

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE LA *Chlorella*
vulgaris A ESCALA LABORATORIO

JESSICA PAOLA ACOSTA CARRASCAL
LORRAINE VANESSA ALVEAR PARDO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERIAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA, SANTANDER
2016

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE LA *Chlorella*
vulgaris A ESCALA LABORATORIO

JESSICA PAOLA ACOSTA CARRASCAL
LORRAINE VANESSA ALVEAR PARDO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de:
INGENIERO AMBIENTAL

Directora:
PhD. ALEXANDRA CERÓN VIVAS

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERIAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA, SANTANDER
2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado

Jurado calificador

Jurado Calificador

Floridablanca, abril 8 de 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos:

Principalmente a DIOS, por la vida y la salud, por iluminar nuestro camino y por darnos las fuerzas necesarias para culminar este proyecto.

A nuestras familias por su inagotable amor, apoyo, dedicación y confianza y por enseñarnos que con esfuerzo, trabajo y constancia toda se logra.

A nuestros amigos y compañeros de aventura, por haber compartido junto a nosotras sus enseñanzas y logros durante estos años, por sus voces de aliento en los momentos difíciles y por cada ayuda brindada durante las pruebas de laboratorio.

A nuestra directora de tesis, PhD Alexandra Cerón Vivas por su asesoramiento y colaboración durante el proceso de elaboración del proyecto. También agradecemos de manera especial a M.Sc. Mabel Juliana Quintero Silva por impartir su conocimiento, su apoyo brindado y su buena disposición durante las visitas programadas.

Al personal de laboratorio por colaborarnos con el préstamo de material, también por su paciencia y las recomendaciones brindadas durante el desarrollo de las pruebas, en especial a Jhonatan Duitama.

A todas las personas que de alguna u otra manera participaron en este proyecto, nuestros más sinceros agradecimientos.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	12
1. OBJETIVOS	13
1.1 GENERAL.....	13
1.2 ESPECÍFICOS	13
2. MARCO REFERENCIAL	14
2.1 ANTECEDENTES	14
2.2 MARCO TEÓRICO.....	16
2.2.1 Digestión Anaerobia.....	16
2.2.1.1 Hidrólisis.....	17
2.2.1.2 Acidogénesis.....	19
2.2.1.3 Acetogénesis.....	20
2.2.1.4 Metanogénesis.....	21
2.2.1.5 Influencia de Variables en la DA.....	22
2.2.2 Potencial Bioquímico de Metano.....	24
2.2.3 Métodos de cuantificación de metano.....	25
2.2.4 Microalgas.....	27
2.2.4.1 Crecimiento de microalgas.....	28
2.2.4.2 Cosecha de Microalgas.....	30
2.2.4.3 <i>Chlorella vulgaris</i>	31

2.2.5 Pretratamientos.	33
3. METODOLOGÍA	37
3.1 FASE 1: CARACTERIZACIÓN DEL INÓCULO	37
3.2 FASE 2: PRETRATAMIENTO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	44
3.3 FASE 3: EVALUACIÓN DEL BMP DE LA <i>Chlorella vulgaris</i>	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL INÓCULO	48
4.2 POTENCIAL BIOQUIMICO DE METANO Y COMPARACIÓN DE LOS PRETRATAMIENTOS.....	54
5. CONCLUSIONES	59
6. RECOMENDACIONES.....	60
7. BIBLIOGRAFIA.....	61
ANEXOS	69

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Composición general de varias especies de microalgas y producción de metano.	28
Tabla 2. Comparación de pretratamientos para algas.....	36
Tabla 3. Métodos utilizados para la caracterización del inóculo	37
Tabla 4. Soluciones adicionadas	39
Tabla 5. Preparación de 1 L de solución madre.....	39
Tabla 6. Composición del medio de cultivo Bold Basal	45
Tabla 7. Características fisicoquímicas el inóculo.	48
Tabla 8. pH del ensayo	53
Tabla 9. Caracterización del sustrato.....	55
Tabla 10. Producción de metano por fases.....	56
Tabla 11. Volumen de metano producido a los 15 días.	56
Tabla 12. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores.....	70
Tabla 13. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales	71
Tabla 14. Datos de presión del ensayo.....	72
Tabla 15. Volumen de metano acumulado.....	74
Tabla 16. Consumo de Almidón.....	77
Tabla 17. Consumo de Azúcares Reductores y producción acumulada de AGV ..	77
Tabla 18. Factor de conversión de metano	78

LISTAS DE IMÁGENES

pág.

Imagen 1. Etapas de la Digestión Anaerobia.	17
Imagen 2. Equipo OxiTop ®.....	26
Imagen 3. Montaje AME	26
Imagen 4. Fases en el crecimiento de los cultivos de algas.	29
Imagen 5. <i>Chlorella vulgaris</i>	31
Imagen 6. Montaje de Actividad Metanogénica.....	43
Imagen 7. Cultivo de la <i>Chlorella vulgaris</i> en el laboratorio.....	45
Imagen 8. Consumo de almidón a través del tiempo	50
Imagen 9. Consumo de glucosa y producción de AGV a través del tiempo	51
Imagen 10. Volumen Acumulado de metano a condiciones estándar.	52
Imagen 11. Volumen de metano acumulado Neto.	53
Imagen 12. Volumen de metano acumulado.....	55
Imagen 13. Producción de metano acumulado	57
Imagen 14. Evaluación de la BMP a través del tiempo	58
Imagen 15. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores..	70
Imagen 16. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales	71
Imagen 17. Consumo o producción de sustrato	78
Imagen 18. Determinación de la pendiente máxima	78

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Preparación del reactivo DNS y su respectiva curva de calibración. ...	69
ANEXO B. Curva de calibración para la prueba de azúcares totales.	71
ANEXO C. Datos de producción de metano	72
ANEXO D. Consumo de sustrato.....	77
ANEXO E. Determinación de la pendiente máxima y del factor de conversión de metano	78

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE LA *Chlorella vulgaris* A ESCALA LABORATORIO.

AUTOR(ES): JESSICA PAOLA ACOSTA CARRASCAL
LORRAINE VANESSA ALVEAR PARDO

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): ALEXANDRA CERÓN VIVAS

RESUMEN

El ensayo de Potencial Bioquímico de Metano (BMP) es una herramienta para evaluar la biodegradabilidad de un sustrato en condiciones anaerobias. En este proyecto se evaluó el BMP de la microalga *Chlorella vulgaris* bajo dos pretratamientos (centrifugación e hidrólisis térmica) utilizando como inóculo un lodo anaerobio procedente de un reactor UASB. Al inóculo seleccionado se le realizaron estudios de actividad metanogénica, hidrolítica y acidogénica. El ensayo de BMP se realizó en botellas ambar de 400 mL de volumen útil, utilizando cabezales Oxitop® para la medición de metano. Al finalizar el experimento se concluyó que el inóculo utilizado presentó actividad hidrolítica de 2,059 gDQO/gSSV.d, actividad acidogénica de 3,049 gDQO/gSSV.d y actividad metanogénica específica de 0,124 gDQOCH₄/gSSV.d; en cuanto al potencial bioquímico de metano se determinó que el pretratamiento que permitió una mayor producción de metano fue la hidrólisis térmica, obteniendo un BMP de 0,18 gDQOCH₄/gSV en comparación al 0,13 gDQOCH₄/gSV de la centrifugación.

Palabras claves: *Chlorella vulgaris*, Potencial Bioquímico de Metano, Digestión Anaerobia, Microalga, Oxitop®

V°B° DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: DETERMINATION OF BIOCHEMICAL METHANE POTENTIAL OF *Chlorella vulgaris* LABORATORY SCALE.

AUTHOR(S): JESSICA PAOLA ACOSTA CARRASCAL
LORRAINE VANESSA ALVEAR PARDO

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: ALEXANDRA CERON VIVAS

ABSTRACT

The test Biochemical Methane Potential (BMP) is a tool to assess the biodegradability of a substrate under anaerobic conditions. This project evaluated the BMP of the microalgae *Chlorella vulgaris* under two pretreatments (Centrifugation and thermal hydrolysis) using as inoculum an anaerobic sludge from a UASB reactor. The select inoculum underwent studies of methanogenic, hydrolytic and acidogenic activity. The BMP assay was performed in amber bottles of 400 mL useful volume using Oxitop® heads for measuring methane. At the end of the experiment, it was concluded that the inoculum used has an d a hydrolytic activity of 2,059 gCOD/gSVS.d, acidogenic activity of 3,049 gCOD/gSVS.d and a specific methanogenic activity of 0,124 gCODCH₄/gSVS.d.; as to Biochemical Methane Potential it was determined that pretreatment allowing a greater production of methane was thermal hydrolysis, obtaining a BMP of 0,18 gCOD/gVS, compared to 0,13 gCOD/gVS of centrifugation.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Biochemical Methane Potential, Anaerobic Digestion, Microalgae, Oxitop®

V°B° DIRECTOR OF GRADUATE WORK

INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente necesidad de producir biocombustible y fuentes de energía, se ha venido generando un marcado interés en los procesos biológicos; la digestión anaerobia (DA) es uno de ellos. En la DA la materia orgánica, en ausencia de oxígeno, se descompone por la intervención de poblaciones bacterianas para producir metano como producto principal, susceptible de un aprovechamiento energético. Este proceso depende en gran parte del sustrato utilizado, pues la biodegradabilidad anaerobia de cada sustrato es diferente debido a su composición química. La medición de la biodegradabilidad anaerobia se cuantifica a través de la prueba de Potencial Bioquímico de Metano (BMP).

Existen estudios donde utilizan microalgas como sustrato en procesos de DA, donde esta es mezclada con residuos agropecuarios, domésticos y de ciertos tipos de industrias, mostrando un incremento en la producción de metano. Estos estudios a su vez demuestran la limitada descomposición de las microalgas debido a la difícil degradación de la pared celular y que la materia orgánica se encuentra en su mayor parte particulada, creando así la necesidad de implementar algunos pretratamientos con el fin de aumentar su biodegradabilidad.

El proyecto se desarrolló en tres fases; en la primera se llevó a cabo la caracterización del inóculo, para el caso: lodo anaerobio proveniente de un reactor UASB. Posteriormente, se realizó la preparación de las microalgas con su respectivo proceso de cultivo y los correspondientes pretratamientos de centrifugación e hidrólisis térmica; para finalmente determinar el BMP del alga registrando el metano producido mediante el método manométrico por OxiTop®.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Establecer el Potencial Bioquímico de Metano de la *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio.

1.2 ESPECÍFICOS

Evaluar las características del lodo utilizado como inóculo en las pruebas de Potencial Bioquímico de Metano.

Determinar la influencia del pretratamiento aplicado a la *Chlorella vulgaris* sobre la producción de metano.

Cuantificar el Potencial Bioquímico de Metano de la *Chlorella vulgaris* a través del método manométrico.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES

A principios del siglo XIX la escasez de combustibles trae consigo el desarrollo de la tecnología de digestión anaerobia como posible solución. Después de la Segunda Guerra Mundial esta tecnología florece en Europa, siendo los tratamientos biológicos y terciarios los principales procesos para el tratamiento de los residuos. La crisis energética de los años setenta trae un desarrollo significativo en el tema de DA, orientada a la producción de biogás como alternativa al petróleo. Actualmente, los mayores consumidores de biogás en el mundo son China e India, principalmente en las comunidades rurales de estos países, por su producción de combustible y fertilizante a partir de residuos agro-ganaderos y domésticos (Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2010).

La investigación sobre los biocombustibles (biodiesel, bioetanol, biogás y biohidrógeno) a partir de microalgas se inició hace 50 años, siendo la producción de biodiesel el campo más estudiado. En este contexto, el uso de microalgas como fuente para la producción de biocombustibles fue propuesta por primera vez por Harder y von Witsch (1942), pero fue en 1948 cuando se comenzó a trabajar sobre el cultivo a gran escala y los requisitos de ingeniería de los sistemas de producción de algas en el Instituto de Investigación de Stanford (Burlew, 1953; Cook, 1950). La generación del biodiesel a escala industrial generaría enormes cantidades de biomasa residual, un uso alternativo a esta biomasa es la DA, ya que permite la recuperación de una fracción significativa de energía debido a la obtención de biogás (Borowitzka & Noheimani, 2013).

La DA ha sido incluida en la “primera generación de biocombustibles”, la cual ha sido desarrollada en los últimos años. La “primera generación de biocombustibles”

se ha enfocado en la producción del biocombustible a partir del cultivo de plantas terrestres (Habig & Ryther, 1982). En estos sistemas, la energía solar es utilizada para la fijación fotosintética del dióxido de carbono a materia orgánica. El cultivo se cosecha y luego es utilizado como combustible convirtiéndolo en etanol, hidrogeno o metano (Keenan, 1976).

El enfoque en la producción de biocombustibles ha sido desplazado hacia los biocombustibles de segunda y tercera generación. (Mussgnung, Klassen, Schlüter, & Kruse, 2010). La segunda generación utiliza alternativas a los cultivos de biomasa procedentes de los alimentos para las materias primas, mientras que la tercera generación o biocombustibles avanzados obtienen la materia prima de cultivos no alimentarios (Fenton & Ohuallachain, 2012).

Golueke et al. (1957), fueron los primeros autores en reportar sobre la Digestión Anaerobia de algas, ellos investigaron la digestión de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus*, las cuales son especies de microalgas que crecen como parte del sistema de tratamiento de agua residual. En 1960 ellos propusieron un proceso integrado asociado a la producción de microalgas en lagunas abiertas para el tratamiento de agua residual y la recuperación energética de la biomasa algal por medio de la DA (Oswald & Golueke, 1960).

Adicional a esto, a comienzos de 1900, el contenido de proteína de la *Chlorella* atrajo la atención de los científicos alemanes como una fuente de alimento no convencional. Hoy en día, Japón es el líder mundial en el consumo de *Chlorella* y lo utiliza para el tratamiento médico, ya que demostró tener propiedades inmunomoduladores y contra el cáncer (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

La conversión de microalgas a CH₄ es a menudo limitada por la alta resistencia de la pared celular de microalgas al ataque microbiano. Por lo tanto, la aplicación de tratamientos previos para interrumpir la pared celular de microalgas y liberar su contenido intracelular es crucial para mejorar la digestibilidad de las mismas (Consejería de economía, innovación y ciencia, 2011). Son pocos los trabajos experimentales disponibles sobre los efectos benéficos de los pretratamientos, donde se ha demostrado que el pretratamiento más efectivo para facilitar la digestión de las microalgas es la hidrólisis térmica (Alzate, Muñoz, Rogalla, Fdz-Polaco, & Pérez-Elvira, 2012).

