.- Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm mediante espectrofotómetro UV- Visible -Agilent Technology, modelo Cary 60[7], previamente realizada la curva de calibración del método con un reactivo de referencia solución de ftalato ácido de potasio con concentraciones: 100, 300, 500, 700 y 900 mg/l respectivamente.

Con el fin de implementar el método de ensayo, se verificó el procedimiento antes descripto mediante cuatro actividades planificadas en concordancia a la determinación de DQO según SM-5220-D en efluentes para alto rango 100-900 mg/l, utilizando un efluente industrial tratado. A continuación, se describen las cuatro actividades realizadas para evaluar: linealidad, límite de cuantificación, repetibilidad e incertidumbre del método.

Actividad 1: Linealidad del método

Para establecer la linealidad del método, se realizaron curvas de calibración, cada una con cinco valores de concentración diferentes, determinados a priori para cubrir el rango de trabajo. La técnica utilizada consiste en pesar una cantidad de reactivo - ftalato ácido de potasio (KHP) - equivalente a una concentración de DQO conocida en matraces con capacidad determinada de manera de consignar el valor de concentración. Las curvas de calibración de KHP se realizaron en diferentes días garantizando la aplicabilidad del método en distintas condiciones de trabajo - ie: trazabilidad de los reactivos, funcionamiento de equipos, ejecución del analista-. Luego, se constató la linealidad de las curvas de calibración a partir de la evaluación del coeficiente de correlación R^2 obtenido en cada ensayo. En la tabla 2 se puede observar valores de coeficiente de correlación mayores a 0,99 infiriendo entonces que el ajuste del método es adecuado en el rango de trabajo determinado.

Actividad 2: Limite de cuantificación del método

El método Colorimétrico-Reflujo cerrado estipula el límite de cuantificación (LQ) en el nivel de concentración alrededor de 100 mg/l, razón por la cual es necesario evaluar a partir de una solución de KHP preparada en estas condiciones dicho límite. Se llevaron a cabo las experiencias relativas al método utilizando y preparando 9

[7] Identificado según el sistema de Gestión de Calidad del laboratorio como: INTI-SORPAT N°308

soluciones de ftalato ácido de potasio con concentración de 100 mg/l de manera de poder calcular el valor de DQO teórico de forma independiente en función de la cantidad de masa de KHP pesada. Luego se lee las absorbancias de cada solución, lo que permite calcular la Demanda Química de Oxígeno y compararla con el valor de la DQO teórica. En la tabla 3 se listan los datos obtenidos para cada una de las soluciones, junto con la diferencia entre los valores relativos de DQO teórica y DQO leída.

Tabla 2: Coeficiente de correlación, desarrollo experimental de linealidad del método, (fuente: Informe de linealidad generado por el laboratorio de Medio Ambiente de INTI-SORPAT)

Curvas de calibración	***Ecuación***	***R^2***
1	$y = 0{,}0003\,x - 0{,}0025$	0,9982
2	$y = 0{,}0004\,x + 0{,}0523$	0,9967
3	$y = 0{,}0004\,x + 0{,}0457$	0,9999

Los valores de $DQO_{leída}$ para cada solución permite estimar un valor promedio ($\overline{DQO}_{leida}$), dato que se utilizó para la determinación del desvío estándar (So) de las mediciones, según ecuación (1):

$$So = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (1)$$

siendo x_i el valor de DQO leída de cada solución, $\bar{x}$ el valor promedio de DQO leída y n el número de soluciones preparadas.

A partir del cálculo del desvió estándar es posible determinar el límite de cuantificación -LQ = 89.70 (mg/l)[8]- del método mediante la ecuación (2),

$$LQ = k_Q * So \qquad (2)$$

donde el factor k_Q tiene un valor por defecto de 10 (IUPAC Recommnedations, 1995).

[8] Dato de LQ determinado por el analista del laboratorio *(fuente: informe de límite de cuantificación del método de ensayo generado por el laboratorio de Medio Ambiente de INTI-SORPAT)*

Tabla 3: Datos experimentales de $DQO_{teórica}$ y $DQO_{leída}$ obtenidos durante la ejecución del ensayo para determinar el Límite de Cuantificación (fuente: Informe de límite de cuantificación del método de ensayo generado por el laboratorio de Medio Ambiente de INTI-SORPAT)

Solución N°	***Masa KHP (g)***	***DQO teórico [9] (mg/l)***	***Absorbancia***	***DQO leída [10] (mg/l)***	***Diferencia (%)***
1	0,0084	98,78	0,0319	109,33	10,68
2	0,0087	102,31	0,0295	101,33	0,96
3	0,0084	98,78	0,0282	97,00	1,80
4	0,0086	101,14	0,0297	102,00	0,85
5	0,0088	103,49	0,0322	110,33	6,61
6	0,0085	99,96	0,0334	114,33	14,36
7	0,0084	98,78	0,0287	98,67	0,11
8	0,0082	96,43	0,0275	94,67	1,83
9	0,0082	96,43	0,0356	121,67	26,17
			DQO leída PROMEDIO ($\overline{DQO}_{leida}$)	105,48	
			Desvío Estándar (So)	8,97	

Actividad 3: Repetibilidad del método

Para obtener estimaciones fiables de características de desempeño del método es esencial en los experimentos que implican análisis repetidos diseñarlo de manera de tener en cuenta todas las variaciones en las condiciones operativas esperables durante el uso rutinario del método; con el objetivo de determinar la variabilidad típica. La repetibilidad es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo[11]. En este ensayo se determinó el valor del límite de repetibilidad (r) a partir del cálculo de la Demanda Química de Oxígeno en una muestra de efluente industrial tratado (DQO leída efluente) y realizando 10 repeticiones en condiciones de repetibilidad

[9] DQO teórico: se calculó multiplicando la masa de KHP y el factor estequiométrico de la reacción KHP con el dicromato de potasio

[10] DQO leída: se determina utilizando la curva de calibración del método y el valor de absorbancia leído por el equipo (espectrofotómetro)

[11] La repetibilidad se refiere algunas veces como precisión "dentro de la serie de medida", "dentro de un lote" o "intra-ensayo"

definidas y establecidas por el laboratorio[12]. En la tabla 4 se pueden observar los valores obtenidos de absorbancia y DQO del efluente que permiten calcular la desviación estándar por repetibilidad, Sr, según la expresión (3), en la cual x_i es el valor de DQO leída del efluente en cada medición individual, $\bar{x}$ el valor promedio de DQO leída del efluente y n el número de repeticiones.

$$Sr = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (3)$$

Tabla 4: Datos de absorbancias y DQO $_{leída\ efluente}$ durante el ensayo experimental de repetibilidad del método (fuente: Informe de repetibilidad del método de ensayo generado por el laboratorio de Medio Ambiente de INTI-SORPAT)

Replicado	***Absorbancia***	***DQO $_{leída\ efluente}$ (mg/l)***
1	0,1271	421,70
2	0,1264	419,40
3	0,1276	423,30
4	0,1456	481,90
5	0,1277	423,60
6	0,1267	420,40
7	0,1322	438,30
8	0,1308	433,70
9	1,1296	429,80
10	0,1304	432,40
	DQO $_{leída}$ PROMEDIO ($\overline{DQO}_{leída}$)	432,40
	Desvío Estándar (Sr)	18,50

Con base en las normas ISO 5725[13] e ISO 3534[14] se establece que la desviación estándar S_r es útil para calcular un "límite de precisión". Esto permite al analista decidir si existe una diferencia significativa, a un determinado nivel de confianza, entre los resultados de los análisis por duplicado de una muestra obtenida en condiciones

[12] El número mínimo especificado de repeticiones varía con los diferentes protocolos, pero esta típicamente entre 6 y 15 para cada material utilizado en el estudio
[13] ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parts 1-6, ISO Geneva
[14] ISO 3534 Statistics – Vocabulary and symbols – Parts 1-3, ISO Geneva

especificadas. Por lo tanto, el límite de repetibilidad (r) se puede calcular a partir de la ecuación (4),

$$r = \sqrt{2} * t * Sr \quad (4)$$

donde el factor $\sqrt{2}$ refleja la diferencia entre dos mediciones, *t* es la *t-student* a dos colas para un determinado número de grados de libertad (que se refiere a la estimación del desvió estándar) y con el nivel de confianza requerido. Morrillas y col. (2016) han informado que, para un número relativamente grande de grados de libertad, $t \approx 2$ a nivel de confianza del 95%, por lo que el límite de repetibilidad se suele aproximar como:

$$r = 2{,}8 * Sr \quad (5)$$

debido a que es esencial establecer un valor de r independiente de la concentración para que sea aplicable en todo el rango de trabajo, se determinó el valor relativo del límite de repetibilidad del método - r% = 12,20 %[15] -, siendo necesario previamente calcular el valor de la desviación estándar relativa Sr% mediante la expresión,

$$Sr\% = \frac{Sr}{\bar{x}} * 100 \quad (6)$$

obteniendo un valor de Sr%= 4,28%, recordando que $\bar{x}$ representa el valor promedio de DQO leída del efluente.

Actividad 4: Incertidumbre del método

La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo (Morillas y col., 2016). Múltiples factores pueden conllevar a introducir lo que se conoce como incertidumbre en un método, por lo que es necesario establecer a priori posibles fuentes de incertidumbres asociadas al método. Particularmente debido a que el método analítico utilizado tiene una fuerte componente experimental los factores a considerar serán: homogeneidad de la muestra, volumen de alícuota de muestra a analizar, confirmación metrológica de los equipos involucrados, verificación del material de vidrio interviniente en el proceso de ejecución del ensayo, pureza de material de referencia, desvíos correspondientes a la repetibilidad e incertidumbres en la preparación de los patrones y en la curva de calibración.

[15] Valor determinado experimentalmente por el analista del laboratorio *(Técnico Ariel Acuña)*

Se puede considerar que la incertidumbre combinada (U_c) es una estimación de la desviación estándar y se calcula a partir de la adición de dos componentes fundamentales: la incertidumbre aleatoria, que se puede estimar a través de estudios de precisión del método - ie: repetibilidad, reproducibilidad- y la incertidumbre sistemática relativa a todo lo inherente a la veracidad del método. La evaluación de la incertidumbre aleatoria se vinculó puntualmente en esta actividad a lo que se definió como "incertidumbre de precisión" considerando el valor del desvío estándar de repetibilidad Sr, determinado en la actividad previa (actividad 3). La veracidad del método que constituye para este trabajo la incertidumbre sistemática se debe obtener de datos de desvió estándar en estudios de comparación en interlaboratorios[16]. La ecuación (7) se utilizó para calcular la incertidumbre relativa combinada, - Uc%= 4,28[17] -, empleando valores relativos asociados únicamente a la componente de precisión como desvío de repetibilidad.

$$U_c\% = \sqrt{Sr\%^2} \qquad (7)$$

Sin embargo, en la práctica, es necesario conocer una magnitud que defina el intervalo en el cual se encuentren la distribución de valores con un alto nivel de confianza que pueden ser razonablemente atribuidos al mensurando[18]. La ecuación (8) permite calcular la incertidumbre expandida relativa U, que se obtiene multiplicando la incertidumbre relativa combinada asociada a la estimación de salida por un factor de cobertura k[19],

$$U\% = \pm k * U_c\% \qquad (8)$$

finalmente, el valor de incertidumbre expandida relativa fue de 8,6 %[20], lo que implica que el intervalo de confianza para el método se puede expresar como $\bar{X} \pm U\%$, siendo $\bar{X}$: el valor promedio de Demanda Química de Oxigeno leída.

