

IMPLEMENTACIÓN DE UN MONTAJE DE REFERENCIA PARA LA EVALUACIÓN  
DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO EN LA DEGRADACIÓN DE  
CONTAMINANTES PROVENIENTES DE LA AGROINDUSTRIA COLOMBIANA

CAMILO ANDRÉS ORTIZ ENCISO  
JESÚS DAVID CARVAJAL DUEÑEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA EN ENERGÍA  
BUCARAMANGA

2022

IMPLEMENTACIÓN DE UN MONTAJE DE REFERENCIA PARA LA EVALUACIÓN  
DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO EN LA DEGRADACIÓN DE  
CONTAMINANTES PROVENIENTES DE LA AGROINDUSTRIA COLOMBIANA

CAMILO ANDRÉS ORTIZ ENCISO  
JESÚS DAVID CARVAJAL DUEÑEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO  
EN ENERGÍA

DIRECTOR DE PROYECTO  
Prof. ALEXANDER MENESES JÁCOME

CODIRECTORES DEL PROYECTO  
Prof. LUIS SEBASTIÁN MENDOZA CASTELLANOS  
Prof. OMAR ALBERTO AVILA ROJAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA EN ENERGÍA  
BUCARAMANGA

2022

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	2
1. MARCO REFERENCIAL .....	3
1.1. MARCO CONCEPTUAL.....	3
1.1.1. POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO.....	3
1.2. MARCO NORMATIVO Y ASPECTO DE GOBERNANZA DE LA BIOECONOMÍA ..	8
1.3. ANTECEDENTES .....	9
2. OBJETIVOS .....	10
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. DESARROLLO METODOLÓGICO .....	11
3.1. PROCEDIMIENTOS Y METODOS EXPERIMENTALES COMUNES A TODA LA FASE EXPERIMENTAL.....	11
3.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL INOCULO .....	11
3.1.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE SUBSTRATO (GLICEROL).12	
3.2. TEST DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM).....	13
3.2.1. ENSAYO EXPLORATORIO.....	13
3.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL PBM CUANTITATIVO .....	15
3.3. CARACTERIZACIÓN DEL BIORREACTOR BIOFLO 110.....	17
3.3.1. VERIFICACION DE FUNCIONALIDAD Y FACILIDADES OPERATIVAS .....	17
3.3.2. VERIFICACIÓN DE MEDICIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES BIORREACTOR BIOFLO 110 .....	19
3.4. VALIDACIÓN DEL MEJOR EXPERIMENTO EN REACTOR BIOFLO 110 .....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. ENSAYO EXPLORATORIO.....	23
4.2. MONTAJE EXPERIMENTAL BPM CUANTITATIVO .....	24
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL REACTOR.27	
4.4. VALIDACIÓN EN EL REACTOR BIOFLO 110 Y EN EL REACTOR IN VITRO <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	31
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
ANEXOS .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Montaje PBM exploratorio.....	13
<b>Figura 2.</b> Montaje BPM cuantitativo. ....	15
<b>Figura 3.</b> Variación de la fracción de CO <sub>2</sub> en digestores anaerobios a diferentes en función del nivel de pH (van Lier, 2014).....	17
<b>Figura 4.</b> Principales partes y componentes del biorreactor BioFlo 110 .....	18
<b>Figura 5.</b> Componentes de la tapa del biorreactor .....	19
<b>Figura 6.</b> Medición de velocidad del eje del motor mecánico .....	20
<b>Figura 7.</b> Medición de temperatura interna del bioreactor.....	20
<b>Figura 8.</b> Validación del mejor experimento .....	21
<b>Figura 9.</b> Manifestación de actividad en los reactores .....	23
<b>Figura 10.</b> Remoción de DQO en los reactores 1,2,3 del test de PBM.....	24
<b>Figura 11.</b> Producción acumulada de biogás en función de la remoción de DQO en el reactor 3....	25
<b>Figura 12.</b> Producción acumulada de biogás en los reactores 5 y 6.....	26
<b>Figura 13.</b> Velocidad de agitación de las aspas .....	28
<b>Figura 14.</b> Medición de temperatura en el interior del biorreactor. ....	29
<b>Figura 15.</b> Acumulación diaria de biogás en el reactor in vitro .....	30
<b>Figura 16 .</b> Incubadora de baño de agua con agitación disponible en el laboratorio $\epsilon$ -bio.....	32