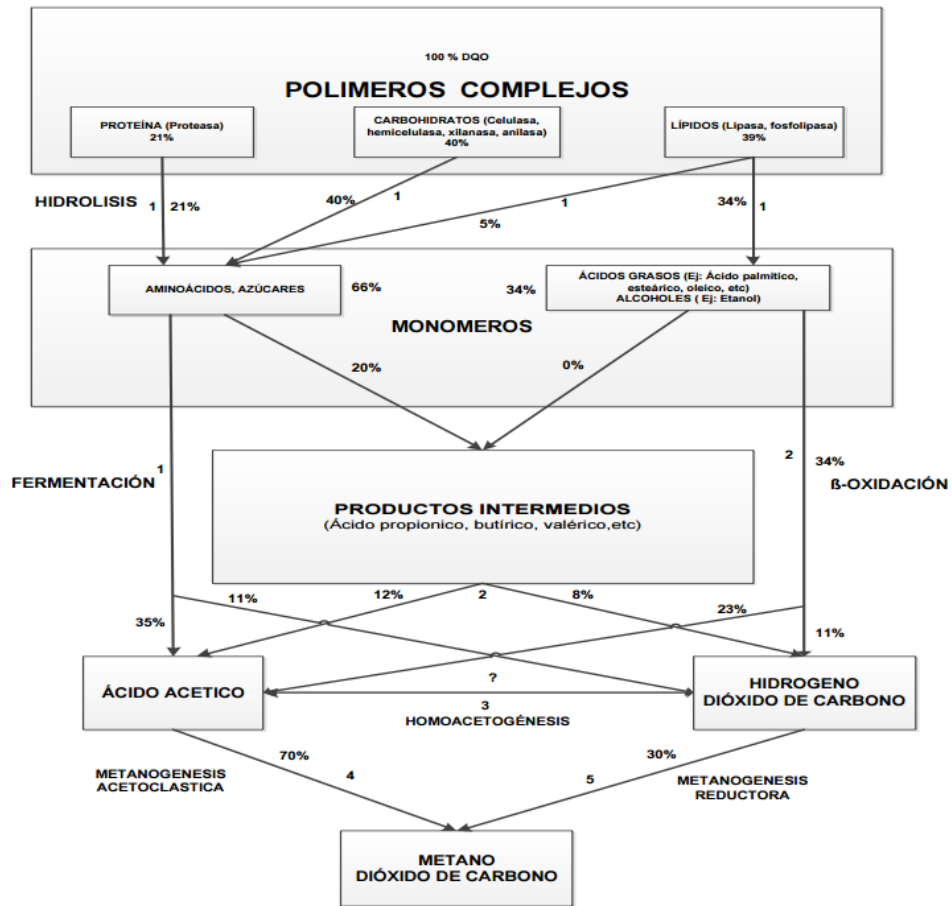
2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Digestión Anaerobia. La DA es un método para la descomposición de la materia orgánica con la ayuda de consorcios microbianos bajo condiciones anaerobias o anóxicas. El producto de esta degradación es un residuo orgánico estabilizado y biogás el cual incluye metano, dióxido de carbono y trazas de otros compuestos. (Jain, Jain, Wolf, Lee, & Tong, 2015). La DA es considerada una de las tecnologías biológicas sostenibles más antiguas y mejor estudiadas para la estabilización y reducción de residuos orgánicos, dentro de los cuales están residuos de frutas y verduras, residuos sólidos domésticos e industriales, así como residuos agrícolas y lodos de aguas residuales (Yuan & Zhu, 2016).

Los lodos de los tratamientos de aguas residuales son un problema crítico debido a su gran producción, su potencial riesgo ambiental y alto costo de eliminación. La DA se considera como el método más eficiente en términos energéticos, pues además de estabilizar el lodo, el metano producido como sub producto se puede utilizar como combustible en calderas o secadores de calor de procesos o bien en micro-

turbinas o motores de combustión interna para generar electricidad (Hunter Long, Aziz, de los Reyes II, & Ducoste, 2012). El proceso de degradación se lleva en cuatro etapas como se muestra en la imagen 1:

Imagen 1. Etapas de la Digestión Anaerobia.



Fuente: Parra Ortiz (2014)

2.2.1.1 Hidrólisis. La hidrólisis inicia con la transformación de moléculas orgánicas complejas (lípidos, proteínas y ácidos grasos) hacia unas de menor peso molecular, por la acción de enzimas extracelulares producidas por los organismos hidrolíticos. Durante esta fase, los organismos también producen el alimento para las etapas

siguientes y eliminan cualquier traza del oxígeno disuelto del sistema (Mosquera Calle & Martínez Martínez, 2012).

La etapa hidrolítica puede ser el paso limitante en el proceso en especial cuando los residuos tienen moléculas muy complejas y/o un alto contenido en sólidos.

Actividad Hidrolítica. La hidrólisis de algunos compuestos complejos es la etapa limitante para la degradación anaerobia. Para la determinación de la actividad hidrolítica de un lodo anaerobio en un sustrato específico es importante la selección del equipo más conveniente y del control de las condiciones del proceso.

La cinética hidrolítica es descrita como de primer orden, por lo que el modelo de Monod se acomoda a esta etapa de la DA; se asume que el ensayo se realiza a condiciones óptimas descritas a continuación:

- ✓ Concentración de sustrato de 1,5 gDQO/L
- ✓ Concentración de inóculo mayor a 0,5gSSV/L
- ✓ Exceso de nutrientes
- ✓ Condiciones anaerobias

La actividad se relaciona con la concentración de sustrato mediante la siguiente ecuación (Soto, Méndez, & Lema, 1993)

Ecuación 1. Cálculo de la Actividad Hidrolítica.

$$Ac = \left(\frac{1}{X_0}\right) \left(\frac{-dS}{dt}\right)$$

Dónde:

Ac = La Actividad (expresada en consumo específico del sustrato) (gDQO/gSSV.d)

X₀ = Concentración microbiana inicial (gSSV/L)

S = Concentración limitante de sustrato (gDQO/L)

t = Tiempo (d)

2.2.1.2 Acidogénesis. En la etapa acidogénica o también llamada fermentativa, las moléculas orgánicas solubles son sometidas a una oxidación incompleta en la ausencia de oxígeno por organismos fermentativos, dando como resultados compuestos orgánicos más simples que pueden ser posteriormente utilizados por bacterias metanogénicas o acetogénicas.

En esta etapa se produce ácido acético, ácido fórmico, hidrógeno, ácido láctico, etanol, ácido propiónico, ácido butírico. Las proporciones de estos productos varían dependiendo del consumo de hidrógeno por parte de las bacterias que lo utilizan, pues cuando el hidrógeno es eliminado eficientemente las bacterias acidogénicas no producen compuestos como el etanol (Ortiz Jordá, 2011).

Actividad Acidogénica. Aunque la etapa acidogénica no es limitante, la evaluación de la actividad acidogénica puede brindar información importante del desarrollo y el comportamiento de los microorganismos en los digestores anaerobios. El sustrato utilizado para la determinación de la Actividad Acidogénica (AA) es usualmente glucosa, la cual es considerada como el principal compuesto intermedio de la DA de los carbohidratos complejos. Es aconsejable realizar la prueba teniendo en cuenta los rangos iniciales de la prueba, para evitar inhibiciones producidas por productos de procesos de conversión simultáneos (Soto, Méndez, & Lema, 1993).

Para el montaje de la AA se debe tener en cuenta:

- ✓ Concentración del sustrato: Se considera adecuado una concentración de sustrato de 1,5 g/L de glucosa.
- ✓ Cantidad de inóculo: Para cultivos puros de bacterias acidogénicas se recomienda una concentración de 0,225 gSSV/L y para consorcios bacterianos

como los lodos anaerobios o el estiércol, se recomienda una concentración mínima de 0,5gSSV/L

- ✓ Condiciones ambientales: se debe asegurar condiciones de pH, temperatura, nutrientes, además de ausencia de inhibidores.

Investigaciones demuestran que el proceso fermentativo sigue el modelo cinético de Monod, por lo que el seguimiento y cálculo de esta prueba se realiza teniendo en cuenta este principio y aplicando la siguiente ecuación.

Ecuación 2. Calculo de la Actividad Acidogénica.

$$Ac = \left(\frac{-dS/dt}{X_0} \right)$$

Dónde:

Ac = La Actividad (gDQO/gSSV.d)

X₀ = Concentración microbiana inicial (gSSV/L)

S = Concentración limitante de sustrato (gDQO/L)

t = Tiempo (d)

2.2.1.3 Acetogénesis. En esta fase los productos de la etapa anterior, ácidos y alcoholes, se transforman en productos más sencillos, ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, por medio de bacterias acetogénicas.

En este punto del proceso, las bacterias anaerobias han extraído todo el alimento de la biomasa, una vez asimilado, las bacterias excretan sus propios productos. Los productos eliminados (ácidos volátiles sencillos) se utilizan como sustrato en la siguiente etapa por acción de las bacterias metanogénicas (Mosquera Calle & Martinez Martinez, 2012).

2.2.1.4 Metanogénesis. Esta es la última etapa de la DA y es donde los microorganismos producen metano a partir de los productos de las etapas anteriores. Los organismos metanogénicos son clasificados dentro del dominio Archaea, y se pueden dividir en hidrogenofílicos (cuando consumen hidrogeno y ácido fórmico) y acetoclásticos (cuando consumen metilos de acetato, metanol y algunas aminas) (Ortiz Jordá, 2011).

Las bacterias metanogénicas acetoclásticas son las principales productoras de metano, pues se considera que alrededor del 70% del metano producido en los reactores anaerobios es debido a ellas (Santolaria Capdevila, 2014).

Actividad Metanogénica Específica. La determinación de la actividad metanogénica específica (AME) es muy útil en situaciones como arranques de digestores anaerobios, así como en el seguimiento de los mismos. La prueba de la actividad del lodo usualmente se realiza en experimentos por tandas, donde una cantidad de sustrato sirve como alimento para una determinada cantidad de lodo. La AME es estimada usando la tasa de producción de metano o la tasa de consumo del sustrato. Las condiciones de operación para el montaje de esta prueba son las siguientes (Soto, Méndez, & Lema, 1993):

- ✓ Concentración inicial del sustrato: El sustrato utilizado para la prueba de AME es una mezcla de ácidos grasos volátiles (Ácido Acético, Propiónico y Butírico) la cual es añadida de manera que la concentración final se encuentre entre 0,05 y 0,2 g/L.
- ✓ Cantidad de inóculo: La concentración mínima de inóculo debe ser de 0,8 gSSV/L.
- ✓ Periodo de medición
- ✓ Nutrientes

El cálculo de la actividad metanogénica se realiza con la ecuación 2 si se calcula de acuerdo al consumo del sustrato y con la ecuación 3 si se tiene en cuenta la producción de metano y el método utilizado es por desplazamiento.

Ecuación 3. Calculo de la AME

$$Ac = \left(\frac{-dV_{CH_4}/dt}{X_0 V_r f_1} \right)$$

Dónde:

Ac = La Actividad (gDQO_{CH₄}/gSSV.d)

V_{CH₄} = Producción de metano acumulada (mL)

X₀ = Concentración limitante de sustrato (gDQO/L)

t = Tiempo (d)

V_r = Volumen útil del reactor (L)

f₁ = Factor de conversión (Usualmente 1/376 gDQO/mLCH₄)

2.2.1.5 Influencia de Variables en la DA. El proceso de DA se puede ver influenciado por las condiciones del medio en el que se da, por lo que es importante hacer control y seguimiento a las siguientes variables: pH, alcalinidad, potencial redox, nutrientes, presencia de tóxicos o inhibidores, temperatura, agitación, inóculo y sustrato (AGRO WASTE, 2013).

pH. Para garantizar la actividad de las poblaciones bacterianas dentro del proceso de DA, en especial la de los microorganismos metanogénicos, se requiere valores de pH entre 6.8 y 7.5, siendo prácticamente inhibidos por fuera de este rango (Herrera & Niño, 2012).

Alcalinidad. La alcalinidad es la capacidad de neutralizar ácidos. Field (1987) reportó que es necesario como mínimo una alcalinidad de 1500 mgCaCO₃/L para

neutralizar el exceso de iones de hidrógeno libres y evitar la saturación de las bacterias metanogénicas. Si la alcalinidad es insuficiente, el medio se acidifica (Cajigas, Pérez, & Torres, 2005)

Potencial Redox. Se recomienda valores inferiores a 350 mV (AGRO WASTE, 2013).

Nutrientes. Una de las ventajas del proceso de DA es su baja necesidad de nutrientes como consecuencia de los bajos índices de producción de biomasa que presentan los microorganismos anaerobios. El carbono y el nitrógeno son las fuentes principales de alimento de las bacterias formadoras de metano.

Inhibidores. El proceso de DA es inhibido por la presencia de productos tóxicos en el sistema. A determinados niveles, los AGV generan serios problemas de inhibición sobre todo cuando los niveles de pH son bajos. Existen otros problemas de inhibición causados por el amonio, el ácido sulfhídrico o los ácidos grasos de cadena larga (AGRO WASTE, 2013). Aunque se ha garantizado que la principal sustancia tóxica de la DA es el oxígeno.

Temperatura. La temperatura es uno de los parámetros de diseño más importantes de la DA, su rápida variación puede desestabilizar el proceso. Cuando aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos y con ello las producciones de metano en el proceso. La mayoría de los digestores anaerobios operan entre 30-35°C (Herrera & Niño, 2012).

Agitación. La agitación es esencial para eliminar los metabolitos producidos por las bacterias metanogénicas, mezclar el sustrato con la población bacteriana, garantizar condiciones homogéneas en el medio, liberar gas desde la fase líquida a

la fase gaseosa en el espacio superior libre de los reactores y evitar la formación de espacios muertos sin actividad biológica.

Inóculo. La concentración inicial del inóculo definirá la duración del ensayo. Para ensayos con agitación se recomiendan concentraciones de inóculo entre 2.0 a 5.0 gSVT/L y en ensayos sin agitación la concentración recomendada debe variar entre 1.0 y 1.5 gSVT/L (Torres Lozada & Pérez, 2010).

Sustrato. Dentro de las características físicas del sustrato que inciden sobre el proceso de DA y su Potencial Bioquímico de Metano (BMP) se encuentra el tamaño de las partículas. Estudios reportan que se han obtenido mejores rendimientos en la generación de BMP y en el desarrollo del proceso, cuando el tamaño de las partículas de sustrato a digerir es reducido.

La selección de la relación S/I adecuada para el proceso de DA es uno de los factores claves para su optimización. El inóculo debe presentar cierta facilidad para degradar los compuestos presentes en el sustrato. La relación S/I se expresa generalmente en términos de los sólidos volátiles, SV (gSV sustrato/gSV inóculo) y en algunos casos en gDQO sustrato/gSV inóculo, siendo las relaciones menores a 0.6 las que demuestran mayor producción de metano y porcentaje de biodegradabilidad (Zhou, y otros, 2011).

2.2.2 Potencial Bioquímico de Metano. El Potencial Bioquímico de Metano o BMP por sus siglas en inglés, es una prueba respirométrica que permite conocer el índice de biodegradabilidad anaerobia de una sustancia problema, la cual determina el valor experimental máximo de producción de metano generado con una cantidad específica de sustancia (Doublet, Boulanger, Ponthieux, Laroche, Poitrenaud, & Chacho River, 2013). Esta prueba se realiza bajo condiciones anaerobia en

reactores tipo batch, dando como resultado el volumen de metano producido por gramo de residuo orgánico en términos de DQO o SV (Gonzalez-Sanchez, Perez-Fabiel, Wong-Villareal, Bello-Mendoza, & Yañez-Ocampo, 2015).

La prueba describe en detalle la descomposición anaerobia de una sustancia sometida a condiciones ideales. Estas condiciones ideales son: amplio espectro de inóculo, exceso de inóculo, exceso de nutrientes, control de sustancias inhibidoras, exceso de capacidad tapón, temperatura moderada y condiciones estrictas anaerobias (Chynoweth, Turick, Owens, Jerger, & Peck, 1993).

El protocolo para la determinación del BMP se estableció por primera vez por Owen et al. (1979) , como un método sencillo para evaluar la biodegradabilidad anaeróbica de la materia prima (Wu-haan, 2008). En este protocolo se añaden cantidades conocidas de sustrato e inóculo anaerobio en las botellas, además de nutrientes en exceso, posteriormente las botellas son gasificadas con un gas inerte y selladas con agrafes de aluminio con septum (Angelidaki, y otros, 2009; Raposo, De la Rubia, Fernández-Cegrí, & Botja, 2011). Una vez selladas se mantienen en una incubadora a temperatura constante. En cada montaje es necesario incluir dos botellas que contengan solo inóculo, con el fin de determinar la producción endógena del inóculo. La contribución del metano resultante de la descomposición de la muestra se determina restando el valor de producción endógena. La duración de la prueba de BMP es específica para cada sustrato y se termina cuando la curva de volumen acumulado de biogás alcance la fase de meseta (Manjantharat, 2013).

2.2.3 Métodos de cuantificación de metano. Los métodos para cuantificar el metano se clasifican en métodos manométricos o volumétricos.