En base a los resultados obtenidos en cada una de las actividades antes descriptas, se da por confirmado el Método de ensayo MEFQ2 332 Determinación de DQO según SM-5220-D en efluentes para alto rango 100-900 mg/l.

[16] Sin datos para la estimación de la incertidumbre del método
[17] Valor determinado experimentalmente por el analista del laboratorio *(Técnico Ariel Acuña)*
[18] Mensurando: magnitud que se desea medir (VIM 2012)
[19] k = 2 con un nivel de confianza del 95% según Distribución Normal.
[20] Valor determinado experimentalmente por el analista del laboratorio *(Técnico Ariel Acuña)*

3.3.4 Relación entre los ácidos orgánicos volátiles y carbonato inorgánico total (relación FOS-TAC)

Con el fin de determinar el cociente de la concentración ácida y la capacidad compensadora del sustrato de fermentación, se han desarrollados análisis inherentes a: ácidos orgánicos volátiles (FOS) y carbonato inorgánico total (TAC). El valor de la relación FOS-TAC es un parámetro de control que permite evaluar los procesos de fermentación. En reportes bibliográficos se pueden encontrar valores óptimos y reglas empíricas para la evaluación de la relación FOS-TAC (Lossie y col., 2008).

El método analítico utilizado para la determinación de la relación FOS-TAC esta identificado como MEFQ2 330 -Determinación de FOS-TAC-. La técnica de titulación potenciométrica con titulante ácido sulfúrico 0,2 M se cuantifica con un pH-metro de mesada para valores de pH=5,0 y pH=4,4. Las mediciones de los valores de ácido titulante gastado se registran en ambos valores de pH y luego se calcularon los ácidos orgánicos volátiles, expresados en miligramos de ácido acético por litro (FOS)- ecuación (9)[21]- y los miligramos de carbonato inorgánico total expresados en carbonato de calcio por litro (TAC)- ecuación (10)[22] -que permiten determinar el valor de relación FOS-TAC.

$$FOS\left(mg\ Ac.\frac{Acético}{l}\right) = \left(\left(\frac{Cac}{0.05} * \frac{20}{g(muestra)} * (VpH4.4 - VpH5) * 1.66\right) - 0.15\right) * 500 \quad (9)$$

$$TAC\left(mg\frac{CaCO3}{l}\right) = \left(\frac{Cac}{0.2} * \frac{80}{g\ (muestra)} * VpH5 * 250\right) \quad (10)$$

Dos actividades se planificaron para la confirmación del método previamente descripto, actividad 1 – Ensayo en condiciones de repetibilidad – y actividad 2- Estimación de la incertidumbre- las cuales se describen a continuación:

Actividad 1: Ensayos en condiciones de repetibilidad

Se realizaron 8 mediciones en condiciones de repetibilidad en una porción analítica de una muestra de digestato (o digerido) proveniente del *biodigestor piloto*[23] instalado en el laboratorio de Medio Ambiente INTI-SORPAT. El límite de repetibilidad para este método analítico se calculó siguiendo el procedimiento detallado en la sección

[21] Ecuación de cálculo de FOS modificada según procedimiento interno de INTI San Luis
[22] Ecuación de cálculo de TAC modificada según procedimiento interno de INTI San Luis
[23] Biodigestor de 60 litros, actualmente en desuso por falencias en el diseño

3.3.3 (Demanda Química de Oxígeno, actividad 3: Repetibilidad del método). En la tabla 5 se listan los valores obtenidos de: ácidos orgánicos volátiles (FOS), carbonato inorgánico total (TAC) y relación FOS-TAC para cada replicado como así también el valor promedio de la relación FOS-TAC del digestor y el valor de desviación estándar de repetibilidad.

Tabla 5: Valores de FOS, TAC y relación FOS-TAC determinados experimentalmente

Replicado	***FOS***	***TAC***	***Relación FOS-TAC***
1	18016,47	6049,15	2,98
2	18047,63	5954,86	3,03
3	18512,35	5798,55	3,19
4	18509,66	5797,71	3,19
5	18266,54	6221,35	2,94
6	18147,83	6087,58	2,98
7	18321,66	5990,45	3,06
8	18662,86	5793,77	3,22
	Relación FOS-TAC PROMEDIO ($\overline{FOS - TAC}$)		3,07
		Desvío Estándar (Sr)	0,11

Se determinó el valor relativo del límite de repetibilidad del método -r%=10,30%[24]- siendo necesario previamente calcular el valor de la desviación estándar relativa, utilizando los datos de tabla y la ecuación (6) -Sr%= 3, 58-.

Actividad 2: Estimación de la incertidumbre

La estimación de la incertidumbre asociada al resultado de la determinación en la relación FOS-TAC se realiza siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.3.3. (Determinación de DQO, actividad 4: Incertidumbre del método). Siendo los valores de incertidumbre combinada Uc%=3,58% e incertidumbre expandida U%=7,16% respectivamente.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en las dos actividades previamente descriptas, se adoptó determinar la relación FOS-TAC en digeridos de

[24] Valor determinado experimentalmente por el analista del laboratorio *(Técnico Ariel Acuña)*

biodigestores anaeróbicos, conforme al método MEFQ2 330 -Determinación de FOS-TAC -.

3.4. Puesta en Marcha del Reactor diseñado

La puesta en marcha del reactor se planifico a partir de las prestaciones preestablecidas en el diseño del mismo (sección 3.2) en adición a la caracterización del inóculo y del sustrato en estudio (ver Anexo 2). El proceso de carga inicial del reactor requiere una proporción adecuada de inóculo y sustrato de manera de garantizar las condiciones necesarias para la digestión anaeróbica, como así también el funcionamiento del biodigestor. Las determinaciones y/o cálculos en lo inherente a cantidad de sustrato e inóculo a incorporar se determinó siguiendo el procedimiento descripto en el Anexo 3; resultandos necesarios un volumen de sustrato de 11 litros y un volumen de inóculo de 8 litros respectivamente.

En el diseño del biodigestor el volumen geométrico resulto con una capacidad de 30 litros, sin embargo, es necesario definir el volumen de operación efectiva del reactor. En diversas publicaciones se explicita el requerimiento que determina el volumen de trabajo - 80% del volumen geométrico del reactor-. Particularmente, y en concordancia con reportes de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), se definió un volumen de trabajo equivalente al 70 % de la capacidad del reactor, con el objetivo de garantizar una operación eficiente. Definido el volumen de trabajo del reactor - $V_{trabajo}$= 21 litros- y establecido el volumen de inóculo a adicionar al reactor; se debe verificar que dicho volumen no supere el 60 % del volumen de trabajo efectivo de operación (ver Anexo 3).

La metodología adoptada para el caso en estudio en la puesta en marcha del reactor consistió en reducir la carga inicial al 50% las cantidades de sustrato e inóculo determinadas respectivamente (tabla 6), adicionando en forma progresiva la alimentación y aumentando gradualmente la carga orgánica hasta llegar a completar el volumen efectivo de trabajo. Como así también en regular la cantidad de materia orgánica que se adiciono diariamente al reactor por unidad de volumen y tiempo; incrementos lentos de la carga aseguran una eficiente adaptación de los

microorganismos y evitan la acidificación del sistema por una sobrecarga de materia orgánica (ver Anexo 4).

Tabla 6: Volúmenes de carga inicial del reactor

Volumen	***Cantidad***
Volumen de sustrato inicial	5,5 litros
Volumen de inóculo inicial	4,0 litros
Volumen total de mezcla inicial	9,5 litros
Volumen disponible hasta completar carga	11,5 litros

Finalmente, hasta completar el volumen de trabajo, el reactor se alimenta sin realizar descargas, únicamente se extrae una porción de muestra para realizar las mediciones de monitoreo y control correspondiente. Una vez completo el volumen final de trabajo, es necesario adicionar al reactor, un volumen de sustrato equivalente al lodo que se retira para control y seguimiento, garantizando de esta manera el espacio de cabeza necesario para la acumulación del biogás. Así mismo, es importante señalar que la porción de muestra extraída –digerido- se deja sedimentar, lo que permite separar el lodo con carga microbiana de la fase líquida. Esta fase densa se incorpora al digestor junto con la porción de sustrato correspondiente, acción que evita el lavado del microbiota responsable de la generación de biogás.

CAPÍTULO 4

FUNCIONAMIENTO DEL REACTOR BIOLÓGICO – ANÁLISIS Y EVALUACIÓN

4.1 Introducción

El funcionamiento de los reactores biológicos en condiciones de operación óptima requiere a priori controles de calidad periódicos a partir de parámetros específicos como: pH, FOS, TAC, DQO, temperatura, los cuales permiten evaluar entre: la necesidad de incorporar sustrato o mantener la carga in situ hasta que se alcance el estado estacionario; acciones que conllevan a maximizar la eficiencia y capacidad del proceso.

En el capítulo precedente se definieron los parámetros de diseño del reactor en adición a la metodología necesaria para la puesta en marcha del mismo. Siendo necesario un esquema de operación que permita el análisis y evaluación en el funcionamiento del biodigestor diseñado. A continuación, se describirá secuencialmente todo lo inherente al arranque, funcionamiento y producción en el reactor biológico, como así también el análisis pertinente realizado en cada una de estas etapas.

4.2 Arranque del biodigestor

La inoculación del reactor comienza con la carga de 4 litros de purín de cerdo, volumen inicial de inóculo (ver tabla 6), en concordancia con lo descripto en la metodología de puesta en marcha; manteniendo las condiciones de operación: temperatura 30°C ± 1°C y frecuencia de agitación una vez al día durante 30 minutos; por un periodo de 72 horas sin alimentación. Este proceso permite la aclimatación del consorcio microbiano a las condiciones operativas de manera de recuperar la actividad biológica (disminuida por almacenamiento).