## LISTA DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Actos y normas referentes a la bioeconomía.....	8
<b>Tabla 2.</b> Parámetros fisicoquímicos del inóculo .....	11
<b>Tabla 3.</b> Variables y niveles propuestos en el diseño experimental para PBM.....	14
<b>Tabla 4.</b> Diseño experimental para ajuste inicial de la técnica de PBM .....	14
<b>Tabla 5.</b> Diseño experimental para ajuste preliminar de la técnica de PBM.....	16
<b>Tabla 6.</b> Observación de actividad ensayo exploratorio. ....	23
<b>Tabla 7.</b> Cálculo de la producción máxima teórica de metano .....	26
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de remoción de DQO en el biorreactor Bioflo 110 y en el reactor in vitro. ....	30

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Datos reportados por el laboratorio SIAMA .....	40
<b>Anexo B.</b> Procedimiento llevado a cabo para la preparación de la solución de referencia .....	41
<b>Anexo C.</b> Procedimiento para la implementación y materiales usados en el ensayo exploratorio....	42
<b>Anexo D.</b> Procedimiento llevado a cabo para establecer los volúmenes de glicerol y lodo agregado en cada reactor del ensayo exploratorio:.....	43
<b>Anexo E.</b> Procedimiento para la implementación y materiales usados en el ensayo la validación del mejor experimento .....	46

**Anexo F.** Procedimiento llevado a cabo para establecer los volúmenes de glicerol y lodo agregado en cada reactor en la validación del mejor experimento.....47

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad implementar un montaje de referencia para la evaluación a escala de laboratorio del potencial bioquímico de metano (PBM) de una muestra de lodo anaerobio para la degradación de contaminantes provenientes de la agroindustria colombiana, utilizando como sustrato modelo de fácil degradación, el glicerol.

Los ensayos de biodegradación a pequeña escala con el propósito de establecer una técnica confiable de PBM, se realizaron en biorreactores de 300 mL y las variables de control fueron la influencia de la relación sustrato/inoculo (S/I) y la concentración del sustrato, en tanto que las variables de respuesta fueron la generación de biogás, la remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) y el pH. De un diseño experimental exploratorio (-1, 0, 1) que comprometía 9 test, se logró acotar el intervalo de trabajo para la relación, que llevó a que finalmente en un ensayo final con tres réplicas con relación S/I de 3.2, se pudiera constatar que en condiciones de biodegradación anaerobia del glicerol, sin ajuste de pH ni de nutrientes, el consumo de DQO se encuentre alrededor del 30% lo que es coherente con las ecuaciones teóricas de producción de biogás, pero que es posible que luego del quinto día de experimentación, la actividad metanogénica se detenga como resultado de la rápida acidificación del medio y que el biogás resultante sea predominante en CO<sub>2</sub> y no en CH<sub>4</sub>.

En una segunda etapa de la experimentación se logró demostrar que el experimento es replicable en biorreactores de mayor escala (Bioflo 110) con producciones similares de biogás y remociones de DQO; los cuales fueron intervenidos para establecer los rangos operacionales de las variables agitación y temperatura de calentamiento. Un experimento realizado a esta escala a 37 °C y agitación mecánica constante de 270 rpm, logró la mayor remoción de DQO en todo el estudio (41%)

## ABSTRACT

The purpose of this work was to implement a reference set-up for the laboratory-scale evaluation of the biochemical methane potential (BMP) of an anaerobic sludge sample for the degradation of pollutants from the Colombian agroindustry, using glycerol as an easily degradable model substrate.

The small-scale biodegradation tests with the purpose of establishing a reliable PBM technique were carried out in 300 mL bioreactors and the control variables were the influence of the substrate/inoculum (S/I) ratio and the substrate concentration, while the response variables were biogas generation, chemical oxygen demand (COD) removal and pH. From an exploratory experimental design (-1, 0, 1) involving 9 tests, it was possible to narrow the working range for the ratio, which finally led to a final test with three replicates with an S/I ratio of 3.2, it was possible to verify that in conditions of anaerobic biodegradation of glycerol, without adjustment of pH or nutrients, the COD consumption is around 30%, which is consistent with the theoretical equations of biogas production, but it is possible that after the fifth day of experimentation, the methanogenic activity stops as a result of the rapid acidification of the medium and that the resulting biogas is predominantly CO<sub>2</sub> and not CH<sub>4</sub>.