Los métodos **manométricos** miden la presión ejercida sobre un sensor, creada por el gas producido, principalmente metano y dióxido de carbono. Uno de los métodos más utilizados recientemente es el OxiTop®. El equipo OxiTop® (Imagen 2) mide la presión en un sistema cerrado, los microorganismos que se encuentran allí generan CO_2 y CH_4 , haciéndose necesaria la adición de perlas de NaOH en la carcasa de goma del equipo, para garantizar que la presión dentro del sistema sea únicamente realizada por el metano. Para comprobar que se ha producido la absorción completa del CO_2 se requiere un análisis cromatográfico del biogás (Ortiz Jordá, 2011).

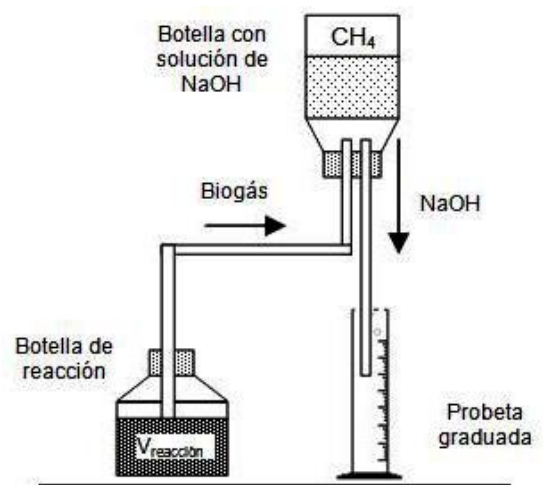
Los métodos **volumétricos** determinan el volumen de biogás que se produce en un matraz. Para cuantificar el volumen de metano producido se utiliza una sustancia desplazante, como el Hidróxido de Sodio (NaOH) o el Hidróxido de Potasio (KOH), por su propiedad de reaccionar con el CO_2 , garantizando la medición más exacta del volumen de metano producido (Torres Lozada & Pérez, 2010). Este método necesita un montaje sencillo, sin mayores requerimientos como se muestra en la imagen 3.

Imagen 2. Equipo OxiTop®



Fuente: Autoras

Imagen 3. Montaje AME



Fuente: Torres Lozada & Pérez (2010)

2.2.4 Microalgas. Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química, por lo que son considerados productores primarios de la cadena trófica.

Las investigaciones han demostrado que la biomasa del alga se puede utilizar con fines energéticos, principalmente para obtener biodiesel aunque se pueden adquirir otros biocombustibles (Milano, y otros, 2016; Chiaramonti, Prussi, Buffi, Rizzo, & Pari, 2016; Lam & Lee, 2012; Rawat, Ranjaith Kumar, Mutanda, & Bux, 2011). También tiene aplicaciones nutritivas y terapéuticas. Las microalgas son usadas como biofertilizantes, además ayudan a reducir las emisiones de CO₂ e intervienen en el tratamiento de aguas residuales. Cuando son utilizadas en el tratamiento de agua residual, pueden ser consideradas como una alternativa de tratamiento terciario, debido a los procesos que realizan las bacterias (encargadas de la degradación de la materia orgánica) y las microalgas (utilizan los compuestos inorgánicos) para llevar a cabo una eficiente eliminación de materia orgánica y nutrientes, lo cual se convierte en generación de biomasa, mejorando la calidad del efluente.

También existen investigaciones que relacionan la especie del alga con la producción de metano. Para este fin, lo ideal es una elevada proporción de lípidos, aunque cualquier variación en la composición se ve reflejada en el rendimiento de la digestión (Rey Devesa, 2014). La tabla 1 presenta la composición de las microalgas y su producción de metano.

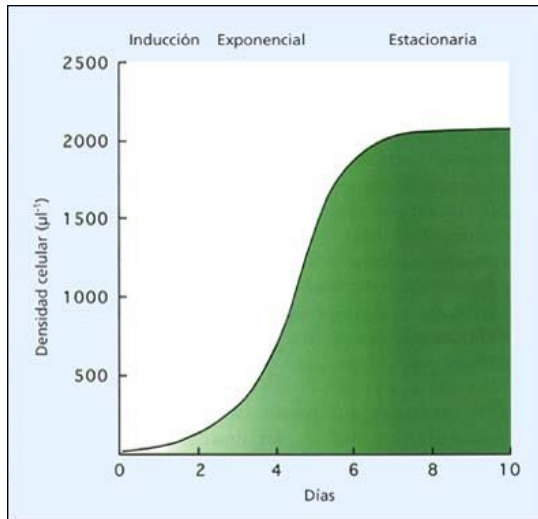
Tabla 1. Composición general de varias especies de microalgas y producción de metano.

Especies	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	CH ₄ (L/gSV)
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18	0.53-0.8
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17	0.69
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	0.8
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17	0.63-0.79
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	0.68
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14	0.47-0.69
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	0.59-0.69

Fuente: Rey Devesa (2014)

2.2.4.1 Crecimiento de microalgas. El crecimiento de las microalgas se da en cuatro fases como se muestra en la imagen 4. La primera fase de siembra o inducción se da cuando comienza el proceso de adaptación de la cepa al medio. Una vez se adapta por las condiciones favorables del medio inicia la fase de crecimiento exponencial, un período caracterizado por la división celular si el crecimiento no se limita, la división continúa a ritmo constante hasta alcanzar la máxima concentración de microalgas, luego de estabilizada, empieza la fase estacionaria. La concentración lograda en la fase estacionaria será la concentración óptima y esto se debe al alcance de la mayor tasa de crecimiento (Vasumathi, Premaltha, & Subramanian, 2012). Una vez se alcanza la máxima concentración de microalgas, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos de desecho, hasta que el número de algas empieza a decaer, dando paso a la fase final, la fase de decrecimiento o declinación, donde se hace necesario realizar una cosecha de la microalga.

Imagen 4. Fases en el crecimiento de los cultivos de algas.



Fuentes: Helm (2006)

En un fotobiorreactor, los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas son: cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia, aireación, salinidad y temperatura.

La **temperatura** varía de acuerdo a la composición del medio de cultivo y a la especie utilizada. Los rangos óptimos se encuentran entre 16 y 27°C. Temperaturas menores a 16 °C afectan el crecimiento de las algas y temperaturas mayores a 35 °C traen como consecuencia la muerte para determinado número de especies.

La exposición a la **luz** promueve reacciones fotosintéticas en las algas y un fuerte efecto en la productividad para la remoción de nutrientes, aunque una sobreexposición puede causar daño a las mismas.

El rango de **pH** para la mayoría de los cultivos de microalgas es entre 7 y 9 unidades, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. A niveles de pH alcalinos, la disponibilidad de CO₂ puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas. Para mantener un pH tolerable es necesario airear el medio de cultivo.

La **aireación** evita la sedimentación de las algas, permite que la población se encuentre expuesta a la luz y a los nutrientes de manera uniforme y mejora el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (21, 2016).

2.2.4.2 Cosecha de Microalgas. La cosecha de microalgas tiene como objetivo eliminar las grandes cantidades de agua y recuperar la biomasa algal. Este es un factor determinante en los costos del proceso, pues puede significar de un 20 a un 30% del costo total (Grima, Belarbi, Fernandez, Medina, & Chisti, 2003). Algunos métodos son descritos a continuación:

La **centrifugación** es un método rápido y eficaz, pero económicamente inviable para la cosecha a gran escala debido a la energía y equipos necesarios (Harun, Singh, Forde, & Danquah, 2010). A nivel laboratorio, se ha demostrado que alrededor del 80-90% de las micro algas son recuperadas por este sistema, sin embargo, se debe tener en cuenta que este método puede dañar las estructuras celulares debido a las altas fuerzas gravitatorias que son utilizadas (Knuckey, Brown, Robert, & Frampton, 2006).

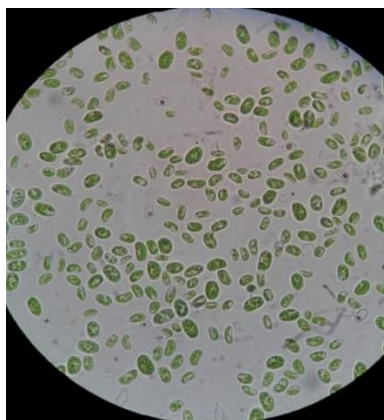
La **floculación** es un proceso por el cual las partículas que están dispersas se aglomeran para formar flocs o partículas de mayor tamaño que faciliten su recuperación mediante sedimentación, flotación o filtración (Bernnan & Owende, 2010). Este proceso se hace mediante la adición de sales metálicas (Como las del aluminio) las cuales hacen que las cargas negativas de las microalgas interactúen con ellas permitiendo la agregación. Esta técnica no es viable cuando se necesite ciertos grados de pureza, en especial si se utiliza la microalga como fuente de alimento (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Es probable generar un proceso de auto floculación, el cual es la agregación espontanea del alga, esta ocurre cuando existe limitación de carbono (Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang, 2011).

La **sedimentación** puede ser un proceso lento, sin embargo, debido a la ausencia de equipos especializados y aditivos para su realización se convierte en un proceso económico y energéticamente eficiente. En la sedimentación los parámetros más importantes son la densidad y el radio de las células del alga, pues esto determinará el tiempo que dura el proceso. Esta técnica es común para la recolección de biomasa algal procedente de tratamientos de agua residual debido a los grandes volúmenes que pueden ser tratados (Bernnan & Owende, 2010).

La **filtración** es un proceso utilizado para la separación de la biomasa (sólido) del medio donde se ha cultivado (líquido). La principal limitante de este método es el tamaño del alga, pues este proceso es eficiente solo para células grandes como las de la *Spirulina* (Bernnan & Owende, 2010). Estudios afirman que en procesos de filtración se puede alcanzar un factor de concentración de 245 veces (Mohn, 1980).

2.2.4.3 *Chlorella vulgaris*. Es un alga verde unicelular, de forma esférica, con un diámetro entre 2 y 10 micras, como se muestra en la imagen 5. El nombre *Chlorella* proviene del griego Chloros, que significa verde y del latín ella, que significa cosa pequeña, fue descubierta y nombrada por el holandés M.W. Beyerinck en 1890 (Kanno & Uyama, 2005).

Imagen 5. *Chlorella vulgaris*



Fuente: Autoras

La *C. vulgaris*, a través de la fotosíntesis adquiere carbono de la atmósfera, el cual es un elemento vital para su crecimiento y desarrollo. Se reproduce rápidamente y de forma asexual, por lo tanto, dentro de 24 horas, una célula de *C. vulgaris* cultivada en condiciones óptimas se multiplica por esporulación, siendo la reproducción asexual más común en las algas. Asimismo, contiene proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentación, vitaminas y minerales.

Las proteínas representan el 42-58% de la biomasa en peso seco y varía en función de las condiciones de crecimiento. Las proteínas tienen múltiples funciones, casi 20% de las proteínas totales están unidos a la pared celular, más de 50% son internas y 30% migran dentro y fuera de la célula (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

Los lípidos pueden alcanzar 5-40% por peso seco de la biomasa, y se componen principalmente de glicolípidos, ceras, hidrocarburos, fosfolípidos y pequeñas cantidades de ácidos grasos (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

Los carbohidratos representan un grupo de azúcares reductores y polisacáridos tales como almidón y celulosa. El almidón es el polisacárido más abundante en la *C. vulgaris*. En general, se encuentra en el cloroplasto y se compone de amilosa y amilopectina. La celulosa es un polisacárido estructural de alta resistencia, que se encuentra en la pared celular de la *C. vulgaris* como una barrera fibrosa protectora (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

El pigmento más abundante en la *C. vulgaris* es la clorofila, puede alcanzar 1 a 2% de peso seco y está situado en los tilacoides. También contiene cantidades importantes de carotenoides que actúan como pigmentos para capturar la luz, además de su importante perfil de vitaminas y minerales (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

La *C. vulgaris* presenta una pared celular resistente, aunque es común en todas las microalgas. Este problema impide que sea fácilmente biodegradable, por lo que se hace necesario implementar ciertos pretratamientos con el fin de debilitar la pared.

2.2.5 Pretratamientos. Los pretratamientos resultan ser la solución más adecuada para debilitar la pared celular de las microalgas, al no ser fácilmente biodegradable. Los pretratamientos además de aumentar la biodegradabilidad de las microalgas, aumentan la velocidad del proceso, disminuyen el tamaño de partículas, mejoran la solubilidad y concentran el alga (Consejería de economía, innovación y ciencia, 2011). Los principales pretratamientos son:

Pretratamientos químicos. Suponen un beneficio para la fase de hidrólisis, debido a la reducción en el tamaño de las partículas. La oxidación y los procesos alcalinos son los pretratamientos más desarrollados sobre lodos. La ozonización es el método de oxidación más utilizado (Rey Devesa, 2014).

Pretratamientos mecánicos. Existen diversos pretratamientos mecánicos, los cuales van desde corte, trituración y molienda de macro algas, hasta la centrifugación de microalgas. Se ha demostrado que mediante la centrifugación de microalgas se consigue la ruptura del 15-26% de enlaces (Rey Devesa, 2014); esta ruptura se consigue a través de la fuerza centrífuga propiciada por la máquina, la cual imprime a la mezcla un movimiento de rotación que origina la sedimentación de la biomasa.

Pretratamientos por ultrasonido. El ultrasonido es energía acústica en forma de ondas que tienen una frecuencia por encima del rango de audición humana. Esta alta frecuencia de las ondas sónicas provoca una variación rápida de presión y a su vez genera cavitación dentro de las células: la formación de regiones con vapor

líquido o las llamadas micro-burbujas (Rodríguez, Alaswad, Mooney, Prescott, & Olabi, 2015). La hidrólisis de la biomasa se acelera, generando AGV, los cuales se transforman en metano. En este proceso se observan rendimientos de producción de biogás entre 20-140% en sistemas discontinuos y 10-45% en sistemas continuos (Rey Devesa, 2014).

Pretratamientos por microondas. Procesos basados en radiaciones electromagnéticas con frecuencias que oscilan entre 0,3-300 GHz, estas ondas aumentan la energía cinética del agua que conduce a un estado de ebullición; el proceso polariza las macromoléculas, causando cambios en la estructura de las proteínas y una rápida generación de calor y presión en el sistema biológico que produce la hidrólisis de células, lo que obliga a salir los compuestos de la matriz biológica (Eskicioglu, Kennedy, & Droste, 2009). Estos procesos rompen la red polimérica de la materia orgánica a través de materiales dieléctricos.

Pretratamientos térmicos. Los pretratamientos térmicos se dividen según la temperatura de operación, en: Pretratamiento térmico e hidrólisis térmica. La hidrólisis térmica es un pretratamiento que aumenta considerablemente la producción de biogás, al superar la principal limitación del proceso de DA, la hidrólisis. Durante el proceso, el sustrato a tratar se bombea en un reactor de hidrólisis a una presión y temperatura determinada. Finalmente, la estructura celular del sustrato se rompe, logrando un residuo más biodegradable, que mejora el rendimiento de la DA y la producción de biogás. (González-Fernández, Sialve, Bernet, & Steyer, 2012)

Pretratamiento Biológico. Los pretratamientos biológicos también son conocidos como pre-acidificación. Es un pretratamiento en los primeros pasos de la DA, la hidrólisis y la acidogénesis ocurren separados de la etapa metanogénica, lo que hace posible evitar los efectos inhibidores de la acumulación de AGV. El

pretratamiento biológico se basa principalmente en tres áreas: la actividad bacteriana, fúngica y enzimática (Rodríguez, Alaswad, Mooney, Prescott, & Olabi, 2015).

Las ventajas y desventajas de los diferentes pre-tratamientos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de pretratamientos para algas.