Luego, se procedió agregando la mezcla de alimentación, siendo necesario un acondicionamiento previo del sustrato. La biomasa de descarte utilizada como sustrato (SFyV) posee un pH ≈ 4,5 (Anexo 2 tabla A.2), valor inferior al pH óptimo para la producción de biogás (rango 6,5 a 7,5), razón por la cual se añadió bicarbonato de

sodio[25] para neutralizar. Además, el volumen inicial de sustrato (2,5 litros) se diluyó en 2,5 litros de agua, dilución imprescindible para facilitar la agitación y asegurar la homogeneidad de la mezcla.

Finalizada la carga del reactor, se estableció un cronograma de seguimiento de control y funcionamiento por un periodo de 7 semanas, realizando cada 5 días el registro de los parámetros pH y relación FOS-TAC para asegurar la estabilidad biológica, previo a cada carga de sustrato fresco, garantizando de esta manera la actividad continua del sistema y el control de la acidez (figura 4.1).

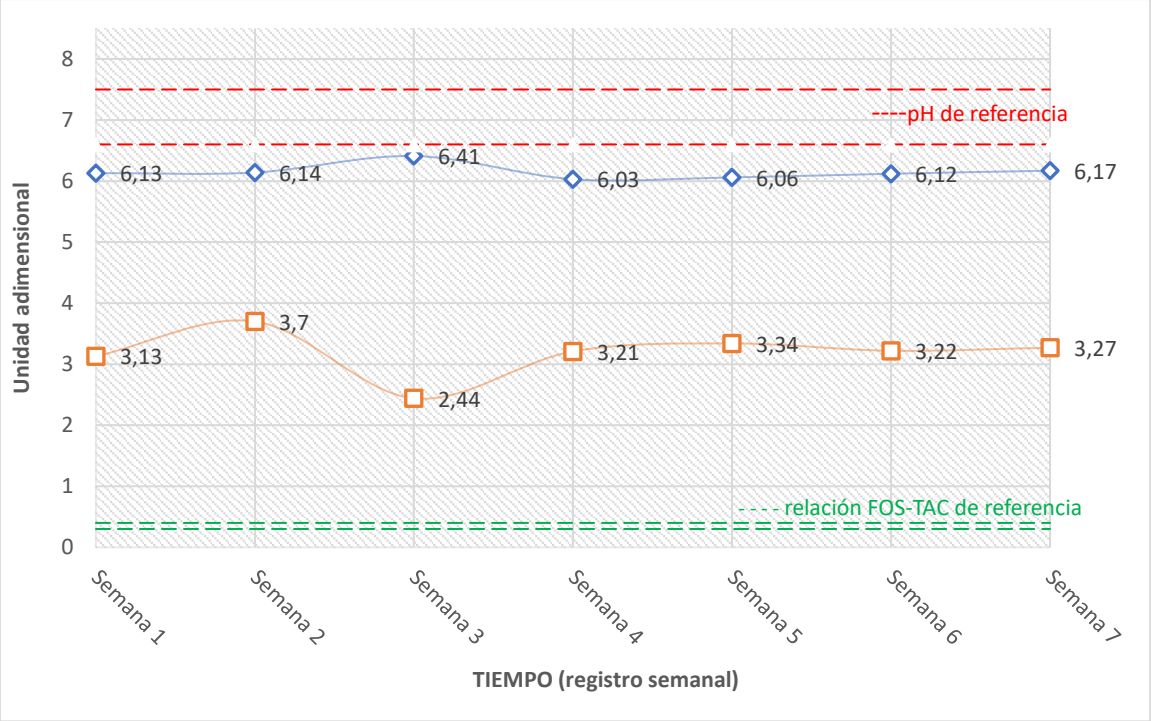


Figura 4.1: Registro parámetros en simultáneo; relación FOS-TAC (curva naranja) y pH (curva azul)

En bibliografía se encuentran reportes que indican que valores bajos de relación FOS-TAC [0,3-0,4] y un rango de pH entre 6,6-7,5 se relacionan con una fase estable del proceso de digestión anaeróbica (Lossie y col., 2008 , Polanco y col., 2015). Dado que el pH no se estabilizó durante el período estipulado de arranque y los valores obtenidos estuvieron por debajo del rango requerido; en adición al exceso de ácidos

[25] Por cada gramo de DQO se necesita 1 gramo de bicarbonato de sodio

grasos volátiles en relación con la alcalinidad (≈3,18 en promedio) se decidió parar la carga y vaciar el reactor para comenzar el arranque nuevamente.

Para el nuevo arranque del reactor, fue necesario caracterizar el inóculo y el sustrato, debido al tiempo de almacenamiento y de una modificación química (ver Anexo 5). Particularmente el inóculo, estiércol porcino, presentaba degradación por propio consumo endógeno; y el sustrato se constituyó a partir de mezclar el residuo orgánico - SFyV neutralizado con bicarbonato de sodio - con el inóculo recuperado del primer arranque del reactor, resultando un sustrato modificado químicamente (SFVQCO).

En esta segunda etapa, fue necesario, también, recalcular el caudal de carga del reactor debido a la variación en la concentración de Sólidos Volátiles en el SFVQCO (ver Anexo 6) y establecer una alimentación gradual hasta alcanzar el volumen de carga máximo; resultando el proceso de carga inicial del reactor en proporciones iguales de sustrato modificado químicamente e inóculo -$V_{sustrato\ inicial} = 5$ litros / $V_{inoculo\ inicial} = 5$ litros-. Así mismo, se estableció un periodo de 14 días para la adaptación del inóculo, garantizando de esta manera que el consorcio de microorganismos se aclimate al medio. En la tabla 7 se puede observar que, trascurrido el período de adaptación, el valor registrado de pH confirma que se logró la estabilidad del reactor biológico y la ausencia de inhibición por acidez.

Tabla 7: Valores del pH y fecha de determinación de ensayo

Valor de pH	***Fecha***
6,89	07/11/2022
6,85	09/11/2022
6,94	11/11/2022
6,99	15/11/2022
7,00	16/11/2022
6,96	19/11/2022

Luego, se procedió a realizar la primera carga de sustrato (SFyV) – $V_{sustrato} = 2$ litros -, siendo necesario acondicionar la misma previamente mezclando 1 litro de

residuo orgánico - SFyV procesado- con 1 litro de sustrato modificado químicamente SFVQCO con pH cercano a la neutralidad. Finalmente se adicionó la mezcla al biodigestor y transcurridos siete días se realizaron ensayos de los parámetros específicos pH, FOS y TAC (tabla 8), con el propósito de evaluar la estabilidad de la fermentación y el riesgo de acidificación como así también determinar la acidez o alcalinidad de la solución.

Tabla 8: Parámetros de seguimiento del reactor

Parámetro	***Valor***
pH	6,05
FOS (mg Ac Acético/l)	13122,00
TAC (mg CaCO3/l)	7132,25
relación FOS- TAC	1,84

Si bien, se mencionó previamente, que valores bajos de relación FOS-TAC [0,3-0,4] se relacionan con la estabilidad del proceso, dichos valores pueden variar dependiendo del sustrato utilizado. En bibliografía también se hace referencia a que la relación óptima FOS-TAC y el punto de mayor eficiencia del proceso se determinan mediante estudio de seguimiento a largo plazo. Sobre esta base, se estableció que el valor alcanzado - relación FOS-TAC = 1,84 - permite comprobar la estabilidad del reactor y continuar con las cargas de alimentación necesarias hasta alcanzar el volumen total de trabajo.

Finalizada la carga del biodigestor se estableció un cronograma de seguimiento de control y funcionamiento, realizando las mediciones de los parámetros de pH y relación FOS-TAC, que permitieron ajustar variables del proceso para mantener la estabilidad. En la tabla 9 se detalla el registro de: días en que se realizaron los ensayos, valores de los parámetros medidos y cantidades de alimentación adicionada de sustrato, agua y/o mezcla SFVQCO al reactor para completar el volumen de trabajo.

Tabla 9: Registro de control y funcionamiento del reactor

Día	***Relación FOS-TAC***	***pH***	***Alimentación de Reactor***
25/11/2022	1,84	6,05	--
06/12/2022	2,69	6,92	--
21/12/2022	2,45	6,79	--
26/12/2022	--(1)	6,97	--
28/12/2022	1,77	7,29	300 g de SFyV
03/01/2023	--(1)	7,29	--
05/01/2023	1,56	7,37	300 g de SFyV
11/01/2023	0,86	7,49	500 g de SFyV + 500 ml de agua
12/01/2023	--(1)	7,39	--
13/01/2023	--(1)	7,44	--
16/01/2023	0,86	7,49	500 g de SFyV +500 ml de agua
18/01/2023	0,90	7,36	--
20/01/2023	0,80	7,46	500 g de SFyV + 500 ml de mezcla SFVQCO
24/01/2023	--(1)	7,46	--
25/01/2023	0,93	7,53	500 g de SFyV +500 ml de agua
30/01/2023	--	7,36	--
01/02/2023	0,90	7,47	680 g de SFyV + 320 ml de agua
03/02/2023	0,89	7,22	700 g de SFyV + 300 ml de agua
06/02/2023	1,29	7,13	800 gramos de SFyV+ 200 ml de agua

--(1) *No se realizaron los ensayos de control ese día*

-- Sin registro; decisión operativa: no realizar el ensayo posterior a una carga de alimentación

Transcurridos dos meses de funcionamiento del biodigestor, en el cronograma de control se incluyó la extracción de un volumen de digerido equivalente a la alimentación adicionada con el fin de mantener constante el volumen de trabajo. Así mismo dado que el volumen de digerido extraído, contiene biomasa, se realizó una separación por decantación en conos Imhoff que permitió recuperar masa microbiana extraída (INODIG); y almacenar para reutilizar como sustrato. En la tabla 10 se puede observar el registro, por un período de cinco meses, del seguimiento del reactor en condiciones de estabilidad.