In a second stage of the experiment, it was possible to demonstrate that the experiment is replicable in larger scale bioreactors (Bioflo 110) with similar biogas production and COD removals, which were intervened to establish the operational ranges of the agitation and heating temperature variables. An experiment carried out at this scale at 37 °C and constant mechanical agitation of 270 rpm, achieved the highest COD removal in the whole study (41%).

## INTRODUCCIÓN

La agroindustria genera residuos sólidos y líquidos los cuales pueden tener una alta carga orgánica con una biodegradabilidad variable. Estos residuos pueden ser aprovechados en diferentes procesos ya sean biológicos o termoquímicos, los cuales generan a su vez otro tipo de residuos que pueden ser de gran valor al ser reintegrados en procesos energéticos (Aguiar et al., 2021).

La digestión anaerobia como alternativa tecnológica a la gestión y tratamiento de residuos sólidos y líquidos de la agroindustria, ofrece la posibilidad de darle valor a estos residuos, sea recuperando nutrientes en el digestato o energía en la forma de biogás, e incluso biohidrógeno, según se viene demostrando con algunas nuevas tecnologías de base anaerobia en proceso de desarrollo y que podrían llegar a controlar esta ruta metabólica.

Entre los factores que impulsaron el resurgimiento de la digestión anaerobia y llevarla a la madurez tecnológica, se encuentran la crisis energética de los años 70 y la aparición de los sistemas de biomasa inmovilizada (Mata-Alvarez, 2015; Mata-Alvarez et al., 2000). La digestión anaerobia es la tecnología por excelencia para tratar residuos orgánicos con una alta cantidad de humedad sin ningún tratamiento previo, pero también ha sido muy utilizada en el tratamiento de residuos líquidos, tanto domésticos como industriales (Macherzyński, 2018; Mata-Alvarez et al., 2014).

El biogás, principal derivado de los procesos anaerobios, es una fuente combustible que está compuesta principalmente de metano y de dióxido de carbono, que puede ser utilizada tanto para la producción de energía eléctrica como para la producción de energía térmica (Lombardi & Francini, 2020; Mao et al., 2015). Adicionalmente, el remanente del proceso (digestato) puede ser utilizado como fertilizante debido a su alto contenido en nitrógeno (Tambone et al., 2009).

La digestión anaerobia se desarrolla en un proceso de cuatro etapas, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Deublein & Steinhauser, 2008); en la hidrólisis se convierten en monómeros solubles las sustancias orgánicas complejas, y en muchos casos es la etapa que requiere más tiempo (Merlin Christy et al., 2014; C. Zhang et al., 2014). En la acidogénesis, los monómeros solubles se transforman principalmente en ácidos grasos volátiles de cadena corta y alcoholes, mientras que en la acetogénesis, estos productos intermedios se descomponen en ácido acético e hidrógeno, que finalmente, se transformarán en metano en la etapa de metanogénesis (Ren et al., 2018).

En este contexto el trabajo se ocupa de implementar un montaje para la evaluación del potencial bioquímico de metano (PBM) en la degradación de contaminantes provenientes de la agroindustria colombiana, particularmente efluentes que pueden contener tanto contaminantes de fácil como de difícil degradación. Para esto, se realizó la respectiva implementación de un test confiable de PBM tomando como referencia el glicerol como contaminante típico en los efluentes de la industria de la palma de aceite y el biodiesel, seguido de una caracterización de un reactor BioFlo 110, disponible en el centro de



investigación  $\epsilon$ -BiO de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB), a ser utilizado en las investigaciones en desarrollo y futuras en esta área temática.

## JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales desafíos de la bioeconomía a nivel mundial, es el desarrollo de biorrefinerías a partir de la gestión de desechos orgánicos (sólidos y líquidos), pero sus plataformas tecnológicas aún son muy básicas y carecen todavía de suficiente integración a nivel de los procesos fisicoquímicos, bioquímicos y energéticos, que estas involucran. En efecto, la biorrefinería es vista como el ápice de la visión de economía circular en la gestión de los residuos de origen “bio” (Carus & Dammer, 2018; Venkata Mohan et al., 2016).

Uno de los principales cuellos de botella para el desarrollo de biorrefinerías funcionales y viables, se encuentra en la integración energética de los sistemas de tratamiento de efluentes de la agroindustria, como procesos proveedores de energía y de materias primas para dichas biorrefinerías (Cardona Alzate et al., 2020; Garcia-Nunez et al., 2016).