Pretratamiento	Descripción	Parámetros que influyen la solubilización y la producción de biogás	Ventajas	Desventajas
Mecánico	Reducción de la cristalinidad y el tamaño de partícula de la celulosa	La disponibilidad del sustrato mejora la producción de biogás, pero no se reporta efectos sobre la solubilización	Facilidad en el manejo de la biomasa Maquinaria existente Mejora la fluidez en el digestor Aumenta el área superficial	Alta demanda energética Altos costos de mantenimiento Sensible a materiales inertes
Ultrasonido	Las ondas de sonido producen cavitación dentro de la celda y hace ruptura de la pared celular	Una mayor potencia del ultrasonido, así como un aumento en el tiempo del pretratamiento mejora la producción de biogás y tiene un efecto menor en la solubilización de la biomasa	Escalabilidad	Alta demanda energética
Microondas	Interrupción de los enlaces de hidrogeno Cambios en la estructura de lípidos y proteínas	Una mayor potencia del microondas, así como un aumento en el tiempo del pretratamiento mejora la producción de biogás y tiene un efecto menor en la solubilización de la biomasa	Calentamiento rápido y uniforme	Alta demanda energética
Térmico	Aplicación de calor en un rango menor a los 100°C	La temperatura y el tiempo de exposición tiene un alto efecto en la solubilización y en la producción de biogás	Alta solubilización de la biomasa Alto rendimiento en la producción de metano	Alta demanda energética Biomasa espesa
Hidrotérmico o Hidrólisis térmica	Aplicación de calor en un rango de 100 a 250 °C	La temperatura, la presión y el tiempo de exposición tiene un alto efecto en la solubilización y en la producción de biogás	Alta solubilización de la biomasa Alto rendimiento en la producción de metano Desinfección de la materia prima	Alta demanda energética Biomasa espesa Posibles compuestos recalcitrantes
Químico	Adición de una base o un ácido, generalmente peróxido de sodio y ácido sulfúrico	La concentración tiene un alto efecto en la solubilización de la biomasa, pero tiene un efecto menor en la producción de biogás	Baja demanda energética Solubilización de la hemicelulosa	Contaminación química Costos por compra de reactivos Posibles compuestos inhibidores Problemas de corrosión Cambios de pH en el digestor.
Biológico	La adición de una enzima o combinación de enzimas para mejorar la hidrólisis	Concentración de la enzima tiene poco efecto casi insignificante sobre la solubilización de la biomasa y la producción de biogás	Demanda energética baja Ausencia de compuestos inhibidores	Proceso lento Requiere gran espacio Costos por compra de enzimas Efectividad enzima-sustrato

Fuente: Rodriguez, Alaswad, Mooney, Prescott, & Olabi (2015)

3. METODOLOGÍA

Este proyecto se realizó en tres fases, las cuales se describen a continuación:

3.1 FASE 1: CARACTERIZACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo usado durante el ensayo fue lodo anaerobio procedente de un reactor UASB de la planta de tratamiento de agua residual.

En esta fase se determinaron las características físicas (sólidos totales, sólidos volátiles, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles) y químicas (pH, alcalinidad total y ácidos grasos volátiles) del inóculo de acuerdo a los métodos estándar, como se muestra en la tabla 3 (APHA, 2005).

Tabla 3. Métodos utilizados para la caracterización del inóculo

<i>Parámetro</i>	<i>Método</i>	<i>Equipos Utilizados</i>
Físicas		
Sólidos Totales (ST)	Método 2540B	Horno BINDER ED530L Balanza Digital METTER TOLEDO MS2045
Sólidos Volátiles (SV)	Método 2540E	Horno BINDER ED530L Balanza Digital METTER TOLEDO MS2045 Mufla TERRIGENO MM18
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	Método 2540D	Horno BINDER ED530L Balanza Digital METTER TOLEDO MS2045
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	Método 2540E	Horno BINDER ED530L Balanza Digital METTER TOLEDO MS2045 Mufla TERRIGENO MM18
Químicas		
pH	Método 4500 H ⁺	Multiparámetro HACH HQ40d
Alcalinidad Total	Método 2320B	Multiparámetro HACH HQ40d
Ácidos Grasos Volátiles (AGV)	Método titrimétricos (Field, 1987)	Multiparámetro HACH HQ40d

Fuente: Autoras.

El inóculo se mantuvo a temperatura ambiente y sin adición de nutrientes en el laboratorio de aguas residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana durante la realización del proyecto.

Además de las características descritas anteriormente se realizaron montajes para determinar la actividad hidrolítica, acidogénica y metanogénica de cada uno de los inóculos.

Actividad Hidrolítica y Acidogénica

Para la prueba de actividad hidrolítica (AH) y actividad acidogénica (AA) se emplearon botellas ámbar de 120 mL de los cuales 100 mL es su volumen útil. La concentración de SSV en las botellas fue de 1,5 gSSV/L y la cantidad de lodo a adicionar en cada una de las botellas se determinó con la ecuación 4.

Ecuación 4. Volumen de lodo a adicionar.

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}$$

Dónde:

V_1 = Volumen de lodo a adicionar (mL)

C_1 = Concentración de SSV del lodo (mg/L)

V_2 = Volumen útil de la botella (mL)

C_2 = Concentración deseada de SSV en la botella (mg/L)

Una vez calculado el volumen de lodo a adicionar, se depositó en tubos falcon y se aforó el volumen restante con agua destilada. Se centrifugó a 6000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante de las muestras y se aforó con agua destilada nuevamente resuspendiendo el precipitado.

Se preparó una solución madre que incluía macronutrientes, elementos traza, sulfuro de sodio, extracto de levadura, bicarbonato y sustrato (según sea el caso) en las cantidades mostradas en la tabla 5. La preparación de cada una de las soluciones mencionadas se realizó de acuerdo a la tabla 4. Se ajustó el pH con una solución de HCl 1 N entre 7-7,5.

Tabla 4. Soluciones adicionadas

Solución	Reactivo	Concentración (g/L)
Macro-nutrientes	NH ₄ Cl	170,00
	KH ₂ PO ₄	37,00
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8,00
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	11,56
Traza de elementos	FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,71
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,00
	MnCl ₂ ·2H ₂ O	0,41
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,03
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,11
	H ₃ BO ₃	0,05
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,09
	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0,10
	EDTA	1,00
	HCl	1mL
	Resazurin	0,50
Sulfuro	Na ₂ S·10H ₂ O	107,50
Extracto de levadura		20
Bicarbonato	NaHCO ₃	15

Fuente: Adaptado de Field (1987)

Tabla 5. Preparación de 1 L de solución madre.

Solución	Cantidad adicionada (mL)
Macro-nutrientes	14,28
Traza de elementos	14,28
Sulfuro	14,28
Extracto de levadura	71,1
Bicarbonato	71,1

Fuente: Autoras

Para la prueba de AA se utilizó como sustrato la glucosa, pues se considera el principal compuesto intermedio de los carbohidratos complejos en la DA (Soto, Méndez, & Lema, 1993), para este caso a la solución madre se le agregó 107,1 mL

de una solución de 10g/L de glucosa, el cual representa a una concentración de 0,15 g/L en cada botella.

Para la prueba de AH se utilizó como sustrato el almidón, ya que es el polisacárido que se encuentra en mayor abundancia en la *Chlorella vulgaris* (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014), obteniendo una mejor aproximación del comportamiento del inóculo con la *C. vulgaris*. En esta prueba se agregaron 107,1 mL de una solución de 10g/L de almidón soluble, el cual representa una concentración de 0,15g/L en cada botella.

Se adicionó 14 mL de solución madre a cada botella, se aforó y se autoclavó. Una vez frías las botellas se inocularon con la cantidad de lodo centrifugado y se burbujeó con nitrógeno gaseoso por 1 minuto. Se realizó un blanco común para ambas pruebas con todo lo anterior descrito a excepción del sustrato.

Las botellas se llevaron a una incubadora (marca BINDER, modelo PD53) la cual se encontraba a 37°C. Se procedió a medir el consumo de almidón y glucosa a tiempo cero, luego cada tres horas durante 2 días y después cada 6 horas hasta terminar la prueba. La muestra extraída de cada botella se llevó a la centrifuga (marca HERMLE, modelo Z206A) a 6000 rpm por 15 min, se tomó el sobrenadante de la centrifugación y se diluyó la muestra de ser necesario para el análisis de azúcares reductores y totales.

La concentración de almidón se obtiene de la diferencia entre la determinación de azúcares totales y la determinación de azúcares reductores. El valor de AH se obtiene del cociente entre la pendiente máxima del consumo de almidón y el valor de biomasa empleada en el ensayo con la ecuación 5 (Poirrer González, 2005).

La concentración de la glucosa se asume como la concentración de azúcares reductores. El valor de la AA se obtiene del cociente entre la pendiente máxima del consumo de glucosa y el valor de biomasa empleada en el ensayo utilizando la ecuación 5 (Poirrer González, 2005).

Ecuación 5. Determinación de Actividad Acidogénica e Hidrolítica (Alzate M. & Quintero S.).

$$A = P \times FC \times \frac{V_{inoculo}}{gSSV_{inoculo}} \times 24$$

Dónde:

A= Actividad (gDQO/gSSV.d)

P= Pendiente (g/L.h). (Ver anexo E)

FC= Factor de conversión (gDQO/g Glucosa) [1,067]

V_{inóculo}= Volumen agregado de inóculo (L)

gSSV = Masa agregada de inóculo (g)

Los azúcares reductores se determinaron de acuerdo al método del ácido Di-nitrosalicílico, DNS (Miller, 1959). Para esta prueba se agregó 1 mL de muestra y 1 mL de reactivo DNS a un tubo de ensayo. Se llevó a baño de agua hirviendo por 5 minutos. Después se enfrió en baño de hielo por 3 minutos, se agregaron 10 mL de agua destilada y se dejó reposar por 15 minutos, posteriormente se midió en el espectrofotómetro a 540 nm. Previamente se realizó una curva de calibración utilizando glucosa como patrón como se observa en el anexo A.

Para la prueba de azúcares totales se agregó 1 mL de muestra y 1 mL de fenol al 5% a un tubo de ensayo. Una vez mezclado se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se agitó en vórtex. Se dejó enfriar por 15 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a 490 nm, previa realización de una curva de calibración utilizando glucosa como patrón como se observa en el anexo B (Dubois, Pilles, Hamilton, & Smith, 1956).

Actividad Metanogénica Específica.

Una vez determinada la cantidad de sólidos suspendidos volátiles (SSV) del inóculo, se procedió a evaluar la producción de metano con el procedimiento descrito a continuación.

Para la prueba de actividad metanogénica específica (AME) se emplearon botellas ámbar de 500 mL, con 400 mL de volumen útil, junto con cabezales OxiTop® (marca TWT, modelo OC110 SET) para la medición de metano producida a través de la diferencia de presión. La concentración de SSV utilizada en las botellas fue de 1,5 gSSV/L, debido a que el ensayo se realizó con agitación intermitente (3 veces al día) (Field, 1987). La cantidad de lodo a adicionar en cada una de las botellas se determinó mediante la ecuación 4.

Una vez calculado el volumen de inóculo a adicionar, se procedió a llenar las botellas hasta la mitad del volumen útil, se agregó 12 mL una solución de ácidos grasos volátiles compuesta por ácido acético (63,52 mL/L de solución), ácido propiónico (16,8mL/L de solución) y ácido butírico (17,4mL/L de solución) teniendo en cuenta las recomendaciones hechas por Field (1987) (exceptuando el blanco), los cuales son el sustrato para esta prueba. Posterior a eso se adicionó 0,8 mL de solución de macro-nutrientes, 0,8 mL de solución de traza de elementos, 0,8 mL de solución de sulfuro, 4 mL de solución de extracto de levadura y 4 mL de solución tapón de bicarbonato; las soluciones fueron preparadas según la tabla 4. Por último, se agregó el volumen de lodo calculado anteriormente y se aforó hasta su volumen útil, ajustando el pH entre 7-7.5. Una vez aforado se burbujeó con nitrógeno gaseoso por 3 minutos (Field, 1987), se agregaron 4 perlas de NaOH en la carcasa de goma del equipo, para garantizar que la medición correspondiera solo a la cantidad de metano (Torres Lozada & Pérez, 2010), se cerraron las botellas con los cabezales OxiTop® y se colocaron en un baño de agua a 37°C +/- 0,1°C, como se muestra en la imagen 6.

El monitoreo de la producción de metano se realizó cada dos horas la primera semana y gradualmente se disminuyeron las mediciones diarias; obteniendo la presión medida por el cabezal, la cual es convertida en términos de L de metano, empleando la ecuación 6.

Ecuación 6. Litros de metano producidos

$$V_{CH_4 CE} = \frac{\Delta P \times V_i \times T_{CE}}{P_{CE} \times T_e} \times 1000$$

Dónde:

$V_{CH_4 CE}$ = Volumen de metano a condiciones estándar (mL)

ΔP = Diferencia de presión (atm)

V_i = Volumen libre (L)

T_{CE} = Temperatura a condiciones estándar (K)

P_{CE} = Presión a condiciones estándar (atm)

T_e = Temperatura del experimento (K)

Imagen 6. Montaje de Actividad Metanogénica.



Fuente: Autoras

La determinación de la actividad metanogénica específica se realiza con la ecuación 7 (Quintero, Castro, Ortiz, Guzmán, & Escalante, 2012).

Ecuación 7. Calculo de AME

$$AME = \frac{P}{FC \times V \times SSV}$$

Dónde:

AME: Actividad metanogénica específica (gDQO/gSSV.d)

P: Pendiente máxima de producción de metano (mL/d) (Ver anexo E)

FC: Factor de conversión a DQO (mL CH₄/gDQO) (Ver anexo E)

V: Volumen de inóculo agregado (L)

SSV: Concentración de sólidos suspendidos volátiles del inóculo (g/L)

3.2 FASE 2: PRETRATAMIENTO DE *Chlorella vulgaris*

Las microalgas se cultivaron partir de la cepa de *Chlorella vulgaris* (Imagen 7) suministrada por el laboratorio de Biomasa de la Universidad Industrial de Santander para el proyecto de investigación “Evaluación de fotobiorreactores con microalgas para la remoción de nutrientes en agua residual a escala laboratorio” y posteriormente cultivada en un medio de cultivo Bold Basal (BB) (Bischoff & Bold, 1963) como se muestra en la tabla 6.

Se realizaron dos pretratamientos: centrifugación e hidrólisis térmica. El alga se llevó a la centrifuga (marca HERMLE, modelo Z206A) a 5000 rpm por 10 minutos, la mitad del volumen centrifugado se llevó a la autoclave (marca 6EMM4, modelo SA-300VL) por 15 minutos a 104 kPa y 100°C. Se tomó el alga centrifugada como un pretratamiento y el alga centrifugada y auto clavada como otro, conocido como hidrólisis térmica. El alga pretratada fue almacenada en botellas ambar de 500 mL a 4°C para su posterior evaluación de BMP.

Imagen 7. Cultivo de la *Chlorella vulgaris* en el laboratorio.



Fuente: Autoras.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo Bold Basal

Componente	Solución Stock (g·L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad Usada	Concentración en Medio Final (M)
Macronutrientes			
NaNO ₃	25.00	10 mL	2.94 × 10 ⁻³
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	10 mL	1.70 × 10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50	10 mL	3.04 × 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL	4.31 × 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL	1.29 × 10 ⁻³
NaCl	2.50	10 mL	4.28 × 10 ⁻⁴
Solución EDTA Alcalina		1 mL	
EDTA	50.00		1.71 × 10 ⁻⁴
KOH	31.00		5.53 × 10 ⁻⁴
Solución de Métodos Acidificada		1 mL	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		1.79 × 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1 mL	
Solución de Boro			
H ₃ BO ₃	11.42		1.85 × 10 ⁻⁴
Solución de Metales Traza		1 mL	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		3.07 × 10 ⁻⁵
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		7.28 × 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 × 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		6.29 × 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		1.68 × 10 ⁻⁶

Fuente: Bischoff & Bold (1963)

3.3 FASE 3: EVALUACIÓN DEL BMP DE LA *Chlorella vulgaris*

El montaje se realizó en un baño de agua a 37°C, el cual se ubicó en el laboratorio de agua potable de la Universidad Pontificia Bolivariana. Se emplearon 6 botellas ámbar de 400 mL de volumen útil, junto con el sistema OxiTop®. El ensayo se realizó por duplicado para cada uno de los pretratamientos, adicional a esto se montó una prueba de actividad metanogénica y un blanco; estas últimas con el fin de servir como control para la prueba.