Tabla 10: Registro de control y funcionamiento del reactor

Día	***Relación FOS-TAC***	***pH***	***Extracción / Alimentación de Reactor***
10/02/2023	1,43	7,04	--/--
14/02/2023	1,84	7,38	1000 ml de digerido / 500 g de SFyV +500 ml de agua
23/02/2023	1,14	7,42	1000 ml de digerido / 100 g de SFyV + 900 ml de agua
27/02/2023	1,29	7,15	--/--
03/03/2023	0,98	7,66	1000 ml de digerido / 1000 g de sustrato
06/03/2023	1,12	7,19	--/--
08/03/2023	1,17	7,38	--/--
10/03/2023	1,17	7,63	1000 ml de digerido / 250 ml de inoculo +750 g de SFyV
13/03/2023	1,03	7,46	800 ml de digerido /-- (2)
14/03/2023	-- (1)	--(1)	--(3) / 818 g de SFyV
15/03/2023		7,07	--/--
17/03/2023	1,12	7,38	1000 ml de digerido / 750 g de SFyV + 250 ml de inoculo INODIG (**)
20/03/2023	0,92	7,37	800 ml de digerido / 705 g de SFyV
21/03/2023	-- (1)	7,04	--/--
23/03/2023	1,22	7,34	800 ml de digerido / 800 g de SFyV
27/03/2023	1,09	7,40	800 ml de digerido / 800 g de SFyV
28/03/2023	-- (1)	6,93	--/--
31/03/2023	1,17	7,43	1000 ml de digerido / 1000 g de SFyV
03/04/2023	-- (1)	7,03	--/--
05/04/2023	1,17	7,37	2500 ml de digerido / 2000 g de SFyV + 500 ml de inóculo INODIG (**)
08/04/2023	-- (1)	6,72	--/--
10/04/2023	2,05	6,76	--/--
12/04/2023	2,19	6,72	1000 ml de digerido / 1000 ml de inoculo INODIG (**)
14/04/2023	1,86	6,92	--/--
17/04/2023	1,77	7,05	--/--
20/04/2023	1,70	7,18	--/--
24/04/2023	1,38	7,48	1000 ml de digerido / 1000 g de SFyV
28/04/2023	1,55	6,99	--(3) / 1000 g de SFyV
02/05/2023	1,93	6,81	--(3) / 1000 ml de inóculo INODIG (**)
05/05/2023	1,64	7,05	--/--
08/05/2023	1,57	7,13	--/--
12/05/2023	1,40	7,33	1000 ml de digerido / 1000 g de SFyV
17/05/2023	-- (1)	6,84	--/--
18/05/2023	1,33	7,00	--/--
19/05/2023	-- (1)	-- (1)	--(3) / 1000 g de SFyV
24/05/2023	2,41	6,66	--(3) / 1000 ml de inóculo INODIG (**)
29/05/2023	1,86	7,02	--/--
31/05/2023	1,90	6,99	-- /--

01/06/2023	--[1]	--[1]	--[3] /300 g de SFyV
07/06/2023	1,76	6,95	-- /--
08/06/2023	--[1]	--[1]	--[3] / 585 g de SFyV

--[1] No se realizaron los ensayos de control ese día.

--[2] Operativamente se decide no incorporar sustrato.

--[3] Operativamente se decide no extraer digerido.

--/-- Sin registro. Operativamente se decide mantener condiciones de operación.

(**) Se adiciona INODIG para controlar: el pH del reactor, el consumo de ácidos orgánicos y evitar el lavado del reactor como consecuencia de extraer masa microbiana.

Los datos tabulados en la tabla 10, permiten evaluar a largo plazo la estabilidad del biodigestor, puntualmente los valores de: relación FOS-TAC ≈1,49 en promedio y pH≈7,18 indican un proceso de digestión anaeróbica estable y eficiente en la producción de biogás. Condición que, además, constituye un punto crucial en la validación del diseño del reactor y la operación del mismo.

4.3 Medición de biogás

Como se ha mencionado previamente la producción de metano es uno de los índices de comparación establecidos para evaluar la eficiencia del proceso de digestión anaeróbica. En este contexto, la cuantificación de la concentración de metano - CH_4 - en el biogás producido constituye un dato fundamental en la determinación del potencial energético del residuo orgánico tratado. En bibliografía se reportan diferentes métodos que permiten determinar el porcentaje de gas metano: cromatografía gaseosa (GC), espectrometría infrarroja (IR), absorción de CO_2 (Método de Orsat/Absorción Alcalina) o medición directa (Analizadores).

Particularmente en este trabajo se utilizó como metodología para medir la concentración de metano la absorción de CO_2 con soluciones alcalinas, método relativamente sencillo, económico y preciso para análisis volumétricos manuales que permite determinar el porcentaje de metano (%CH_4) por absorción de CO_2 a través de una solución alcalina concentrada. Cabe aclarar que, estas mediciones se realizaron como estimación volumétrica, en las condiciones experimentales del laboratorio. A continuación, se describe el procedimiento metodológico:

1- Se mide un volumen de biogás, con una jeringa de vidrio con capacidad de 20 ml (figura 4.2 a)).
2- Se inyecta el biogás (principalmente metano y dióxido de carbono) en un frasco de vidrio transparente; recipiente que contiene una solución básica concentrada, de KOH 1N (hidróxido de potasio) y timolftaleína un indicador de pH que presenta un color azul intenso en medios fuertemente básicos.
3- La base concentrada reacciona con el CO_2 presente en el biogás por absorción selectiva.
4- La proporción de biogás que no se disuelve en la solución alcalina, puntualmente el metano, se introduce en un segundo frasco de vidrio esmerilado y sellado que contiene agua (conectado al primer recipiente) donde la presión del gas empuja el agua hacia afuera a través de una conexión de salida (figura 4.2 b)).
5- El volumen de agua desplazada se recoge en una probeta graduada de vidrio borosilicato, siendo este volumen medido proporcional a la cantidad de metano presente en la muestra.

En la figura 4.2 se muestra el sistema de medición de gases por desplazamiento de líquido diseñado, a partir del material disponible en el laboratorio. Específicamente se construyó un set de medición que incluye dos frascos de vidrio (capacidades de 500 ml y 1000 ml respectivamente), tubos de conexión y un recipiente colector (probeta graduada 50 ml).

a) b)

Figura 4.2: Sistema de medición de gases. a) jeringa para inyección de biogás- b) set de medición de biogás

A partir del procedimiento previamente descripto, se realizaron los cálculos inherentes para la determinación del porcentaje de metano presente en la producción de biogás en el reactor; registrando en diferentes días el volumen de agua desplazado, para un volumen de muestra de biogás de 20 ml (tabla 11). Se puede observar en la tabla 11 que el valor registrado en el porcentaje de metano en un periodo de 6 meses es en promedio $\%\overline{CH_4} \approx 63{,}8$ condición que permite evaluar que el sustrato orgánico utilizado en la biodigestión genera un biogás de buena calidad (IDAE 2007 Biomasa: Digestores Anaeróbicos).

Tabla 11: Registro de volúmenes medidos y porcentaje de metano

Día	***Volumen de agua desplazado (ml)***[26]	$\%CH_4$[27]
19/04/2023	12,0	60,0%
24/05/2023	11,5	60,8 %
31/05/2023	12,5	62,5 %
13/06/2023	12,5	62,5 %
16/06/2023	13,0	65,0 %
23/06/2023	11,0	55,0 %
18/07/2023	14,0	70,0 %
31/07/2023	13,0	65,0 %
07/08/2023	13,0	65,0 %
09/08/2023	12,2	61,0 %
11/08/2023	12,3	62,0 %
29/07/2023	13,8	69,2 %
01/09/2023	12,8	64,0 %
04/09/2023	13,0	65,0 %
04/10/2023	14,2	70,0%
Promedio porcentaje de metano $(\overline{\%CH_4})$		63,8 %

4.3.1 Estimación de producción de biogás

También es imprescindible junto a la puesta en marcha del biodigestor, evaluar el potencial de generación de biogás que se espera obtener a partir del sustrato de frutas y verduras (SFyV) utilizado. En bibliografía es posible encontrar datos estimativos de producción de biogás a partir de residuos orgánicos, puntualmente la subsecretaria de energías renovables de la provincia de Santa Fe público en el año 2019 cantidades aproximadas de potencial generación de biogás a partir de diversos residuos - litros de biogás/ kg de sólido fresco - en condiciones mesofílicas; particularmente por cada kg de sólido fresco de desechos de huerta se generan 50 litros de biogás (Vernero Moreno, 2011, Groppelli y col., 2015).

[26] Los valores de volumen desplazado corresponden a mediciones promedio de triplicados

[27] $\%CH_4 = \frac{V_{desplazado}}{V_{muestra}} * 100$

La estimación en la producción de biogás en el caso de estudio, junto con eficiencia del reactor diseñado; se constató determinando la cantidad de sustrato frutas y verduras que debía alimentarse al biodigestor para obtener a partir del contenido energético del residuo la máxima producción de biogás. Siendo necesario, además, en concordancia con limitaciones geométricas en la capacidad de almacenamiento del biogás, restringir la alimentación de SFyV de manera de obtener un volumen de biogás igual a la capacidad del acumulador de gas diseñado - Volumen gasómetro = 20 litros -.

Dado que el rendimiento específico de los residuos de frutas y verduras puede variar, se realizaron pruebas que permitieron verificar la eficiencia entre la carga de sustrato y el volumen de biogás obtenido. El procedimiento experimental se realizó en diferentes días a partir de las actividades que se describen a continuación:

1.- Vaciar el gasómetro: se elimina el biogás residual del ciclo anterior para garantizar que la medición sea solo del gas generado en el ciclo analizado.

2.- Cargar 400 gramos de sustrato: se introduce la materia orgánica en el digestor para iniciar la descomposición anaeróbica.

3.- Dejar por un período de 48 horas: tiempo de incubación necesario para que el consorcio microbiano descomponga la materia.

4.- Medir volumen de biogás acumulado en el gasómetro: se registra la cantidad de gas generado para calcular la tasa de producción.

5.- Se repite por tres ciclos.

Finalizado el procedimiento antes descripto, se pudo confirmar una producción de biogás de 20 litros, valor que corrobora que se maximiza la energía de los residuos.

4.4 Determinación de biodegradabilidad anaeróbica

Como se especificó en el capítulo 2 -sección 2.3.4-; existen diversos métodos que permiten determinar la biodegradabilidad anaeróbica en residuos orgánicos. Asimismo, se mencionó que dicho parámetro representa el grado de variación en las características fisicoquímicas del residuo orgánico debido a la degradación mediante la acción de los

microorganismos. En este contexto, es habitual expresar como biodegradabilidad anaeróbica al porcentaje de sustancia que se degrada en un periodo de tiempo dado (Baily, 2015) siendo entonces fundamental en los procesos de digestión anaeróbica realizar los cálculos inherentes a la biodegradabilidad del sustrato utilizado de manera de optimizar el proceso, predecir el rendimiento de biogás y metano como así también evaluar posibles inhibiciones.

En el caso de estudio, se procedió a determinar el porcentaje de biodegradabilidad anaeróbica, con base en la reducción de la materia orgánica medida por la Demanda Química de Oxígeno en condiciones anaeróbicas estables. Una disminución elevada en el valor de la DQO del sustrato evaluado al inicio del proceso (sustrato crudo) y la salida del mismo (digestato -efluente tratado) indica una alta eficiencia del sistema anaeróbico para convertir la contaminación en biogás (mayoritariamente en metano y dióxido de carbono). En concordancia con la metodología descripta en el capítulo 3 - sección 3.3.3; se calculó la DQO de una muestra de digerido DQO_{final}=26593 mg/l y se comparó con el valor determinado al iniciar el ensayo $DQO_{sustrato}$ (ver Anexo 2) resultando un valor porcentual de biodegradabilidad anaeróbica de aproximadamente 52 %[28].