En el centro de investigación  $\epsilon$ -BiO de la UNAB se ha iniciado una investigación doctoral que justamente aborda esta problemática y busca la producción de biogases (metano/bioH<sub>2</sub>), a partir de moléculas contaminantes que se espera sean de recurrente presencia en los efluentes de los procesos de la agroindustria colombiana; en particular, glicerol, principal subproducto de la industria del biodiesel y furfural, una molécula cuya presencia es segura en los derivados de la termoquímica de la pirólisis (Quispe et al., 2013).

En efecto, el aprovechamiento de estas moléculas residuales de estos procesos puede ser orientado a asegurar la autonomía energética de futuras biorrefinerías, especialmente en Colombia, por la disponibilidad de cadenas agroindustriales como la del aceite de palma, el cacao y el café, entre otras, que en la medida que se tecnifiquen van a dar origen a distintitos efluentes y residuos, aprovechables en estructuras de biorrefino.

Es así, que se considera pertinente que se lleve a cabo este proyecto de investigación exploratoria. como soporte de la investigación doctoral en mención, que busca desarrollar la técnica de determinación del PBM, para identificar parámetros relacionados con la producción de biogás, haciendo uso de glicerol como contaminante de referencia; asimismo, contribuiría en los objetivos de desarrollo sostenible 6, 7 y 12, buscando la protección del recurso hídrico, la producción de biogases (metano/bioH<sub>2</sub>) como fuente de energía limpia y la valorización de residuos como estrategia de circularidad, aprovechando moléculas que sean recurrentes en los efluentes de los procesos de la agroindustria colombiana como el glicerol y cuyo aprovechamiento pueda estar orientado a asegurar la autonomía energética de futuras biorrefinerías colombianas; evitando de esta forma la sobrecarga de los sistemas de tratamiento de efluentes, y evitando la generación externa de energía no sostenible para el funcionamiento de las biorrefinerías colombianas, mitigando así, el cambio climático.

## **1. MARCO REFERENCIAL**

### **1.1. MARCO CONCEPTUAL**

El fundamento del presente trabajo es la estandarización de un método de laboratorio para medir la actividad metanogénica (AME) o el potencial bioquímico de metano (PBM), en experimentos de pequeña escala bajo condiciones controladas de degradación anaerobia de la materia orgánica disponible en un efluente líquido; por consiguiente, la primera parte del marco conceptual se dedica a establecer la base conceptual de las técnicas disponibles para determinar la capacidad de degradación anaerobia sea por AME o PBM y como complemento, se desarrollan algunas definiciones de parámetros que intervienen en su determinación.

#### **1.1.1. POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO**

Para determinar la cantidad de metano producido de uno o varios substratos, se realiza una prueba de laboratorio la cual consiste en almacenar en un recipiente las muestras de aquellos substratos a evaluar junto a con un inóculo microbiano, generalmente proveniente de un reactor anaerobio ya operativo. Esta mezcla, se debe mantener bajo condiciones anaerobias durante un periodo de incubación, en el que se mide el volumen de biogás (metano + CO<sub>2</sub> + componentes menores), generado durante un tiempo de retención hidráulica definido, generalmente entre 3 y 20 días (Hansen et al., 2004).

Esta prueba determina la cantidad de metano generado por gramo de sólido suspendido volátil. Las mediciones del volumen de biogás producto del proceso se realizan diariamente y mediante una cromatografía de gases se valora la composición del gas producto. La eficiencia en los resultados de esta prueba varía según las condiciones en la cual se realice, como, por ejemplo, a valores bajos de pH tiende a producirse una acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles, mientras que, a valores de pH altos hay aumento de amoníaco libre; ambas condiciones llevando a la inactivación de la fase metanogénica de la anaerobiosis.

Otro aspecto importante es la temperatura, ya que si se mantienen temperaturas que oscilan en rangos termofílicos (> 45 °C), la descomposición de la materia se lleva a cabo en menor tiempo, no obstante, generalmente las pruebas se realizan bajo condiciones mesofílicas a temperaturas cercanas a los 35°C o menos, es decir, psicrófilicas. Adicionalmente, se destaca que las características del substrato e inóculo tales como tamaño de partícula o de los gránulos microbianos y su potencial solubilidad, están estrechamente relacionadas con la velocidad de degradación observada en los test (Lesteur et al., 2010).