Cada una de las botellas contenía inóculo con una concentración de SSV de 1.5 gSSV/L, 0,8 mL de solución de macro-nutrientes, 0,8 mL de solución de traza de elementos, 0,8 mL de solución de sulfuro, 4 mL de solución de extracto de levadura y 4 mL de solución tapón de bicarbonato; preparadas como lo indica la tabla 4.

Para determinar la cantidad de sustrato a adicionar, se determinó la DQO del alga para ambos pretratamientos y se calculó la cantidad de alga a adicionar, teniendo en cuenta una relación de 0.5 gDQO/gSSV. Para la botella de actividad metanogénica se tuvo en cuenta en cuenta el procedimiento descrito en la fase 1 y para el blanco se agregó lodo sin ningún sustrato.

Se aforó hasta su volumen útil (400 mL), ajustando el pH entre 7-7.5. Una vez aforado se burbujeó con nitrógeno gaseoso por 3 minutos (Field, 1987), se agregaron 4 perlas de NaOH en la carcasa de goma del equipo (Torres Lozada & Pérez, 2010), se cerraron las botellas con los cabezales del OxiTop® y se colocaron a 37°C.

El monitoreo de la producción de metano se realizó cada dos horas la primera semana y gradualmente se disminuyeron las mediciones diarias; obteniendo la presión medida por el cabezal, la cual es convertida en términos de litros de metano

con la ecuación 6. Una vez calculado el volumen total producido, se determina el potencial bioquímico de metano utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 8. Calculo de BMP

$$BMP = \frac{V_{TCH_4}}{gSV}$$

Dónde:

BMP = Potencial Bioquímico de Metano (L/gSV)

V_{TCH_4} = Volumen total de metano producido en el ensayo (L)

gSV = Masa de solidos volátiles del sustrato (g)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los datos y cálculos relacionados con la producción de metano y consumo de sustratos, realizados en el proyecto se encuentran en el anexo C y D.

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo fue un lodo granular procedente del reactor UASB de una planta de tratamiento de agua residual. El reactor UASB trata los vertimientos de agua azucarada generados por los derrames de jarabe o cambio de sabor en el proceso de producción. Las características fisicoquímicas del inóculo se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Características fisicoquímicas el inóculo.

Parámetro	Unidades	Valor
Solidos Totales	g/L	32,02
Solidos Volátiles	g/L	28,29
Solidos Suspendidos Totales	g/L	30,2
Solidos Suspendidos Volátiles	g/L	29,4
Relación SSV/SST		0,97
pH	Unidades	7,1
Alcalinidad Total	mg CaCO ₃ /L	1787,5
Ácidos Grasos Volátiles	meq/L	0,0013

Fuente: Autoras

La relación SSV/SST muestra una abundancia de solidos suspendidos volátiles, es decir, gran cantidad de bacterias activas útiles para la degradación de la materia orgánica. El valor típico de esta relación para que un tratamiento biológico sea viable es de 0,7, lo que indica que el inóculo utilizado fue adecuado para el arranque del proceso de digestión anaerobia (Castro, Fernández, & Chávez, 2008).

El pH del inóculo garantizó la actividad de las poblaciones bacterianas durante el proceso de DA al encontrarse dentro del rango de 6,8 y 7,5 (Herrera & Niño, 2012).

La alcalinidad representa la capacidad buffer y evita la acidificación del sistema, cuando su valor es superior a 1,5 g/l CaCO_3 (IDAE, 2007). Por consiguiente, el inóculo utilizado tiene buena capacidad buffer lo que garantizó el buen funcionamiento del digestor, al amortiguar los cambios de pH debido a la generación de AGV en el proceso.

Adicional a la caracterización fisicoquímica del inóculo, se evaluaron las actividades metanogénica, hidrolítica y acidogénica del mismo, con el fin de predecir su comportamiento en las pruebas de potencial bioquímico.

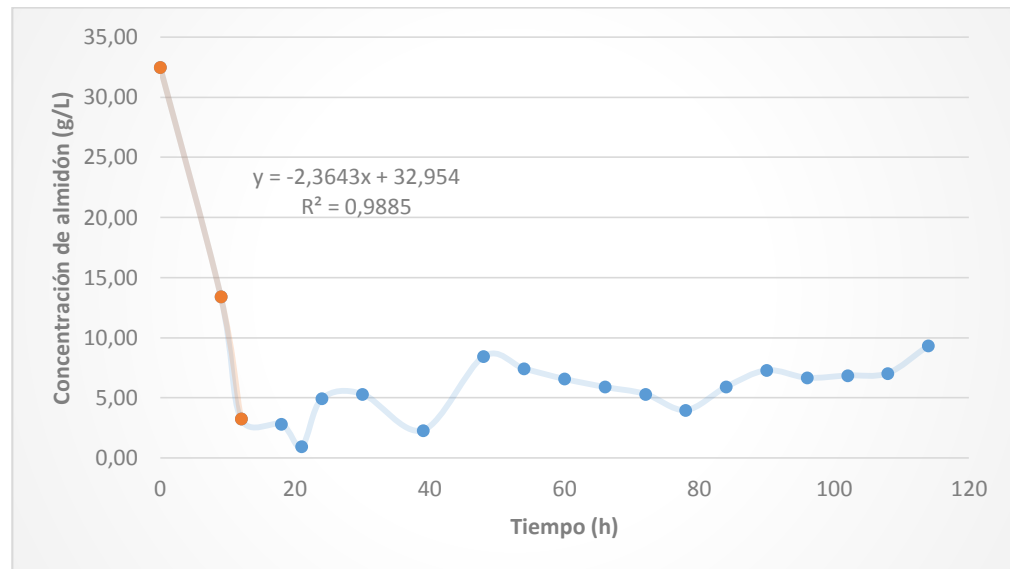
Actividad Hidrolítica (AH).

Para la prueba de AH se utilizó como sustrato una solución de almidón. El seguimiento de esta prueba se realizó evaluando el consumo del sustrato en el tiempo, el cual se hace determinando la concentración de azúcares totales y reductores, para establecer la concentración de almidón mediante la resta de estos.

El consumo de almidón se presenta en la imagen 8. Se puede observar que su máxima tasa de consumo se encuentra entre las 0 y 12 horas; además de la ausencia de un periodo de latencia, debido a la presencia en el inóculo de bacterias capaces de degradar el almidón.

Para realizar el cálculo de la actividad hidrolítica del lodo, fue necesario calcular la máxima pendiente del consumo de almidón mostrada en color naranja en la imagen 8. El valor de la pendiente fue de 2,3643 g glucosa/L.h, dando como resultado una actividad hidrolítica de 2,059 gDQO/gSSV.d.

Imagen 8. Consumo de almidón a través del tiempo



Fuente: Autoras

Actividad Acidogénica (AA).

Para la prueba de AA se utilizó como sustrato una solución de glucosa. El seguimiento de esta prueba se realizó evaluando el consumo del sustrato y la producción de ácidos grasos en el tiempo.

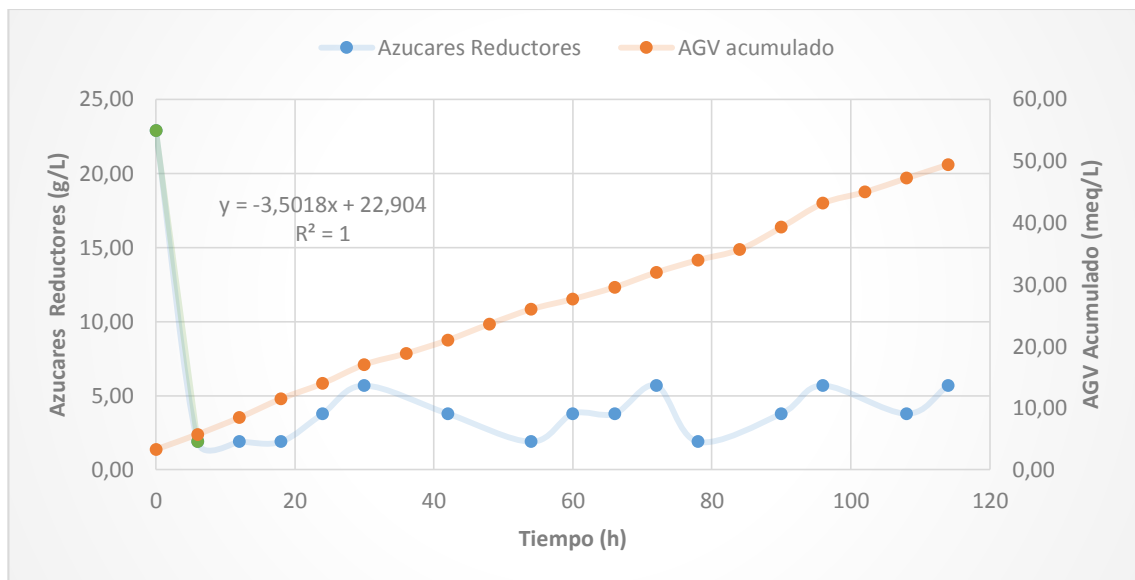
El consumo de glucosa y producción de ácidos grasos se representa en la imagen 9. Se puede observar que su máxima tasa de consumo se encuentra entre las 0 y 6 horas donde se desprecia un periodo de latencia por la presencia de bacterias acidogénicas en el inóculo capaces de degradar los azúcares en ácidos grasos volátiles. Una vez las bacterias acidogénicas alcanzan el pico inicial de consumo, la velocidad de consumo disminuye, mostrando un comportamiento constante.

En la imagen 9 los valores de ácidos grasos volátiles se encuentran acumulados, para una mejor interpretación, debido a que su concentración a través del tiempo presentaba un comportamiento fluctuante, por la presencia de bacterias

metanogénicas en el inóculo, las cuales convierten rápidamente los ácidos grasos en metano.

Para realizar el cálculo de la actividad acidogénica del lodo, fue necesario calcular la máxima pendiente del consumo de azúcares reductores mostrada en color verde en la imagen 9, la cual se presenta entre el tiempo 0-6 h, el valor de la pendiente es de 3,5019 g/L.h, dando como resultado una actividad acidogénica de 3,049 gDQO/gSSV.d. La AA es usualmente mayor que la actividad metanogénica debido a que el proceso se realiza primero y su producto (acetato) es usado durante la metanogénesis (Effebe, Baya , Jupsin , & Vassel, 2011).

Imagen 9. Consumo de glucosa y producción de AGV a través del tiempo



Fuente: Autoras

Actividad Metanogénica Específica (AME)

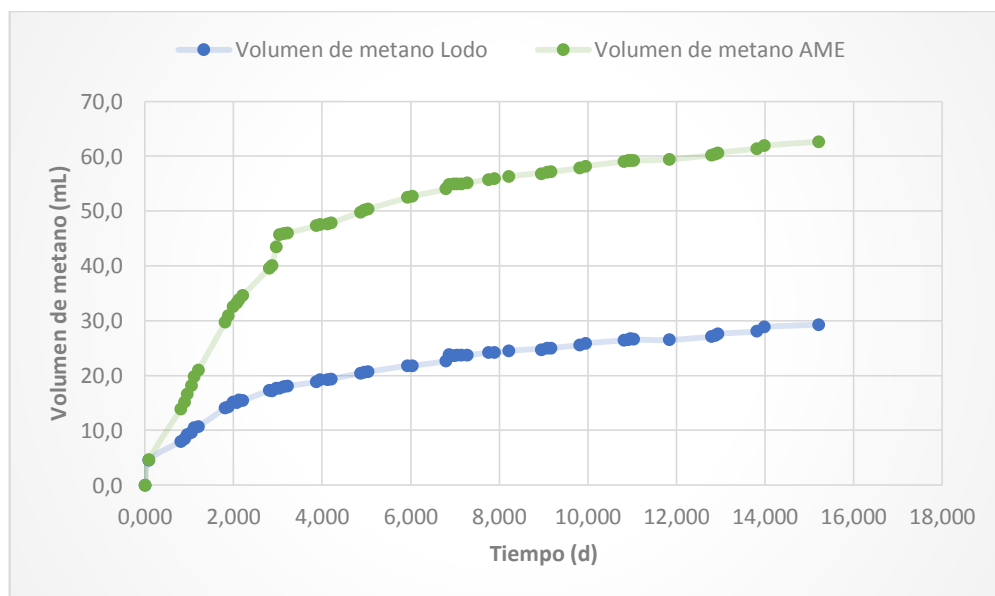
Para la prueba de AME se utilizó como sustrato una solución de AGV la cual contenía ácido acético, propiónico y butírico. Se agregó 12 mL de la solución, la cual representó en el reactor una concentración de 3,83 g DQO/L cumpliendo lo recomendado por Field (1987).

La producción de metano a través del tiempo se representa en la imagen 10. Se puede observar el volumen acumulado de metano a condiciones estándar (1 atm; 0°C) generado por el lodo endógenamente y el producido al agregar la solución de ácidos grasos volátiles.

En la imagen 10, se puede observar que el inóculo se adaptó rápidamente al sustrato al no observarse una fase de latencia marcada, pues a las 2 horas de empezar la prueba se registran datos de producción de metano, este hecho corrobora los resultados de la caracterización del inóculo, donde se planteó que la baja concentración de AGV representaban la rápida conversión de estos en metano.

Por otra parte, si se compara la curva de AME y la del lodo se puede inferir que no existieron inhibidores en el proceso, pues el comportamiento de la producción de metano fue similar en ambos casos, además, el ensayo no presentó variaciones bruscas y se mantuvo a temperatura constante (37°C +/- 0,1°C), lo cual permitió una estabilidad en el proceso (AGRO WASTE, 2013).

Imagen 10. Volumen Acumulado de metano a condiciones estándar.



Fuente: Autoras

Según valores de pH mostrados en la tabla 8, se puede evidenciar que hubo consumo de AGV pues el valor de pH aumentó.

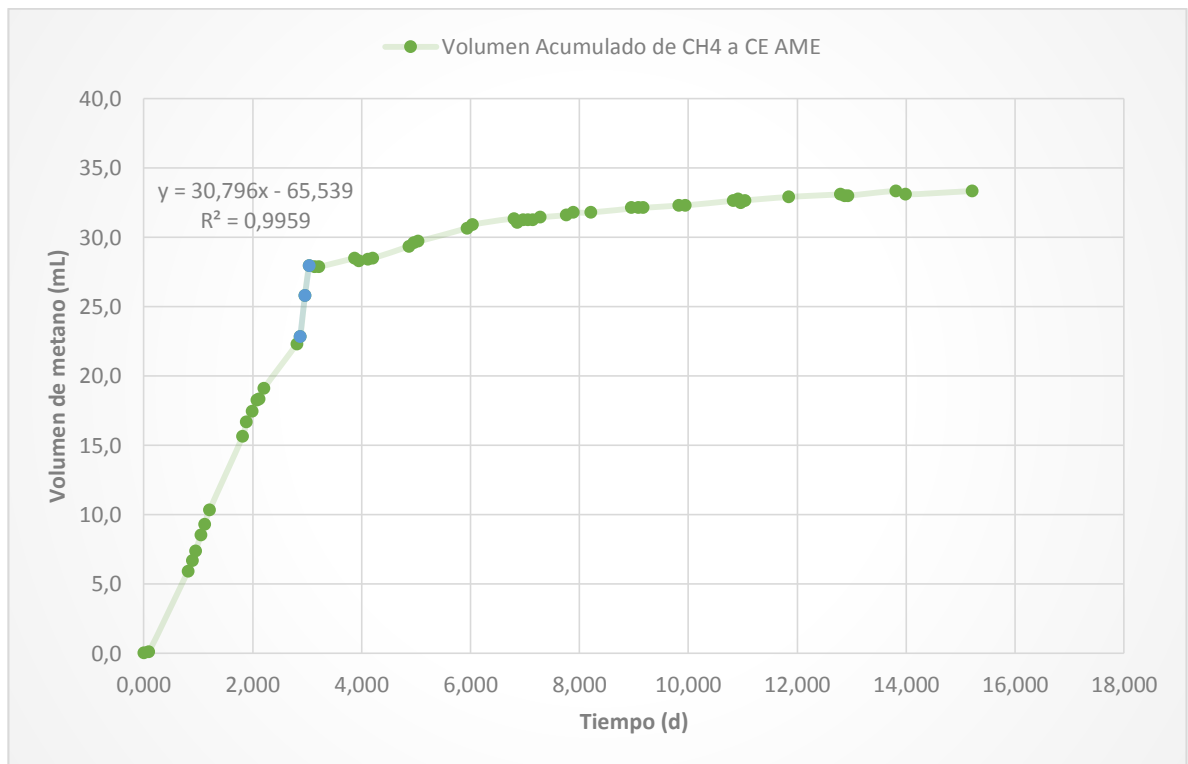
Tabla 8. pH del ensayo

	pH inicial	pH final
Lodo Solo	7,39	8,74
AME	7,47	8,83

Fuente: Autoras

Para realizar el cálculo de la actividad metanogénica del lodo, se hace necesario restar la producción endógena del lodo, dando como resultado la imagen 11. Se puede observar que la máxima pendiente se obtiene entre el tiempo 2,87-3,04 d representada en color azul. La pendiente máxima tiene un valor de 30,796 mL/d, dando como resultado una actividad metanogénica específica de 0,124 gDQOCH₄/gSSV.d.