4.5 Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica (AME)

En los procesos biológicos también es necesario predecir la actividad metanogénica específica con el objetivo de cuantificar la capacidad de producción máxima de metano por el grupo de microorganismos anaerobios presentes en la biomasa (Bres y col., 2022). La AME es una herramienta que evalúa el comportamiento de la biomasa y determina la carga orgánica máxima que puede aplicarse a un reactor, con el fin de examinar la biodegradabilidad de los sustratos y la posibilidad de selección de inóculos (Vivanco, 2018). En la actualidad existe una gran cantidad de bibliografía inherente a desarrollos de ensayos para determinar la actividad metanogénica específica de diferentes inóculos; particularmente, en este trabajo se realizó la determinación en condiciones controladas de laboratorio de manera de predecir la máxima conversión del sustrato orgánico a metano. Teniendo en cuenta el equipamiento disponible en el

[28] $\%Biodegradabilidad = 100 * \left(1 - \frac{DQO_{final}}{DQO_{Sustrato}}\right)$; información proporcionada por la EEAOC

laboratorio, la metodología que se utilizó para el desarrollo del ensayo de manera de protocolizar el mismo se describe detalladamente en el Anexo 7. Resultando, un valor promedio cuantificable de $\overline{AME}$=0,0063 g DQO/g SVi.d, valor que se encuentra en el límite superior del rango de valores reportado para este tipo de inóculo[29], lo que implica que es apto para su uso. Esto valida la alta calidad del inóculo para este procedimiento.

Cabe aclarar que, en este trabajo la evaluación de la actividad metanogénica especifica del inóculo, mediante el procedimiento descripto en el Anexo 7, no se aplicó en la definición de la puesta en marcha del reactor. Puntualmente se utilizó como complemento para obtener información sobre la capacidad y/o calidad del inóculo. Asimismo, se pudo constatar durante el procedimiento de medición, que el ensayo presentaba dificultades operativas inherentes a obstrucciones causadas por precipitado de hidróxido de sodio en mangueras y agujas del equipamiento empleado.

[29] Valores de referencia de AME para estiércoles: (0,001-0,006 $\frac{g\ CH_4-DQO}{gSV.d}$). Información proporcionada por Departamento de Evaluación y Control de la Contaminación- Dirección Química Ambiental Sustentable-Subgerencia Operativa de Química y Ambiente- INTI

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se diseñó un biodigestor anaeróbico a escala de laboratorio con el objetivo de proponer una alternativa para el tratamiento de residuos orgánicos. El reactor biológico, se diseñó puntualmente para procesar mezclas de residuos de frutas y verduras provenientes del Mercado Concentrador emplazado en la ciudad de Neuquén. La característica básica de este diseño fue identificar condiciones fisicoquímicas requeridas para la instalación, puesta a punto y seguimiento del biodigestor relacionada con la obtención de la máxima producción de biogás.

Las técnicas analíticas y/o ensayos estandarizados se utilizaron como herramienta para la obtención de información confiable sobre diversos aspectos del comportamiento del reactor biológico, particularmente en lo inherente al proceso de digestión anaeróbica. Estas técnicas constituyeron metodologías con protocolos de laboratorio, proporcionando integradamente la caracterización y cuantificación del proceso para su posterior diseño y desarrollo de controles de calidad periódicos para el funcionamiento óptimo del reactor.

Con el fin de contextualizar el trabajo del diseño del biodigestor anaeróbico que constituyó uno de los ejes principales del presente trabajo, se incluyó una síntesis con los principales factores que afectan e influyen en el proceso de digestión anaeróbica, como así también, enfoques y diseños que se pueden utilizar en el diseño de reactores biológicos. Debido a ciertas limitaciones de disponibilidad y accesibilidad de equipamiento de laboratorio, se consideró la alternativa de construir un biodigestor tanque agitado de carga semicontinua en pequeña escala. Sobre esta base, el diseño experimental se adecuó a condiciones operativas viables para un proceso anaerobio en función de reportes técnicos y publicaciones científicas. En este sentido, se identificó claramente las condiciones climáticas de la zona geográfica y las características del sustrato de residuo de frutas y verduras a procesar.

Se discutió la significación y posibilidad de evaluar los parámetros específicos pH, FOS, TAC, DQO, temperatura en el reactor biológico. Se concluyó que el funcionamiento del reactor en condiciones de operación óptima requiere controles de

calidad periódicos, pudiendo predecirse en forma directa la necesidad de incorporar sustrato o mantener la carga in situ hasta alcanzar el estado estacionario.

A partir de la inoculación del reactor, se llevó a cabo la aclimatación del consorcio microbiano en condiciones operativas preestablecidas para recuperar la actividad biológica, utilizando el volumen inicial de inóculo requerido. Se analizó y caracterizó la biomasa de descarte a emplear como sustrato en el proceso adecuando a un pH óptimo para producción de biogás.

Se evaluaron, finalizada la carga del reactor, las diferencias entre los registros obtenidos mediante el cronograma de seguimiento de control y funcionamiento de los parámetros pH y relación FOS-TAC por un periodo de siete semanas, contextualizando dicha evaluación con reportes publicados de procesos de digestión anaeróbica. Las diferencias registradas con los valores de referencia se discutieron en términos de una fase estable del proceso. El análisis de ambos parámetros en los resultados numéricos permitió concluir que la principal causa de la diferencia en el valor del pH es que el proceso no se estabilizó durante el período estipulado de arranque; en adición al exceso de ácidos grasos volátiles en relación con la alcalinidad. Por lo tanto, se detuvo el proceso de biodigestión anaeróbica, vaciando el reactor para iniciar un nuevo arranque del reactor con condiciones iniciales modificadas para el inóculo y sustrato respectivamente. La comparación numérica de los parámetros pH y relación FOS-TAC en esta segunda etapa mostró que transcurrido el período de adaptación del inóculo se logró la estabilidad del reactor biológico y la ausencia de inhibición por acidez. Los valores de los parámetros de control registrados durante los meses de funcionamiento del biodigestor garantizaron condiciones de estabilidad. La consideración de adicionar, durante el arranque del reactor, alimentación con una mezcla de sustrato modificado químicamente, hasta que se llegó al régimen estacionario, para luego ser alimentado con sustrato de frutas y verduras, puso en evidencia la estabilidad del proceso a nivel de pH.

Con el fin de comparar la eficiencia en la producción de biogás del residuo orgánico tratado con valores de potencial energético reportados en bibliografía, se analizó el porcentaje de gas metano. Se propuso llevar a cabo un proceso evolutivo por un periodo de seis meses registrando la cantidad de metano presente en la producción de

biogás del reactor. De esta forma, con la información disponible, se evaluó que el sustrato orgánico utilizado genera un biogás de buena calidad.

Los valores del parámetro - litros de biogás/ kg de sólido fresco - en condiciones mesofílicas que se obtuvieron de la estimación en la producción de biogás en el caso de estudio, fueron analizados tomando como referencia valores preexistentes en bibliografía. A partir de dicho análisis y de las limitaciones geométricas en la capacidad de almacenamiento de biogás en el equipo diseñado, se propuso una metodología para estimar a partir del contenido energético del residuo la máxima producción de gas, con inclusión de la cantidad de sustrato de frutas y verduras a alimentar en el proceso.

De lo expuesto, puede concluirse que el biodigestor anaeróbico diseñado representa una alternativa viable en el procesamiento de residuos orgánicos, de frutas y verduras, con relación a la generación de energía renovable. El diseño propuesto en este trabajo permite evaluar adecuadamente los parámetros de control necesarios para determinar la estabilidad del proceso fermentativo. Las técnicas analíticas asociadas en este trabajo fueron las adecuadas para conocer el estado del proceso de fermentación y definir las acciones a tomar.

Con los resultados de este trabajo, se cuenta con la base para poder construir un esquema a mayor escala que el diseñado, con respecto al procesamiento de grandes volúmenes de residuos orgánicos y su influencia en otorgar valor agregado al residuo generado.

ANEXOS

Anexo 1: Detalles accesorios para la construcción del biodigestor

Tabla A.1: Listado de accesorios para la construcción de biodigestor

Cantidad	***Pieza***	***Característica***	***Aplicación***
1	Tanque cilíndrico	Material: polietileno de alta densidad (PEAD) Capacidad: 30 litros	Reactor
1	Llave de paso	Material: policloruro de vinilo (PVC) Diámetro de conexión: 19 mm paso de rosca: ¾ pulgada- unión doble	Salida biogás
1	Reducción	Material: PVC Tipo Roscada Reducción de: ¾ a ½ pulgada	Salida conexión biogás
1	Llave de paso	Material: PVC Diámetro: ½ pulgada Tipo: Válvula esférica	Salida Digerido
1	Conexión con brida	Material: PVC Roscada Diámetro: 1 pulgada	Entrada para alimentación
2	Conexión con brida	Material: PVC Roscada Diámetro: ½ pulgada	Conexión caño camisa del eje Salida de efluente o digerido
2	Conexión con brida	Material: PVC Roscada Diámetro: ¾ pulgada	Conexión caño contenedor de sensor de temperatura Salida biogás
1	Unión	Material: PVC Diámetro. 1 pulgada	Conexión caño de alimentación
1	Unión	Material: PVC Diámetro: ½ pulgada	Conexión caño camisa de eje de agitación
1	Caño	Material: PVC Diámetro: 1 pulgada Longitud: 20 cm	Alimentación
1	Caño	Material: PVC Diámetro: ½ pulgada Longitud: 25 cm	Caño camisa de eje
1	Caño	Material: PVC Diámetro: ½ pulgada Longitud: 16 cm	Conexión de eje
10	Bridas	Material reciclado de goma	Unión con bridas
1	Unión Roscada	Material: PVC Diámetro. ¾ pulgada	Soporte temperatura
1	Bureta recta	Material: vidrio borosilicato reciclada de 50 ml	Soporte para sensor de temperatura
1	Estructura soporte	Material: hierro caño rectangular hueco	Soporte de reactor y motor de agitación
2	Varillas roscadas	Material: hierro zincado	Fijación del reactor a la estructura

Cantidad necesaria de:

- *Tornillos y arandelas para las varillas roscadas*
- *Pegamento sellador de silicona*
- *Adhesivo sellador para caño de PVC*
- *Masilla epoxi de dos pegamentos para sellado de extremo de bureta*

Anexo 2: Caracterización de sustrato e inóculo

- Sustrato

El residuo utilizado está constituido de una proporción de biomasa orgánica de descarte (frutas y verduras provenientes del Mercado Concentrador de Neuquén), que previo a su caracterización, fue necesario homogenizar mediante un procesador de alimentos, lo que permitió triturar hasta obtener una mezcla uniforme (de consistencia similar a una pasta). En la mezcla orgánica: sustrato de frutas y verduras (SFyV), se utilizaron fracciones másicas variables de cada residuo, de acuerdo al muestreo realizado (una vez a la semana) y disponibilidad de residuos generados durante la jornada de muestreo.