La prueba de PBM presenta ciertas similitudes con respecto a la prueba de actividad metanogénica (AME), pero en sentido estricto no lo son, esto debido a que estas se realizan en condiciones controladas y comparten el mismo objetivo en común de cuantificar la

cantidad de metano que pueda generar la actividad bioquímica del sustrato, sin embargo, se destaca que generalmente se hace uso de aguas residuales como inóculo en las pruebas AME, mientras que, es importante decir que la prueba de PBM generalmente es usada para la evaluación y selección de residuos con potencial de aprovechamiento mediante la digestión anaerobia (Sperling, 2005). Adicionalmente, los resultados de la prueba PBM son expresados en la cantidad de metano generado por gramo de sólido volátil, mientras que, los resultados de la prueba AME son expresados en la cantidad de metano generado por gramo de sólidos suspendidos volátiles. Para la implementación de esta prueba se debe tener en cuenta lo siguiente:

- **Reactor tipo batch**

Este tipo de reactor se trabaja con una carga inicial de la mezcla objeto de estudio (sustrato + inóculo) y no hay entrada ni salida de efluentes líquidos, salvo la evacuación del biogás producido. Este dispositivo es catalogado dentro del grupo de reactores individuales, también conocidos como reactores de flóculos suspendidos, crecimiento disperso o lodos. Asimismo, su constitución es básica y tiene un gran uso en aplicaciones ambientales, por lo que, al ser el reactor más simple dentro de dicha categoría es usado ampliamente en ámbitos investigativos, sin embargo, también es usado en pruebas de demanda biológica de oxígeno.

Los reactores tipo batch se cargan con los sustratos previamente tratados para mantenerlos en suspensión hasta completar el proceso anaeróbico o aeróbico según sea el caso. La carga orgánica dentro de estos reactores puede ser agitada dentro del reactor para mantener una consistencia homogénea. Al terminar el proceso de digestión anaerobia, se eliminan los contenidos dentro del reactor para ser cargado nuevamente con el sustrato para empezar de nuevo con el proceso (Rittmann & McCarty, n.d.).

- **Relación C/N**

La relación carbono nitrógeno es importante partiendo del hecho de que los dos elementos son fundamentales para el desarrollo de una estructura celular. Por una parte, el carbono brinda la energía, mientras que, el nitrógeno es el encargado de sintetizar las proteínas y los ácidos nucleicos. Adicionalmente, son estos dos elementos los que sirven como indicativo de la cantidad de nutrientes que hay en el proceso de digestión anaerobia (Jain et al., 2015; S. Kumar, 2011; Y. Li et al., 2011; Mao et al., 2015). Se remarca que, una escasez de carbono cohibe el crecimiento de los organismos y esto a su vez conlleva a una acumulación de nitrógeno amoniacal en el proceso (Y. Li et al., 2011; Parkin & Owen, 1986). Es importante decir que, para la digestión anaerobia se considera una relación óptima de carbono y nitrógeno entre 25 a 35 (D. Li et al., 2015; Panichnumsin et al., 2010).

## - **Acidez**

Dentro de los parámetros de la digestión anaerobia que tiene un vínculo estrecho con el control de la toxicidad y por ende de la inhibición de los microorganismos es el pH (Kainthola et al., 2019). Por ejemplo, un aumento excesivo de ácidos grasos volátiles se debe principalmente a una variación por debajo de un valor de cinco de este parámetro, afectando significativamente la producción de biogás (Atasoy et al., 2018; Xu et al., 2013).

El rango de pH ideal para obtener la mayor tasa de producción de biogás está entre 6,5 y 7,2. (Appels et al., 2008), sin embargo, es importante tener en cuenta que el valor óptimo de pH puede variar dependiendo del substrato usado en el proceso anaerobio (Dahiya et al., 2015), como es el caso de los lodos de depuradoras que obtienen el máximo rendimiento cuando operan en rangos entre 9 – 11 (Zhao et al., 2018).

Cabe aclarar que en cada etapa de degradación del proceso anaerobio los microorganismos trabajan óptimamente a diferentes rangos de pH, como por ejemplo en la etapa hidrolisis el pH óptimo es de 6 (Wang et al., 2014), los microorganismos metanogénicos prefieren un pH neutro alrededor de 7 (Kallistova et al., 2014) y en cuanto a los microorganismos acidogénicos el valor óptimo para el pH es de 6,5 (Kwietniewska & Tys, 2014).