Imagen 11. Volumen de metano acumulado Neto.



Fuente: Autoras

El valor de AME demuestra su potencial uso como inóculo pues está en el rango de 0,02-0,2 gDQOCH₄/gSSV.d los cuales son los recomendados para un lodo de digestor anaerobio según Silveira (2000).

Los valores de las actividades son análogos con los reportados por Poirrer (2005) los cuales corresponden a un lodo anaerobio procedente de reactor UASB de industria papelera. Los valores obtenidos por Poirrer (2005) son: 3,7 gDQO/gSSV.d para la AA, 2,26 gDQO/gSSV.d para la AH y 0,47gDQOCH₄/gSSV.d para la AME. Adicionalmente, Soto et al. (1993), reportan que la AME es más baja que la AA y la AH cuando el sustrato usado es soluble. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que el lodo utilizado proviene de un reactor anaerobio que trata aguas residuales provenientes de una industria de bebidas azucaradas.

Al comparar las actividades del inóculo, se pudo deducir que este presenta una mayor cantidad de bacterias acidogénicas, seguidas de las hidrolíticas. Por lo tanto, se espera que el inóculo pueda degradar fácilmente los compuestos de la microalga *Chlorella vulgaris* en la etapa hidrolítica, la cual es la etapa limitante en la DA de microalgas.

4.2 POTENCIAL BIOQUIMICO DE METANO Y COMPARACIÓN DE LOS PRETRATAMIENTOS

Para la prueba de BMP se utilizó como sustrato la microalga *Chlorella vulgaris* pretratada. La caracterización del sustrato (tabla 9) se realizó con el fin de determinar la cantidad de alga a adicionar en el ensayo y posteriormente para calcular el BMP. Se adicionó una cantidad de sustrato tal que la relación sustrato/inóculo (S/I) fuera de 0,5 gDQO/gSSV.

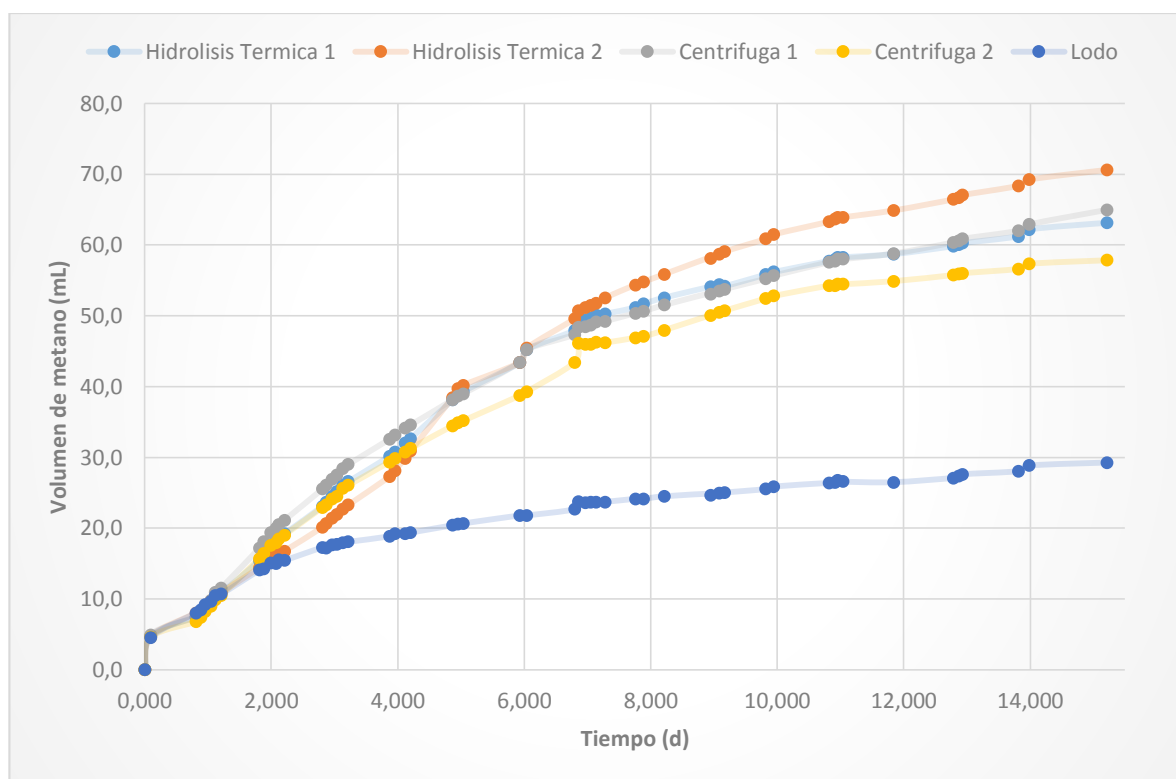
Tabla 9. Caracterización del sustrato.

Parámetro	Unidades	Valor	
		Centrifugación	Hidrolisis Térmica
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg/L	5409,745	3879,934
Sólidos volátiles	g/L	4,49	2,76

Fuente: Autoras

En la imagen 12, se puede observar que los ensayos que incluían *C. vulgaris* (Hidrolisis Térmica 1 y 2, Centrifuga 1 y 2) presentaron mayor producción de metano en comparación al ensayo que solo contenía inóculo, resultado congruente, ya que el ensayo con solo lodo no incluía una fuente de carbono adicional que aumentará el contenido de materia orgánica y, por lo tanto, esto se vio reflejado en los resultados.

Imagen 12. Volumen de metano acumulado



Fuente: Autoras

A fin de esclarecer diferencias en la producción de metano, se compararon los pretratamientos durante las dos fases de la digestión anaerobia (exponencial y

estacionaria), los cuales se presentan en la tabla 10. En la fase exponencial (0 a 3 días) se aprecia que el mayor valor de producción de metano se obtuvo en el pretratamiento por centrifugación: 29,4 ml CH₄. Sin embargo, en la fase estacionaria (4 a 15 días) sucede todo lo contrario, se observa claramente que el mayor valor se obtuvo con el pretratamiento por hidrólisis térmica: 37,5 ml CH₄, demostrando así un posible cambio en la composición del sustrato debido a la degradación ocasionada por el pretratamiento. Estos resultados indican que los pretratamientos empleados facilitan la degradación del sustrato, pero el pretratamiento por hidrólisis térmica resultó ser más efectivo, al acrecentar la producción de metano al final de la prueba.

Tabla 10. Producción de metano por fases

ENSAYO	EXPONENCIAL (0 A 3 DÍAS) (mL CH ₄)	ESTACIONARIA (4 A 15 DÍAS) (mL CH ₄)
Centrifugación	31,1	30,3
Hidrólisis Térmica	29,4	37,5
Lodo	19,2	10,1

Fuente: Autoras

El experimento se realizó durante 15 días, tiempo en el cual se observa que todos los ensayos alcanzaron la fase estacionaria como se muestra en la gráfica 6, por lo que se decidió detener la prueba. El volumen total de metano a condiciones estándar (1 atm; 0°C) producido durante los 15 días se evidencia en la tabla 11, donde se puede apreciar que el pretratamiento por hidrólisis térmica presentó mayor producción de metano, debido a que el pretratamiento aumento su biodegradabilidad, hecho que se corrobora con una DQO menor.

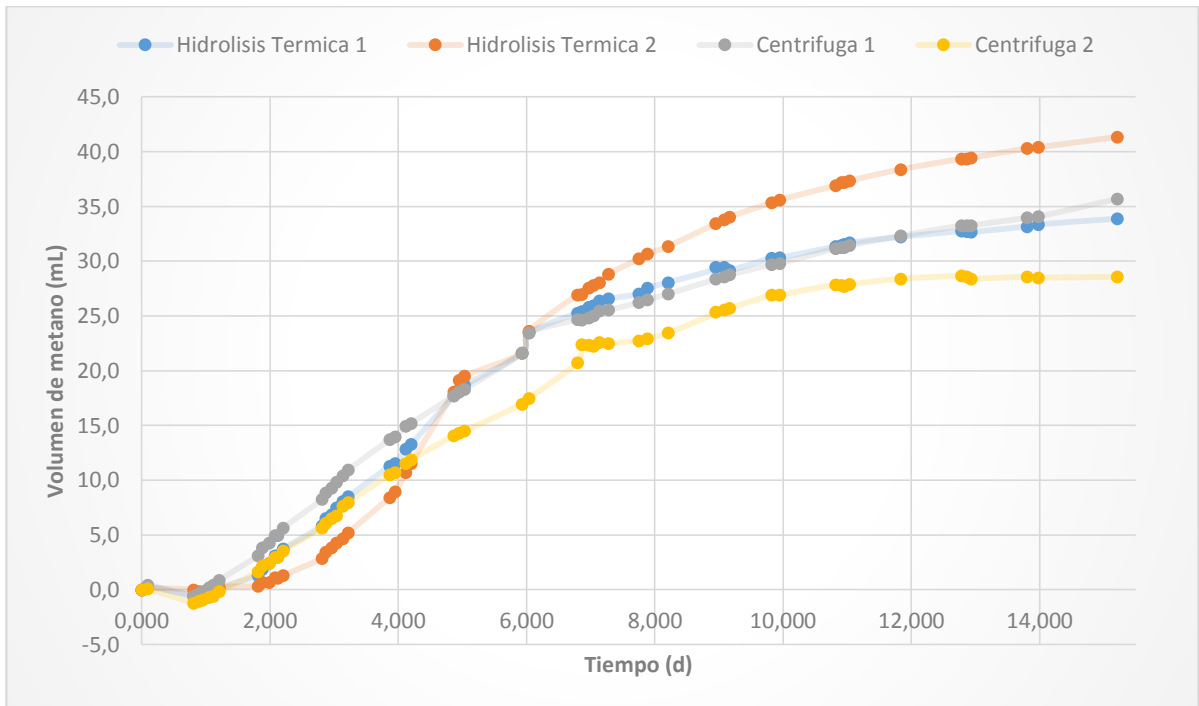
Tabla 11. Volumen de metano producido a los 15 días.

	Centrifugación	Hidrolisis Térmica
Ensayo 1	0,0357 L	0,0339 L
Ensayo 2	0,0286 L	0,0413 L
Promedio	0,0321 L	0,0375 L

Fuente: Autoras

En la imagen 13 se muestran el volumen de metano producido en cada ensayo restando la producción endógena del lodo, adicional se puede observar que el lodo se adapta rápidamente al sustrato mostrado una ausencia de periodo de latencia.

Imagen 13. Producción de metano acumulado

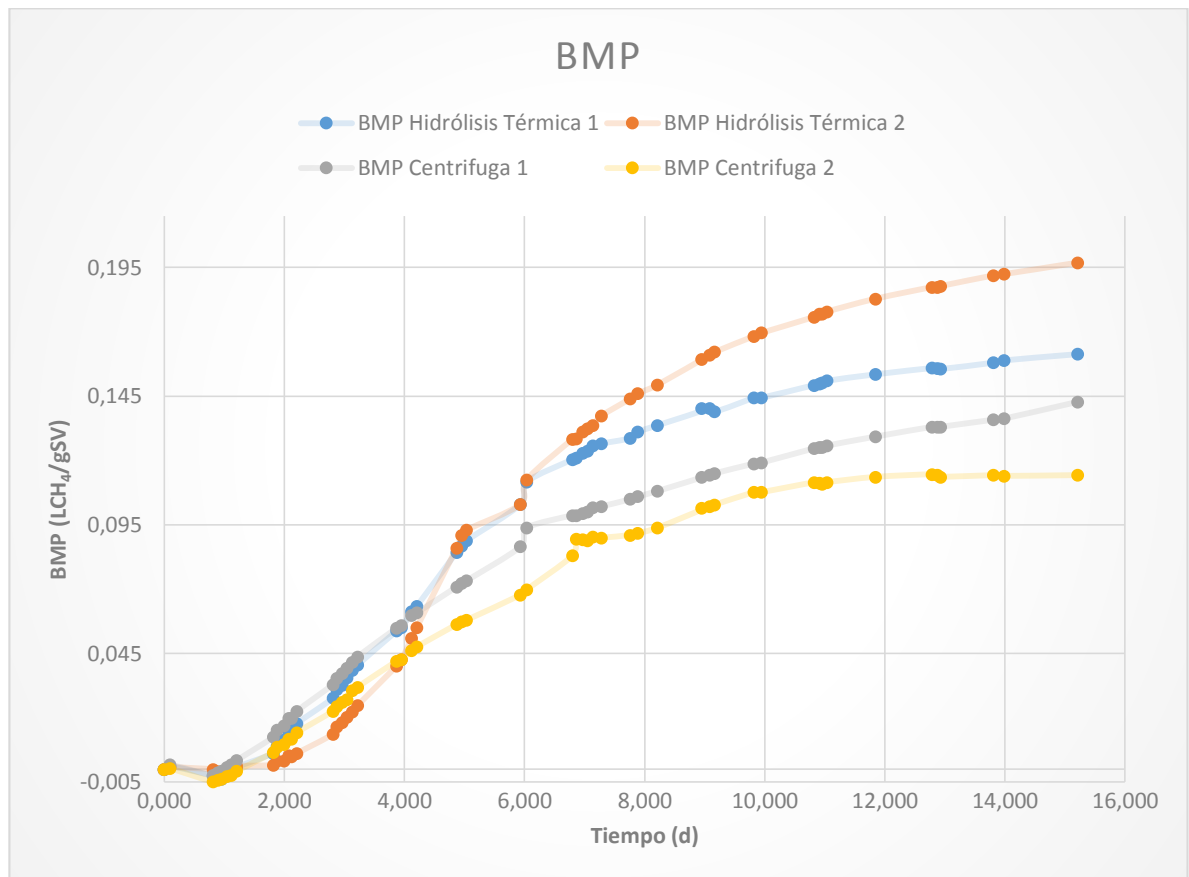


Fuente: Autores

El BMP teórico de la *Chlorella vulgaris* es de 0.566 LCH₄/gSV (Kumar Prajapati, Malik, & Kumar Vijay, 2014), sin embargo, estudios demuestran que en la práctica las microalgas tienen un menor rendimiento de metano (Passos, Uggetti, Carrère, & Ferrer, 2014). De acuerdo con los resultados obtenidos con el presente proyecto y utilizando la ecuación 8, el BMP del alga *C. vulgaris* sometida al pretratamiento por hidrólisis térmica fue de 0.18 LCH₄/gSV y por centrifugación fue de 0,13 LCH₄/gSV. Los valores obtenidos son bajos en comparación a otros autores debido a la duración del experimento (15 días). Ras et al. (2011) y Mahdy et al. (2015), encontraron valores de BMP de 0,24 L CH₄/gSV en 28 días y 0,22 L CH₄/gSV en 25

días respectivamente; los cuales demuestran un menor rendimiento en comparación con el BMP teórico. El comportamiento del BMP a través del tiempo se observa en la imagen 14.