El contenido de materia orgánica en el sustrato puede determinarse a partir de los parámetros: Sólidos Totales (ST), Sólidos Fijos (SF) y Sólidos Volátiles (SV), y Demanda Química de Oxígeno (DQO). La caracterización de una porción de muestra de sustrato, adecuada según protocolo (sección 3.3) se realizó obteniendo los valores de cada uno de estos parámetros en adición al valor del pH como se puede ver en la tabla A.2.

Tabla A.2: Valores de caracterización del sustrato

SUSTRATO: RESIDUOS ORGÁNICOS

Ensayo	**Valor**
ST (mg/l)	41789,00
SF (mg/l)	4370,33
SV (mg/l)	37418,67
DQO (mg/l)	55029,00
pH	4,50

- Inóculo

Al igual que el sustrato, el inóculo -consorcio de microorganismos utilizado para realizar el cultivo microbiano- se caracterizó a partir de análisis fisicoquímicos (tabla A.3). Cabe aclarar que el inoculo empleado está conformado por residuos provenientes

de un establecimiento de porcicultura –Institución Fundación Familia- emplazado en Neuquén.

Tabla A.3: Valores de caracterización de inóculo

Inóculo: PURIN DE CERDO

Ensayo	**Valor**
ST (mg/l)	94888,33
SF (mg/l)	17691,33
SV (mg/l)	77197,00
pH	6,37

Anexo 3: Determinación volumen de carga inicial de sustrato e inóculo

- Cálculo de volumen de carga inicial de sustrato.

El volumen de carga inicial del sustrato puede determinarse estableciendo una relación de proporciones entre: el valor de concentración de Demanda Química de Oxigeno del sustrato caracterizado DQO=55,03 g/l y un valor de concentración límite de DQO equivalente a 5 g/l (recomendación de la EEAOC) resultando:

$$V_{sustrato} = \frac{55{,}03\ g}{5\ g/l} = 11{,}01\ l\ \approx 11{,}00\ l$$

- Cálculo de volumen de carga inicial de inóculo

La carga inicial del inóculo, puntualmente el volumen inicial -$V_{inóculo}$- se calculó relacionando el valor de caracterización en el inóculo de Sólidos Volátiles –$SV_{inóculo}$= 77,20 g/l- con el mayor valor de referencia reporta en bibliografía que garantiza la operación eficiente del biodigestor –$SV_{referencia}$= 10 g/l

$$V_{inóculo} = \frac{77{,}20\ g}{10\ g/l} = 7{,}72\ l$$

Resultando un volumen inicial de inóculo a adicionar al reactor de 8 litros; equivalente al 38% del volumen efectivo de operación.

Anexo 4: Cálculo de caudal de alimentación

Para un reactor mesofílico el valor de la velocidad de carga orgánica (VCO) puede calcularse en función de la concentración de Sólidos Volátiles del sustrato a partir de la ecuación (A.1):

$$VCO\ (\frac{kg}{m^3 * d}) = \frac{\left(SV\ sustrato\ (\frac{kg}{m^3})\right) * Q_{Carga\ de\ aliementación}(\frac{m^3}{d})}{Volumen\ de\ trabajo\ (m^3)} \qquad (A.1)$$

En bibliografía se ha reportado que, dependiendo del tipo de sustrato, la cantidad de materia orgánica biodegradable a introducir en el biodigestor oscila en el rango 3-5 kg SV/m^3*d garantizando una producción óptima de biogás. Valores de VCO demasiados altos (mayores a 6,4 kg SV/m3*d) disminuyen la eficiencia en la digestión anaeróbica como consecuencia de la inhibición de la microflora.

El cálculo del caudal Q de alimentación - Q=1,68 l/d - se determinó fijando el valor de velocidad de carga orgánica 3kg SV/m^3*d en concordancia con el límite inferior del rango sugerido,

$$Q\left(\frac{l}{d}\right) = \frac{3\ \left(kg\frac{SV}{m^3} * d\right) * 0{,}021\ (m^3)}{37{,}43\ \left(kg\frac{SV}{m^3}\right)} * \frac{1000\ l}{1\ m^3} = 1{,}68\ (\frac{l}{d})$$

Anexo 5: Segunda caracterización de sustrato e inóculo

Tabla A.4: Valores de parámetros de caracterización del sustrato e inóculo, segunda etapa

Parámetro	***SUSTRATO (SFVQCO)***	***INÓCULO: PURIN DE CERDO***
ST (mg/l)	52570,00	66130,00
SF (mg/l)	17900,00	21480,00
SV(mg/l)	34670,00	14870,00
DQO (mg/l)	144640,00	67190,00
pH	7,08	6,80

Anexo 6: Cálculo de caudal de alimentación: segundo arranque

El cálculo del caudal de alimentación para el segundo arranque; se determinó relacionando la concentración de Sólidos Volátiles del sustrato SV_{SFVQCO}=34,67 kg SV/m^3; con el valor de velocidad de carga orgánica y volumen de carga de alimentación establecido previamente (ver Anexo 4).

$$Q\left(\frac{l}{d}\right) = \frac{3\ \left(kg\frac{SV}{m^3} * d\right) * 0{,}021\ (m^3)}{34{,}67\ (kg\frac{SV}{m^3})} * \frac{1000\ l}{1\ m^3} = 1{,}82\ \left(\frac{l}{d}\right)$$

Anexo 7: Ensayo Actividad Metanogénica Específica (AME)

Para el diseño experimental del ensayo AME, se utilizaron reactores *batch*-triplicado + blanco -, los cuales son botellas de vidrio transparentes que contienen inercia química entre el medio y el vidrio, de 500 ml de capacidad y resistentes a temperaturas moderadas (hasta 50 ºC) y presiones (hasta 10 bar)[1]. El volumen de trabajo que se adicionó en los reactores se calculó considerando no sobrepasar el 80 % del volumen útil del tubo, en adición de garantizar que el ensayo se lleve a cabo en condiciones de hermeticidad durante todo el periodo. Cada reactor estuvo provisto de una tapa de material plástico simil silicona (favorece el cierre hermético), con orificio para anexar un set de infusión macrogotero (vías para suero) lo que permitió conectarlos a una botella invertida que contenía una solución alcalina (NaOH 1N). Finalmente, para mantener las condiciones de temperatura del ensayo se utilizó un baño termostático Marca JP SELECTA[2], seteado a una temperatura de 30°C ± 2°C (condiciones mesofílicas), sumergiendo en el mismo los cuatro reactores (figura A1).

Figura A.1: Equipo para la determinación de AME

[1] Según especificidad reportada para botellas de vidrio
[2] Identificado según el sistema de Gestión de Calidad del laboratorio como: INTI-SORPAT N°423

Para proceder con el ensayo es necesario a priori definir y/o fijar algunas condiciones operativas establecidas como: sustrato patrón, el blanco, los volúmenes (efectivo y del espacio de cabeza (*headspace*)) y la relación S/I (sustrato/inoculo); en la tabla A.5 se listan las mismas junto con la descripción en cada caso.

Tabla A.5: Condiciones operáticas para ensayo AME

Condición operativa	***Descripción***
Sustrato Patrón	Solución de acetato de sodio: sustrato estándar de alta solubilidad y rápida biodegradabilidad, utilizado como referencia de control del ensayo.
Blanco	En cada ensayo debe considerarse un blanco (inóculo solo) en función de evaluar la producción de metano residual debido al decaimiento endógeno
Headspace	Se fijó un 20 % de volumen de headspace, espacio necesario para la acumulación y desplazamiento del biogás desprendido de la fase líquida
Relación S/I	S/I= 0.5, valor de referencia reportado en bibliografía (Chernicharo y col. 2007)

Además, y en concordancia con el protocolo que se desarrolló para el ensayo es fundamental especificar y determinar el volumen inicial de inóculo y el volumen inicial de sustrato patrón. En bibliografía se reportan valores teóricos de referencia relativos a concentración de inóculo -rango: 1,5 – 3,0 g de SV/l-; como así también de concentración de DQO de acetato de sodio -100 g DQO/l-. En consecuencia, para determinar el volumen inicial del inoculo (V_1) se fijó un valor de concentración final de inoculo C_2=2,5 SV g/l (valor que se encuentra en el rango mencionado anteriormente) y utilizando relación de proporcionalidad de mezclas a partir de los valores de concentración de inóculo inicial C_1≈15 g SV/l[3]; volumen final de trabajo V_2=400 ml[4], se calculó el volumen inicial del inoculo obteniéndose un valor de V_1= 67 ml[5].

Asimismo, previo a determinar el volumen inicial de sustrato patrón, se llevó a cabo la preparación de la solución de acetato de sodio, a partir de una reacción de neutralización entre ácido acético e hidróxido de sodio, la cual tendrá un valor de pH

[3] Valor asumido para cálculo; valor real de caracterización SV/l =14871,25 mg/l (tabla A.4)
[4] Valor determinado considerando el *Headspace* necesario en cada reactor
[5] Equivalente a la masa inicial de inoculo, m_1=67g; a partir de considerar que la densidad del inóculo es ~ 1 g/ml por contenido de humedad superior al 98 %

cercano a 7. La preparación in-situ se realizó en concordancia con la técnica analítica proporcionada por la EEAOC, la misma indica que se requieren 63 ml de ácido acético y cantidad necesaria y/o suficiente de hidróxido de sodio, reactivo sólido, para la reacción de neutralización.

A continuación, se describen los pasos procedimentales para la preparación:

- En un matraz con capacidad de 1000 ml, se prepara la solución disolviendo 60 ml de reactivo ácido acético en aproximadamente 800 ml de agua destilada.
- Luego se agregan pequeñas cantidades de reactivo sólido - hidróxido de sodio-, y se determina el pH.
- Finalmente, cuando el valor de pH es neutro, se procede a incorporar el ácido acético restante (3 ml) y se completa el volumen del matraz con agua destilada.

El volumen inicial de sustrato patrón (V_1) que debe adicionarse a cada reactor se calculó con relación de proporcionalidad de mezclas fijando el valor de: concentración final de ensayo de DQO: C_2= 1,25 g DQO/l, volumen final de trabajo V_2=400 ml, y concentración de acetato de sodio inicial C_1=100 g DQO/l.; resultando un valor inicial de volumen de sustrato patrón de V_1= 5 ml.

El ensayo requiere, también, que inicialmente se incorporen junto con los volúmenes de sustrato e inóculo soluciones de micro y macro nutrientes que constituyen el medio nutritivo imprescindible para asegurar las condiciones óptimas de desarrollo de los microorganismos, en cada uno de los reactores *batch*. En las tablas A.6 y A.7 se listan las soluciones requeridas junto con las especificidades en la preparación de las mismas.

Finalizada la especificación de parámetros iniciales requeridos para el ensayo de determinación de actividad metanogénica específica se procedió con la ejecución del ensayo. Cabe aclarar que el sistema diseñado permite medir el biogás generado por el método de desplazamiento, metodología que implica una medida indirecta por desplazamiento volumétrico de la solución de NaOH 1 N. El volumen desplazado de hidróxido de sodio se recoge en probeta graduada, siendo el equivalente a la producción de metano generado en cada reactor en estudio. El volumen de metano medido en el

Tabla A.6: Soluciones de Macronutrientes

MACRONUTRIENTES

Solución	**Preparación de la solución**		
	Concentración de la Solución (g/l)	***Masa pesada (g)(*)***	***Volumen de matraz (ml)***
NH_4Cl	85	4,2501	50
KH_2PO_4	37	1,8514	50
$CaCl.2H_20$	8	0,4006	50
$MgSO_4.7H_20$	9	0,4498	50

(*)Precisión 10^{-4} balanza analítica

Tabla A.7: Soluciones de Micronutrientes (Elementos trazas)-Agente Reductor

MICRONUTRIENTES (elementos trazas)

Solución	**Preparación de la solución**		
	Concentración de la Solución (mg/l)	***Masa pesada (g)(*)***	***Volumen de matraz (ml)***
$CoCl_2.6H_20$	1000	0,0509	50
$NiCl_2.6H_20$	35	0,0036	100
$CuCl_2.2H_20$	15	0,0016	100
$(NH_4)6Mo_7O_{24}.24H_20$	45	0,0045	100
$ZnCl_2$	25	0,0026	100
$EDTA$	500	0,0258	50
H_3BO_3	25	0,0025	100
$MnCl.4H_20$	250	0,0125	50
$FeCl_3.6H_20$	1000	0,1005	50
$NaHCO_3$	--	0,05	50
Agente reductor (se adicionó a cada reactor la misma cantidad de masa) (*)			
$NaS.H_20$	0,0800 gramos		

(*)Precisión 10^{-4} balanza analítica

tiempo (medición diaria), se graficó como volumen acumulado de metano en función del tiempo de incubación, como se puede observar en la figura A.2.

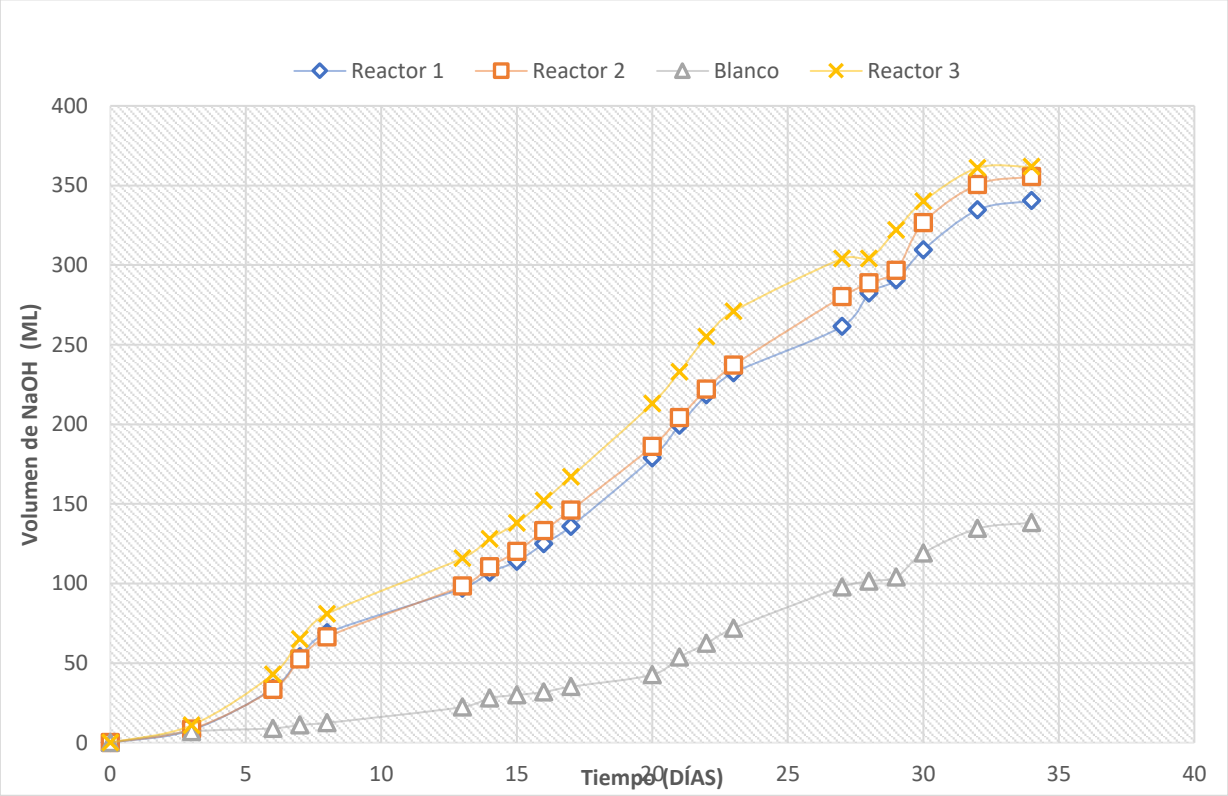


Figura A.2: Curvas de volumen acumulado de metano versus tiempo, reactores batch - triplicado + blanco- durante el ensayo AME

Diversos reportes indican que el ensayo AME finaliza cuando la producción acumulada de metano sale de la fase exponencial y entra en la fase estacionaria, condición que puede verificarse en los valores de volumen de metano reportados a partir de los 32 días de iniciado el ensayo; amesetamiento de las curvas (figura A.2). La actividad metanogénica específica en cada uno de los reactores del ensayo se calculó a partir de la ecuación (A.2)[6]

$$AME\left(\frac{gDQO}{gSVi.d}\right) = \frac{pendiente\left(\frac{Nml\ CH_4}{d}\right) * 64\left(\frac{gDQO}{mol\ CH_4}\right) * mol\frac{CH_4}{22400Nml\ CH_4}}{masaSVi\ (g)} \qquad (A.2)$$

[6] Metodología basada en capacitación de entrenamiento en Ensayos de Digestión Anaeróbica del Departamento de Evaluación y Control de la Contaminación- Dirección Química Ambiental Sustentable- Subgerencia Operativa de Química y Ambiente- INTI

en dónde: *pendiente* es el valor de la pendiente obtenida de la curva que representa el volumen acumulado de metano en el tiempo; 64 y 22400 son factores de conversión vinculado a la estequiometría y corrección de condiciones de presión y temperatura respectivamente; siendo SV_i la concentración de Sólidos Volátiles de inóculo expresado en unidades de masa (g/g)[7].

En las figuras A.3, A.4 y A.5 se puede observar la evolución del volumen acumulado de metano en el periodo de ensayo en cada reactor, junto con el ajuste lineal realizado que permitió determinar el valor de la pendiente, dato necesario para el cálculo de la actividad metanogénica especifica vinculada a cada reactor.

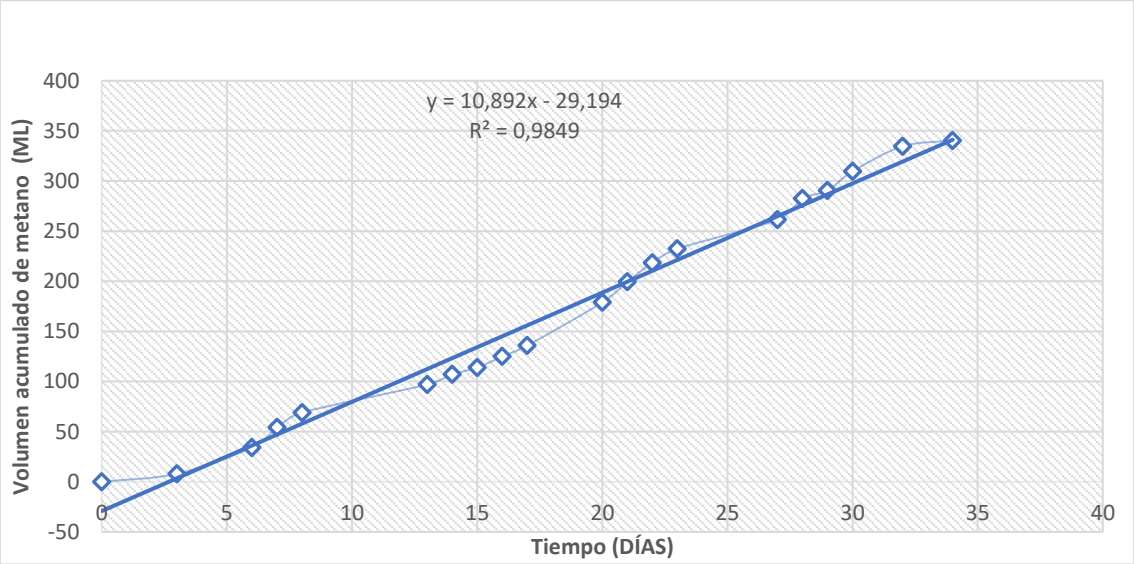


Figura A.3: Curva de volumen acumulado de metano versus tiempo, reactor 1

[7] SV_i =0.077 g SV/gi a partir de considerar que la densidad del inóculo es ~ 1 g/ml por contenido de humedad superior al 98 %