Imagen 14. Evaluación de la BMP a través del tiempo



Fuente: Autoras

A partir de los valores obtenidos se puede deducir que la hidrólisis térmica es el pretratamiento de mayor rendimiento para la producción de metano a partir de la *C. vulgaris* utilizada como sustrato. Este hecho coincide con otros autores, donde se plantea que este es uno de los pretratamientos más efectivos (Alzate, Muñoz, Rogalla, Fdz-Polaco, & Pérez-Elvira, 2012; Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

5. CONCLUSIONES

El inóculo empleado presenta características fisicoquímicas y de actividad bacteriana que demuestran la presencia de consorcios microbianos capaces de degradar el sustrato utilizado en condiciones anaerobias, presentado una relación de SSV/SST de 0,97, actividad acidogénica de 3,049 gDQO/gSSV.d, siendo este el valor más alto de las actividades confrontadas con 2,059 gDQO/gSSV.d y 0,124 gDQOCH₄/gSSV.d los cuales corresponden a los valores de actividad hidrolítica y metanogénica, respectivamente.

La ausencia del periodo de latencia en las diferentes pruebas se atribuye a la rápida adaptación del inóculo a los diferentes sustratos utilizados durante la elaboración del proyecto, además en la prueba de BMP el inóculo logró degradar la microalga, utilizándola como fuente de carbono para la producción de metano en condiciones anaerobias.

El pretratamiento influyo en la producción de metano, mostrando un mayor rendimiento al utilizar hidrolisis térmica, el cual arrojó un 38,5% más de producción en comparación al pretratamiento por centrifugación.

El BMP de la *Chlorella vulgaris* sometida a centrifugación fue de 0,13 LCH₄/gSV y por hidrólisis térmica de 0,18LCH₄/gSV. El pretratamiento de hidrolisis térmica mejoró la biodegradabilidad de la microalga, hecho que se corrobora al tener una DQO menor.

6. RECOMENDACIONES

Evaluar los compuestos generados al degradar la microalga *Chlorella vulgaris* anaerobiamente, pues estos pueden ser inhibidores del proceso de digestión anaerobia.

Evaluar los costos de los pretratamientos aplicados, para su posible uso industrial.

Cambiar diseño de los reactores, para garantizar un seguimiento en variables como pH, alcalinidad, AGV y algunos inhibidores durante el proceso de DA.

Utilizar un co-sustrato en la DA de la microalga, con el fin de obtener mejores rendimientos en la producción de metano.

7. BIBLIOGRAFIA

21. (25 de Enero de 2016). Obtenido de Concurso Universitario Feria de Las Ciencias: <http://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria17/21.pdf>
- AGRO WASTE. (Febrero de 2013). *DIGESTION-ANAEROBIA*. Recuperado el 02 de Febrero de 2016, de Agrowaste: <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/DIGESTION-ANAEROBIA.pdf>
- Alzate M., M. S., & Quintero S., M. (s.f.). Caracterización de grupos tróficos durante un proceso de digestión anaerobia con lodo estiércol bovino usando un método de bajo costo. *ION, In Press Proof*.
- Alzate, M. E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polaco, F., & Pérez-Elvira, S. (2012). Biochemical methane potencial of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresource Technology*, 123, 488-494.
- Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews of the anaerobic biodegradability of macropollutants*, 117-129.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, L., Guwy, A., y otros. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*, 59(5), 927-934.
- APHA. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewaters*. Washington.
- Bernnan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- Bischoff, H., & Bold, H. (1963). Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species. *University of Texas Publications(6318)*, 1-95.

- Borowitzka, M. A., & Noheimani, N. (Edits.). (2013). *Algae for Biofuels and Energy*. Springer.
- Burlew, J. (1953). Algae culture: from laboratory to pilot plant. *Carnegie Institution of Washington*, 1-357.
- Cajigas, Á. A., Pérez, A., & Torres, P. (2005). Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Scientia et Technica Año XI*, 243-248.
- Castro, F., Fernández, N., & Chávez, M. (2008). Disminución de la DQO en aguas de formación utilizando cepas bacterianas. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 31(3), 246-255.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102, 71-81.
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Buffi, M., Rizzo, A., & Pari, L. (2016). Review and experimental study on pyrolysis and hydrothermal liquefaction of microalgae for biofuel production. *Applied Energy*.
- Chynoweth, D., Turick, C., Owens, J., Jerger, D., & Peck, M. (1993). Biochemical Methane potential of Biomass and waste feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 5(1), 95-111.
- Consejería de economía, innovación y ciencia. (Septiembre de 2011). *Agencia Andaluza De La Energía*. Recuperado el 29 de Abril de 2015, de Estudio basico del Biogas: https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/sites/default/files/estudio_basico_del_biogas_0.pdf
- Cook, P. (1950). Large-scale culture of *Chlorella*. En P. G. Brunel J, *The culture of algae*. Charles F. Kettering Foundation (págs. 57-77).
- Doublet, J., Boulanger, A., Ponthieux, A., Laroche, C., Poitrenaud, M., & Chacho River, J. (2013). Predicting the biochemical methane potential of wide range

- of organic substrates by near infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, 252–258.
- Dubois, M., Pilles, K., Hamilton, J., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Abakytical Chemistry*, 350-355.
- Effebi, K., Baya , T., Jupsin , H., & Vasel, J. (2011). Acidogenic and Methanogenic activities in Anaerobic Ponds. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 2(12), 1-4.
- Eskicioglu, C., Kennedy, K., & Droste, R. (2009). Enhanced disinfection and methane production from sewage sludge by microwave irradiation. *Desalination*, 248, 279-285.
- Fenton, O., & Ohuallachain, D. (2012). Agricultural nutrient surplus as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): a review. *Algal Research*, 40-56.
- Field, J. (1987). Parametros operativos delmanto de lodos anaeróbicos de flujo ascendente. En C. Universidad del Valle, *Manual de Arranque y operación de flujo ascendente con manto de lodos - UASB* (págs. C1-C57). Santiago de Cali.
- Golieke, C., Oswald, W., & Gotaas, H. (Enero de 1957). Anaerobic Digestion of Algae. *Applied Microbiology*, 5(1), 47-55.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. (Febrero de 2012). Thermal pretreatment to improve methane production of Scenedesmus biomass. *Biomass & Energy*, 40, 105-111.
- Gonzalez-Sanchez, M., Perez-Fabiel, S., Wong-Villareal, A., Bello-Mendoza, R., & Yañez-Ocampo, G. (2015). Agroindustrial wastes methanization and bacterial composition in anaerobic digestion. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 229-235.

- Grima, M., Belarbi, E., Fernandez, F., Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8), 491-515.
- Habig, C., & Ryther, J. (1982). Methane production from the anaerobic digestion of some marine macrophytes. *Resources and Conservation*, 8(3), 271-279.
- Harder, R., & von Witsch, H. (1942). Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Microorganismen. *Forschungsdienst Sonderheft*, 16, 270-275.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G., & Danquah, M. (2010). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Herrera, D., & Niño, D. (2012). *Evaluación del potencial producción de biogas a partir de aguas residuales provenientes de la industria palmera mediante la digestión anaerobia*. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Hunter Long, J., Aziz, T., de los Reyes II, F., & Ducoste, J. (2012). Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. *Process Safety and Environmental Protection*, 90(3), 231-245.
- IDAE. (Octubre de 2007). *Titulo 5: Digestores Anaerobios*. Recuperado el 2 de Marzo de 2016, de IDAE, Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía:
http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10737_Biomasa_digestores_07_a996b846.pdf
- Jain, S., Jain, S., Wolf, I., Lee, J., & Tong, Y. (Diciembre de 2015). A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 142-154.

- Kanno, T., & Uyama, K. (2005). *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. *Woodland Publishing*, 63.
- Keenan, J. (1976). Bioconversion of solar energy to methane. *Energy*, 2, 355-373.
- Knuckey, R., Brown, M., Robert, R., & Frampton, D. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering.*, 35, 300-313.
- Kumar Prajapati, S., Malik, A., & Kumar Vijay, V. (2014). Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Applied Energy*, 114, 790-197.
- Lam, M., & Lee, K. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3), 673-690.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2015). Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semi-continuous anaerobic digestion. *Fuel*, 158, 35-41.
- Manjantharat, S. (2013). *Biochemical Methane Potential Estimation of Feed Mixtures Used for Dry Anaerobic Digestion*. Thailand: Asian Institute of Technology.
- Milano, J., Chyan, H., Massjuki, H., Chong, W., Lam, M., Kwan Loh, y otros. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180-197.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(1), 426-428.
- Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. (2010). *Plan de Acción Nacional de Energías Renovables 2011-2020*. Madrid: Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE).
- Mohn, F. (1980). Experiences and strategies in the recovery. *Algal biomass*, 547-571.
- Mosquera Calle, J., & Martínez Martínez, B. (2012). *Evaluación de la digestión anaerobia como alternativa de estabilización de biosólidos producidos en la*

- planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Mussgnung, J., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150, 51-56.
- Ortiz Jordá, V. (2011). *Puesta a punto de una metodología para la determinación de la actividad metanogénica específica (AME) de un fango anaerobio mediante el sistema OXITOP®. Influencia de las principales variables experimentales*. Valencia: Universitat Politècnica De València.
- Oswald, W., & Golueke, C. (1960). The energetic recovery of the algal biomass by anaerobic digestion. *Biological transformation of solar energy*, 2, 223-262.
- Owen, W., Stuckey, D., Healy Jr., J., Young, L., & McCarty, P. (1979). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13(6), 485-492.
- Parra Ortiz, B. (2014). *Producción de metano a partir de la digestión anaerobia de biorresiduos de origen municipal*. Cali: Universidad del Valle.
- Parra-Orobio, B., Torres-Lozada, P., Marnolejo-Rebellón, L., Cárdenas-Cleves, L., Vásquez-Franco, C., Torres-López, W., y otros. (2015). Efecto de la relación sustrato-inóculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XVI(4), 515-526.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, 172, 403-412.
- Poirrer González, P. (2005). *Hidrólisis y acidificación psicrófila de moléculas complejas en sistemas anaerobios*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela .
- Quintero, M., Castro, L., Ortiz, C., Guzmán, C., & Escalante, H. (2012). Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fiqué's bagasse as an example. *Bioresource Technology*, 108, 8-13.

- Raposo, F., De la Rubia, M., Fernández-Cegrí, V., & Botja, R. (2011). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 861-877.
- Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Barnet, N., & Steyer, J.-P. (2011). Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 102(1), 200-206.
- Rawat, I., Ranjaith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424.
- Rey Devesa, L. (2014). *Obtención de biogás a partir de codigestión anaerobia de microalgas y fangos de EDAR*. Barcelona: ETSEIB.
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., & Olabi, A. (2015). Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Processing Technology*, 138, 765-776.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Santolaria Capdevila, C. (2014). *Diseño de un modelo semiempírico de codigestión anaerobia*. Universidad Zaragoza.
- Silveira, I., & Monteggia, L. (2000). Caracterizacao da biomassa metanogénica presente em reactores alimentados por efluentes de baixa carga organica através de teste de actividade. En *Memorias VI Taller y Seminario Latinoamericano de Digestión Anaerobia* (págs. 162-165). Recife, Brasil.
- Soto, M., Méndez, R., & Lema, J. (Agosto de 1993). Methanogenic and non-methanogenic activity test. Theoretical basis and experimental set up. *Water Research*, 27(8), 1361-1376.

- Torres Lozada, P., & Pérez, A. (Noviembre de 2010). Actividad metanogénica específica: Una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *EIDENAR*(9), 5-14.
- Vasumathi, K., Premaltha, M., & Subramanian, P. (2012). Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Wu-haan, W. (2008). *Evaluation of ultrasonic pretreatment on anaerobic digestion of biomass for methane production*. Ames: Iowa State University.
- Yuan, H., & Zhu, N. (2016). Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 429-438.
- Zhou, Y., Zhang, Z., Nakamoto, T., Li, Y., Yang, Y., Utsumi, M., y otros. (2011). Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3251-3256.

ANEXOS

ANEXO A. Preparación del reactivo DNS y su respectiva curva de calibración.

Para preparar el reactivo DNS es necesario:

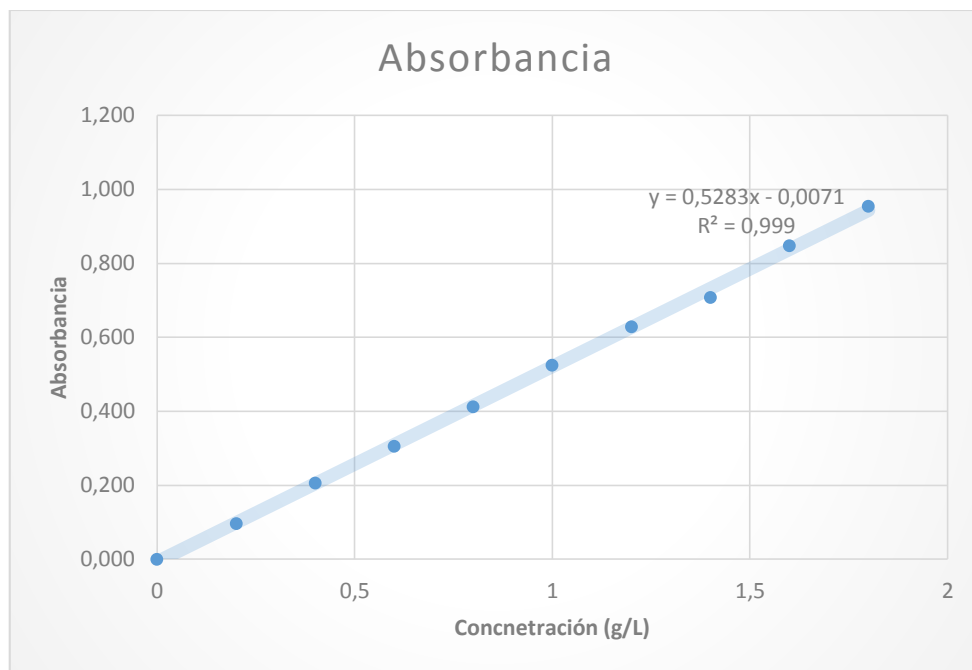
- ✓ 75 g de tartrato sodio potasio
- ✓ 2,5 g de Ácido Di-nitro-salicílico
- ✓ 4 g de NaOH
- ✓ Balón aforado de 250 mL
- ✓ Vaso precipitado de 250 mL y 100 mL
- ✓ Agua destilada
- ✓ Gotero

Procedimiento:

1. Pesar los reactivos.
2. Disolver el tartrato y el NaOH en 100 mL de agua en el vaso precipitado de 250 mL.
3. En el vaso precipitado de 100 mL agregar un poco de agua destilada y disolver el ácido di-nitro-salicílico.
4. Agregarlo con gotero poco a poco a la solución de tartrato y NaOH.
5. Llevar al balón aforado y aforar a 250mL.
6. Conservar en botella ámbar envuelta en aluminio a temperatura ambiente.

Curva de Calibración:

Imagen 15. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores



Fuente: Autoras

Tabla 12. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores

Concentración (g/L)	Absorbancia (540nm)
0	0,000
0,2	0,097
0,4	0,206
0,6	0,306
0,8	0,412
1	0,525
1,2	0,629
1,4	0,708
1,6	0,848
1,8	0,954

Fuente: Autoras

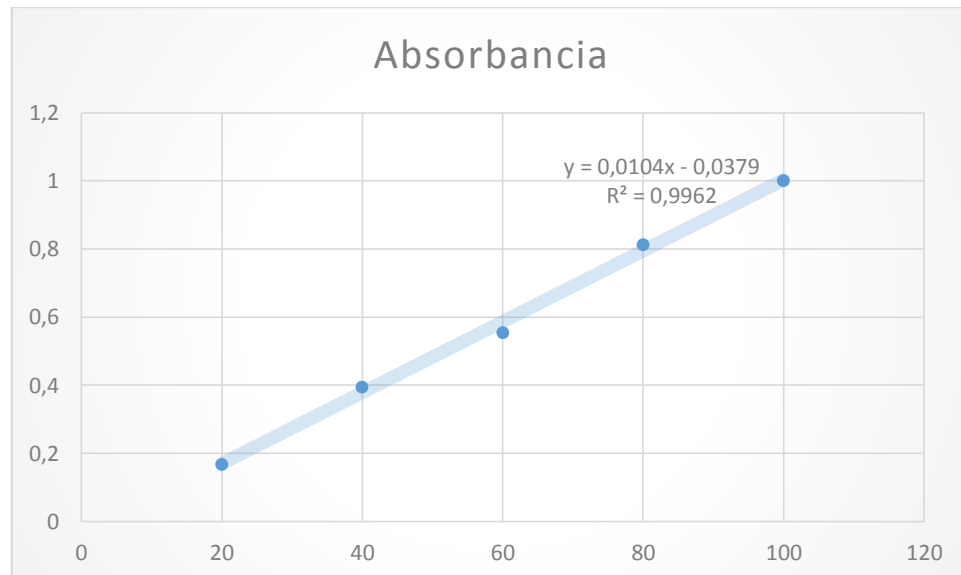
ANEXO B. Curva de calibración para la prueba de azúcares totales.