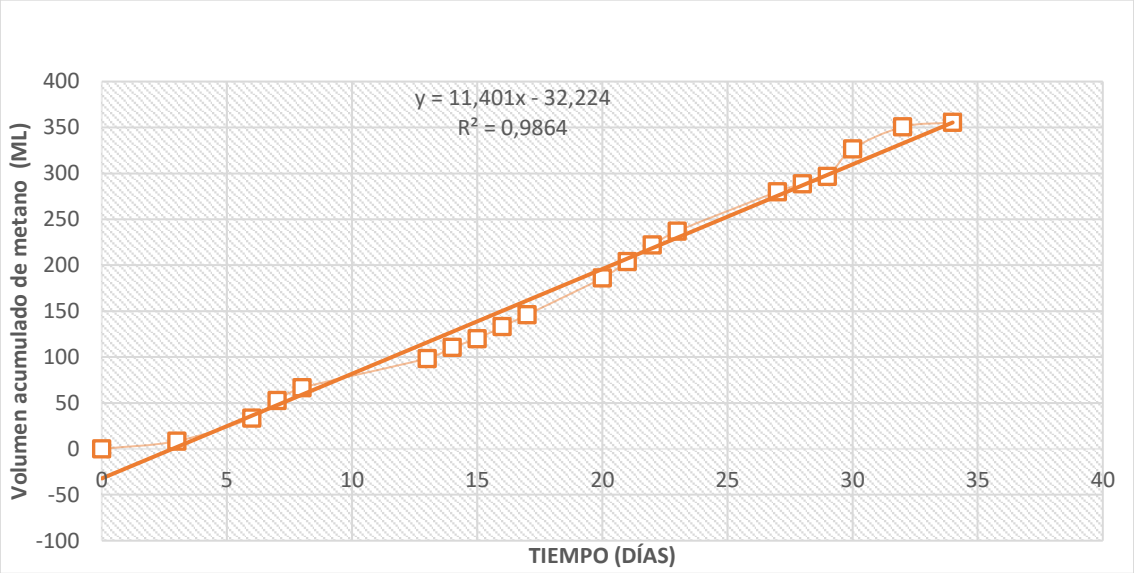


Figura A.4: Curva de volumen acumulado de metano versus tiempo, reactor 2

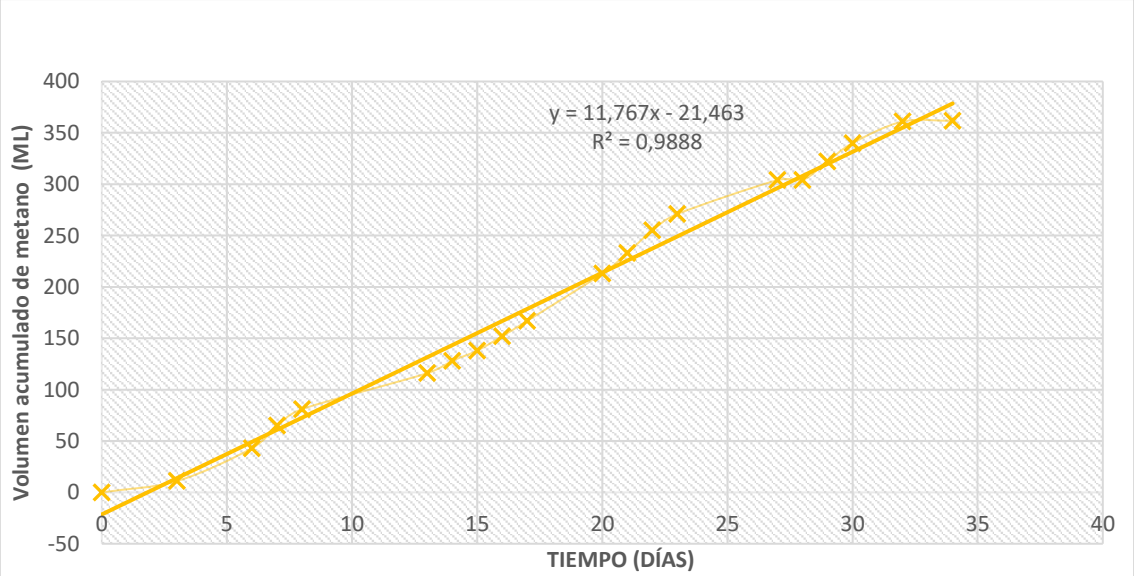


Figura A.5: Curva de volumen acumulado de metano versus tiempo, reactor 3

Finalmente se calculó la actividad metanogénica específica individual (AME_{R1}, AME_{R2}, AME_{R3}) con los valores de la máxima pendiente obtenida (tabla A.8) y la actividad metanogénica específica promedio del ensayo ($\overline{AME}$) -0,0063 g DQO/g SVi.d-.

Tabla A.8: Actividad Metanogénica Específica del ensayo

Reactor	***Valor de la pendiente***	***Concentración de Sólidos Volátiles del inóculo SVi (gSVi/gi)***	***AME (g DQO/g SVi.d)***
R1	10,892	0,077	0,0060
R2	11,401	0,077	0,0063
R3	11,767	0,077	0,0065
ACTIVIDAD METANOGÉNICA ESPECÍFICA PROMEDIO ($\overline{AME}$)			0,0063

Referencias bibliográficas

Angelidaki, I., Ellegaard, L., & Ahring, B. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: Focusing on ammonia inhibition. *Biodegradation, 4*(2), 159–166.

Banks, C. J., & Stentiford, E. I. (2007). Biodegradable municipal solid waste: Biotreatment options. *Water Resources Management, 21*(2), 217–230.

Baumann, U., & Müller, M. (1997). Determination of anaerobic biodegradability with a simple continuous fixed-bed reactor. *Water Research, 31*(6), 1513–1517.

Beily, M. E. (2015). *Caracterización de efluentes de cerdos, con énfasis en su biodegradabilidad anaeróbica* (Tesis de maestría). Instituto Tecnológico de Buenos Aires.

Bres, P. (2019). *Optimización de la digestión anaeróbica del guano de aves ponedoras* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de San Martín.

Bres, P., Beily, M. E., & Crespo, D. (2022). *Ensayo de potencial bioquímico metanogénico: Una metodología clave para conocer la energía de las biomasas*. INTA Ediciones.

Castells, X. (2005). *Tratamiento y valorización energética de residuos*. Ediciones Díaz de Santos.

Centro Español de Metrología. (2012). *Vocabulario internacional de metrología: Conceptos fundamentales y generales y términos asociados (VIM)* (3.ª ed.).

Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology, 99*(10), 4044–4064.

Chernicharo, C. A. L. (2007). *Anaerobic reactors* (Biological Wastewater Treatment Series, Vol. 4). IWA Publishing.

Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (2017). Método 5220 C. Determinación de Demanda Química de Oxígeno - Reflujo cerrado. En *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23.ª ed.). American Public Health Association.

El-Mashad, H. M., Zeeman, G., van Loon, W. K. P., Bot, G. P. A., & Lettinga, G. (2004). Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology, 95*(2), 191–201.

Eurolab España. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos* (1.ª ed.). Eurachem.

Fannin, K. F. (1987). Start-up, operation, stability, and control in anaerobic digestion of biomass. En D. P. Chynoweth & R. Isaacson (Eds.), *Anaerobic Digestion of Biomass* (pp. 171–196). Elsevier Applied Science.

Fernández-Polanco, F., & Seghezzo, L. (2015). *Diseño de reactores UASB* (Cuaderno Tecnológico N.º 15). INTI – Unión Europea.

Foster-Carneiro, T. (2007). *Anaerobic digestion of food waste: Influence of food to microorganism ratio and chemical composition on methane production. In Proceedings of the 10th World Congress on Anaerobic Digestion (pp. 1195-1202).*

Gali, A., Benabdallah, T., Astals, S., & Mata-Alvarez, J. (2009). Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresource Technology, 100*(10), 2783–2790.

Gobierno de la Provincia de Santa Fe. (2019). *Curso operación y mantenimiento de sistemas de biodigestión de pequeña y mediana escala* (Módulos 1, 2 y 3). Subsecretaría de Tecnologías para la Sostenibilidad.

Gropelli, E., Giampaoli, O., Bellini, J., & Bovero, G. (2015). Estudios sobre purificación de biogás y valorización energética en la región. En *Trabajos Completos del VII Congreso de Medio Ambiente de la AUGM*. Universidad Nacional del Litoral.

Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. (2007). *Biomasa: Digestores anaeróbicos*.

International Organization for Standardization. (1995). *Water quality—Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge* (Norma ISO No. 11734:1995).

International Union of Pure and Applied Chemistry. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, *67*(10), 1699–1723. http://dx.doi.org/10.1351/pac199567101699.

Khanal, S. K. (2008). *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: Principles and applications*. Blackwell Publishing.

Lossie, U., & Pütz, P. (2008). *Control orientado de plantas de biogás con la ayuda de FOS/TAC*. Hach Lange.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1999). *Biología de los microorganismos* (10.ª ed.). Pearson Prentice Hall.

Molnar, L., & Bartha, I. (1989). Factors influencing solid-state anaerobic digestion. *Biological Wastes, 28*(1), 15–24.

Montusiewicz, A., Lebiocka, M., & Pawlowska, M. (2008). Characterization of the biomethanization process in selected waste mixtures. *Archives of Environmental Protection, 34*(4), 49–61.

Morillas, P. (2016). *Guía Eurolab España: Guía de calidad en el laboratorio analítico. Validación de métodos*. Eurolab España.

Nichols, C. (2004). Overview of anaerobic digestion technologies in Europe. *BioCycle, 45*(4), 47–63.

Owen, W. F., Stuckey, D. C., Healy, J. B., Young, L. Y., & McCarty, P. L. (1978). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research, 13*(6), 485–492.

Owens, J. M., & Chynoweth, D. P. (1993). Biochemical methane potential of municipal solid waste components. *Water Science and Technology, 27*(2), 1–14.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology* (5th ed.). McGraw-Hill.

Rodríguez, J., Ruiz, G., Roca, E., y Lema, J. M. (2004). Modification of the IWA-ADM1 for the application to anaerobic treatment of ethanolic wastewater from wine factories. En *Proceedings of the 10th IWA World Congress on Anaerobic Digestion*. International Water Association.

Romero, L., de la Rubia, M. A., Pérez, M., y Sales, D. (1991). Digestión anaeróbica termofílica de lodos de EDAR. *RETEMA*, (15), 90–97.

Shelton, D. R., & Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Applied and Environmental Microbiology, 47*(4), 850–857.

Siles, J. A., Li, Q., & Thompson, I. P. (2010). Biorefinery of waste orange peel. *Critical Reviews in Biotechnology, 30*(1), 63–69.

Speece, R. E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press.

Ulrich, A., & Poncar, G. (2008). *Control orientado de plantas de biogás con ayuda de FOS/TAC*. Hach Lange.

Vallecillo, A., García-Encina, P. A., & Peña, M. (1999). Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Water Science and Technology, 40*(8), 161–168.

Van Lier, J. B., Martin, J. L., & Lettinga, G. (1996). Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge. *Water Research, 30*(1), 199–207.

Vernero Moreno, D. (2011). *Manual de biogás. FAO.*

Vivanco, M. (2018). *Tratamiento anaeróbico de aguas residuales. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, 5*(2)*, 79-88*.

Vogt, G., Liu, H., Kennedy, K., & Holbein, B. (2002). Super blue box recycling enhanced two-stage anaerobic digestion process for recycling municipal solid waste: Laboratory pilot studies. *Bioresource Technology, 85*(3), 291–299.

Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., & Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology, 99*(17), 7928–7940.

Watanabe, T., Kimura, K., & Asakawa, S. (2009). Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe mcrA genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry, 41*(2), 276–285.

Yang, H., Jiang, Z., & Shi, S. (2006). Biodegradability of nitrogenous compounds under anaerobic conditions and its estimation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *63*(3), 299–305