Tabla 13. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales

Concentración (mg/L)	Absorbancia (490 nm)
20	0,169
40	0,396
60	0,555
80	0,813
100	1,002

Fuente: Autoras

Imagen 16. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales



Fuente: Autoras

ANEXO C. Datos de producción de metano

Tabla 14. Datos de presión del ensayo

Fecha	Temperatura (°C)	Tiempo (d)	Presión (hPa)					
			<i>Hidrolisis Térmica 1</i>	<i>Hidrolisis Térmica 2</i>	<i>Centrifuga 1</i>	<i>Centrifuga 2</i>	<i>Lodo</i>	<i>AME</i>
01/02/2016 13:08	37,0	0,000	0	0	0	0	0	0
01/02/2016 15:21	37,0	0,092	55	54	57	53	52	53
02/02/2016 8:35	36,9	0,810	86	92	85	78	92	160
02/02/2016 10:31	37,0	0,891	90	95	93	85	97	174
02/02/2016 12:00	36,9	0,953	97	103	104	95	106	191
02/02/2016 14:16	37,0	1,047	109	112	113	103	111	209
02/02/2016 15:55	36,9	1,116	119	121	126	114	121	228
02/02/2016 18:08	37,0	1,208	125	126	133	121	123	242
03/02/2016 8:41	37,0	1,815	177	166	198	181	162	342
03/02/2016 10:20	37,0	1,883	186	172	208	189	164	356
03/02/2016 12:55	36,9	1,991	202	182	223	202	174	375
03/02/2016 15:01	36,9	2,078	209	186	230	207	173	383
03/02/2016 16:02	37,0	2,121	215	191	236	213	179	390
03/02/2016 18:06	37,0	2,207	221	193	243	219	178	398
04/02/2016 8:35	37,1	2,810	266	232	294	264	199	456
04/02/2016 10:05	37,0	2,873	273	238	300	268	198	461
04/02/2016 12:10	37,0	2,960	282	247	310	278	203	500
04/02/2016 14:05	37,0	3,040	290	253	317	282	204	526
04/02/2016 16:21	36,9	3,134	300	261	327	295	207	528
04/02/2016 18:23	37,0	3,219	306	268	334	300	208	529
05/02/2016 10:00	37,1	3,869	347	314	375	338	217	545
05/02/2016 12:00	37,0	3,953	354	324	382	344	221	547
05/02/2016 16:00	37,0	4,119	369	344	393	354	221	548

Fecha	Temperatura (°C)	Tiempo (d)	Presión (hPa)					
			<i>Hidrolisis Térmica 1</i>	<i>Hidrolisis Térmica 2</i>	<i>Centrifuga 1</i>	<i>Centrifuga 2</i>	<i>Lodo</i>	<i>AME</i>
05/02/2016 18:00	37,0	4,203	376	356	398	360	223	551
06/02/2016 10:00	37,0	4,869	439	443	439	397	235	573
06/02/2016 12:00	37,0	4,953	447	457	445	402	237	578
06/02/2016 14:00	37,0	5,036	453	463	449	405	238	580
07/02/2016 11:30	37,0	5,932	500	500	500	446	251	604
07/02/2016 14:00	37,0	6,036	521	523	521	452	251	607
08/02/2016 8:14	37,0	6,796	552	571	545	500	261	622
08/02/2016 9:48	37,4	6,861	567	585	558	532	274	632
08/02/2016 12:24	36,9	6,969	569	589	558	529	272	632
08/02/2016 14:18	37,0	7,049	572	593	561	529	273	633
08/02/2016 16:28	37,0	7,139	577	596	566	533	273	633
08/02/2016 19:50	37,0	7,279	579	605	567	532	273	635
09/02/2016 7:18	37,0	7,757	589	626	580	540	278	642
09/02/2016 10:24	37,0	7,886	595	631	583	542	278	644
09/02/2016 18:13	36,9	8,212	605	643	593	552	282	648
10/02/2016 15:04	36,9	9,081	626	676	616	581	287	657
10/02/2016 12:00	37,0	8,953	623	669	611	576	284	654
10/02/2016 17:08	37,0	9,167	624	680	619	584	288	658
11/02/2016 8:50	37,1	9,821	643	701	636	604	294	666
11/02/2016 11:50	37,0	9,946	647	708	641	608	298	670
12/02/2016 8:47	37,1	10,819	665	729	663	625	304	680
12/02/2016 11:00	37,0	10,911	667	733	665	625	305	682
12/02/2016 12:09	37,0	10,959	671	736	668	627	308	682
12/02/2016 14:00	37,0	11,036	671	736	668	627	306	682
13/02/2016 9:19	37,0	11,841	676	747	677	632	305	684

Fecha	Temperatura (°C)	Tiempo (d)	Presión (hPa)					
			<i>Hidrolisis Térmica 1</i>	<i>Hidrolisis Térmica 2</i>	<i>Centrifuga 1</i>	<i>Centrifuga 2</i>	<i>Lodo</i>	<i>AME</i>
14/02/2016 8:03	37,0	12,788	689	765	695	642	312	693
14/02/2016 10:02	37,1	12,871	692	768	698	644	315	695
14/02/2016 11:30	37,0	12,932	694	772	701	645	318	698
15/02/2016 8:36	37,0	13,811	705	787	714	652	323	707
15/02/2016 12:45	36,9	13,984	716	797	724	660	332	713
16/02/2016 18:16	37,0	15,214	727	813	748	666	337	721

Fuente: Autoras

Tabla 15. Volumen de metano acumulado.

Fecha	Temperatura (°C)	Tiempo (d)	Volumen de metano					
			<i>Hidrolisis Térmica 1</i>	<i>Hidrolisis Térmica 2</i>	<i>Centrifuga 1</i>	<i>Centrifuga 2</i>	<i>Lodo</i>	<i>AME</i>
01/02/2016 13:08	37,0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
01/02/2016 15:21	37,0	0,092	4,8	4,7	5,0	4,6	4,5	4,6
02/02/2016 8:35	36,9	0,810	7,5	8,0	7,4	6,8	8,0	13,9
02/02/2016 10:31	37,0	0,891	7,8	8,3	8,1	7,4	8,4	15,1
02/02/2016 12:00	36,9	0,953	8,4	8,9	9,0	8,3	9,2	16,6
02/02/2016 14:16	37,0	1,047	9,5	9,7	9,8	8,9	9,6	18,2
02/02/2016 15:55	36,9	1,116	10,3	10,5	10,9	9,9	10,5	19,8
02/02/2016 18:08	37,0	1,208	10,9	10,9	11,6	10,5	10,7	21,0
03/02/2016 8:41	37,0	1,815	15,4	14,4	17,2	15,7	14,1	29,7
03/02/2016 10:20	37,0	1,883	16,2	14,9	18,1	16,4	14,2	30,9
03/02/2016 12:55	36,9	1,991	Q3	15,8	19,4	17,6	15,1	32,6
03/02/2016 15:01	36,9	2,078	18,2	16,2	20,0	18,0	15,0	33,3
03/02/2016 16:02	37,0	2,121	18,7	16,6	20,5	18,5	15,5	33,9
03/02/2016 18:06	37,0	2,207	19,2	16,8	21,1	19,0	15,5	34,6
04/02/2016 8:35	37,1	2,810	23,1	20,1	25,5	22,9	17,3	39,6

Fecha	Temperatura (°C)	Tiempo (d)	Volumen de metano					
			<i>Hidrolisis Térmica 1</i>	<i>Hidrolisis Térmica 2</i>	<i>Centrifuga 1</i>	<i>Centrifuga 2</i>	<i>Lodo</i>	<i>AME</i>
04/02/2016 10:05	37,0	2,873	23,7	20,7	26,1	23,3	17,2	40,0
04/02/2016 12:10	37,0	2,960	24,5	21,5	26,9	24,1	17,6	43,4
04/02/2016 14:05	37,0	3,040	25,2	22,0	27,5	24,5	17,7	45,7
04/02/2016 16:21	36,9	3,134	26,1	22,7	28,4	25,6	18,0	45,9
04/02/2016 18:23	37,0	3,219	26,6	23,3	29,0	26,1	18,1	45,9
05/02/2016 10:00	37,1	3,869	30,1	27,3	32,6	29,3	18,8	47,3
05/02/2016 12:00	37,0	3,953	30,7	28,1	33,2	29,9	19,2	47,5
05/02/2016 16:00	37,0	4,119	32,1	29,9	34,1	30,7	19,2	47,6
05/02/2016 18:00	37,0	4,203	32,7	30,9	34,6	31,3	19,4	47,9
06/02/2016 10:00	37,0	4,869	38,1	38,5	38,1	34,5	20,4	49,8
06/02/2016 12:00	37,0	4,953	38,8	39,7	38,7	34,9	20,6	50,2
06/02/2016 14:00	37,0	5,036	39,3	40,2	39,0	35,2	20,7	50,4
07/02/2016 11:30	37,0	5,932	43,4	43,4	43,4	38,7	21,8	52,5
07/02/2016 14:00	37,0	6,036	45,3	45,4	45,3	39,3	21,8	52,7
08/02/2016 8:14	37,0	6,796	47,9	49,6	47,3	43,4	22,7	54,0
08/02/2016 9:48	37,4	6,861	49,2	50,7	48,4	46,2	23,8	54,8
08/02/2016 12:24	36,9	6,969	49,4	51,2	48,5	46,0	23,6	54,9
08/02/2016 14:18	37,0	7,049	49,7	51,5	48,7	45,9	23,7	55,0
08/02/2016 16:28	37,0	7,139	50,1	51,8	49,2	46,3	23,7	55,0
08/02/2016 19:50	37,0	7,279	50,3	52,6	49,3	46,2	23,7	55,2
09/02/2016 7:18	37,0	7,757	51,2	54,4	50,4	46,9	24,1	55,8
09/02/2016 10:24	37,0	7,886	51,7	54,8	50,6	47,1	24,1	55,9
09/02/2016 18:13	36,9	8,212	52,6	55,9	51,5	48,0	24,5	56,3
10/02/2016 15:04	36,9	9,081	54,4	58,7	53,5	50,5	24,9	57,1
10/02/2016 12:00	37,0	8,953	54,1	58,1	53,1	50,0	24,7	56,8
10/02/2016 17:08	37,0	9,167	54,2	59,1	53,8	50,7	25,0	57,2

Fecha	Temperatura (°C)	Tiempo (d)	Volumen de metano					
			<i>Hidrolisis Térmica 1</i>	<i>Hidrolisis Térmica 2</i>	<i>Centrifuga 1</i>	<i>Centrifuga 2</i>	<i>Lodo</i>	<i>AME</i>
11/02/2016 8:50	37,1	9,821	55,8	60,9	55,2	52,4	25,5	57,8
11/02/2016 11:50	37,0	9,946	56,2	61,5	55,7	52,8	25,9	58,2
12/02/2016 8:47	37,1	10,819	57,7	63,3	57,6	54,3	26,4	59,0
12/02/2016 11:00	37,0	10,911	57,9	63,7	57,8	54,3	26,5	59,2
12/02/2016 12:09	37,0	10,959	58,3	63,9	58,0	54,5	26,8	59,2
12/02/2016 14:00	37,0	11,036	58,3	63,9	58,0	54,5	26,6	59,2
13/02/2016 9:19	37,0	11,841	58,7	64,9	58,8	54,9	26,5	59,4
14/02/2016 8:03	37,0	12,788	59,8	66,4	60,4	55,8	27,1	60,2
14/02/2016 10:02	37,1	12,871	60,1	66,7	60,6	55,9	27,4	60,3
14/02/2016 11:30	37,0	12,932	60,3	67,1	60,9	56,0	27,6	60,6
15/02/2016 8:36	37,0	13,811	61,2	68,4	62,0	56,6	28,1	61,4
15/02/2016 12:45	36,9	13,984	62,2	69,3	62,9	57,3	28,8	62,0
16/02/2016 18:16	37,0	15,214	63,1	70,6	65,0	57,8	29,3	62,6

ANEXO D. Consumo de sustrato

Actividad Hidrolítica

Tabla 16. Consumo de Almidón

Tiempo (h)	Almidón (g/L)
0	32,51
9	13,44
12	3,26
18	2,81
21	0,95
24	4,93
30	5,33
39	2,31
48	8,44
54	7,44
60	6,58
66	5,91
72	5,33
78	3,99
84	5,91
90	7,29
96	6,68
102	6,87
108	7,06
114	9,33

Actividad Acidogénica

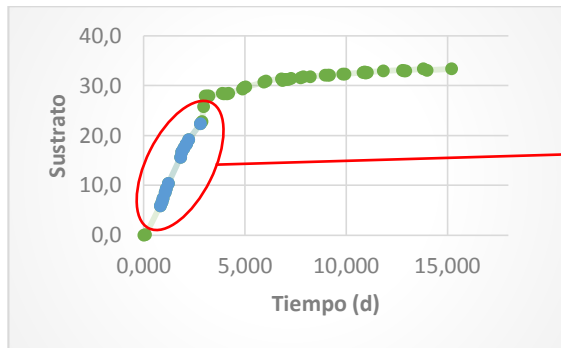
Tabla 17. Consumo de Azúcares Reductores y producción acumulada de AGV

Tiempo (h)	Azúcares Reductores (g/L)	AGV acumulado (meq/L)
0	22,90	3,30
6	1,89	5,74
12	1,89	8,44
18	1,89	11,49
24	3,79	13,99
30	5,68	17,04
42	3,79	21,00
54	1,89	26,00
60	3,79	27,65
66	3,79	29,56
72	5,68	31,96
78	1,89	33,96
90	3,79	39,26
96	5,68	43,16
108	3,79	47,21
114	5,68	49,41

ANEXO E. Determinación de la pendiente máxima y del factor de conversión de metano

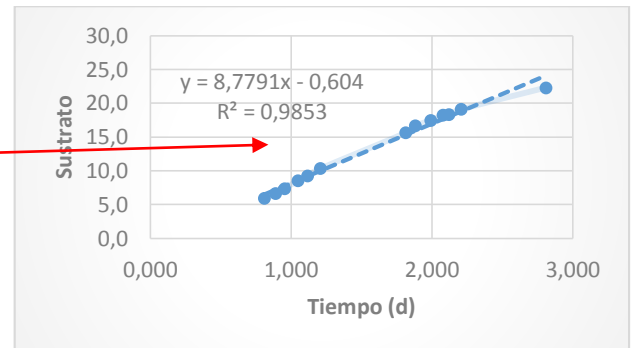
Determinación de la pendiente máxima:

Imagen 17. Consumo o producción de sustrato



Fuente: Autoras

Imagen 18. Determinación de la pendiente máxima



Fuente: Autoras

Determinación del Factor de Conversión de metano:

Se hace necesario hacer una interpolación en los datos de la tabla 18.

Tabla 18. Factor de conversión de metano

Temperatura (°C)	Factor de conversión (mL CH ₄ /gDQO)
10	357
15	376
20	385
25	394
30	405
35	418
40	443
45	450
50	471

Fuente: Field (1987)