## - **Alcalinidad**

En la digestión anaerobia la alcalinidad es importante puesto que esta nos indica la capacidad que tiene una solución acuosa para neutralizar la acidez. Por otra parte, es fundamental decir que, los substratos con alta alcalinidad pueden mantener un pH neutro, lo que consecuentemente, se traduciría en un mayor consumo de ácidos grasos volátiles evitando así la inhibición por un aumento de la tasa de producción de estos.

El contraste de lo mencionado anteriormente se ve en substratos con baja relación de carbono/nitrógeno y con alta biodegradabilidad (como por ejemplo los residuos de comida) puesto que estos conducen a una alta acidificación del proceso y a un aumento de bacterias productoras de ácido que inhiben la actividad de los microorganismos metanógenos. En ese orden de ideas, para neutralizar la acidez del sistema se pueden agregar productos químicos tales como  $NaHCO_3$ ,  $CaO$  y  $Na_2CO_3$  (R. Li et al., 2009; X. Li et al., 2009; Llabrés-Luengo & Mata-Alvarez, 1988; Stichting Toegepast Onderzoek Reiniging Afvalwater (STORA), 1985; Turovskiy & Mathai, 2006; Yu et al., 2018; Yuan & Zhu, 2016).

## - **Temperatura**

Uno de los parámetros más relevantes durante el proceso de digestión anaerobia dentro del reactor es la temperatura debido a que influyen de manera directa en el control de la

estabilidad microbiológica del proceso y, por ende, la eficiencia y su rendimiento tienen una correlación muy estrecha con el parámetro en mención (Westerholm et al., 2018). Adicionalmente, es importante decir que mediante una serie de diversos escenarios en un estudio (A. Kumar & Samadder, 2020) se estableció que la calidad del biogás generado y las actividades relacionadas con la degradación anaerobia están ligadas con la temperatura de operación del proceso (Sánchez et al., 2001).

Se remarca que, si la digestión anaerobia se da a una temperatura entre 30°C y 40°C se considera que aquel proceso se está dando bajo condiciones mesófilas; si la temperatura supera los 50°C, las condiciones de operación se consideran termófilas, mientras que, si el proceso se lleva a cabo bajo temperaturas menores a los 20°C, se considera que las condiciones de operación del proceso son psicrófilas (Jain et al., 2015).

#### - **Inhibidores**

La composición de los sustratos e inóculos usados en el proceso de digestión anaerobia pueden contener sustancias que causen inhibición en el proceso de generación de biogás como lo son el amoníaco, el sulfato, los metales pesados y compuestos orgánicos; las altas concentraciones de las sustancias mencionadas anteriormente son las principales causas de las afectaciones en los digestores anaerobios dando como resultado una baja concentración de metano en el gas producto de la digestión anaerobia (Chen et al., 2008a).

#### - **Nutrientes menores**

Los nutrientes son muy importantes como aceleradores económicos y ecológicos durante el proceso de la digestión anaerobia puesto que apoyan a las reacciones químicas y a las actividades enzimáticas.

Algunos de estos nutrientes valiosos durante todo el proceso son los siguientes:

- Hierro: Se ha identificado como la sustancia más eficaz para estabilizar sustratos altamente biodegradables como los residuos de alimentos (Bentley & Chasteen G, 2003; Chen et al., 2008b; Demirel & Scherer, 2011; L. Zhang et al., 2011)
- Níquel: Aumenta la actividad de los microorganismos metanógenos y consecuentemente enriquece el contenido de metano en el biogás (Reda et al., 2008)
- Sales de calcio y magnesio: Aumenta la actividad de los microorganismos metanógenos y evita la formación de espuma (Reda et al., 2008)
- Tungsteno: Ayuda a la degradación de propionatos (Reda et al., 2008)
- Selenio y Cobalto: Estabiliza sustratos altamente biodegradables tales como los residuos de alimentos y ayuda a operar ante altas concentraciones de amoníaco (Facchin et al., 2013).

### - Mezcla

La mezcla permite una mayor homogeneidad del pH, una mejor interacción entre los microorganismos, una mayor transferencia de calor, una mayor reducción del tamaño de las partículas y una liberación del biogás generado. Para la mezcla se suelen utilizar elementos tales como filtros de flujo ascendente, bombas, mezcladores mecánicos, etc. (Karim et al., 2005; Meynell, 1976).

### - Substrato

La calidad del biogás producto de la digestión anaerobia depende de diversos factores, sin embargo, las propiedades bioquímicas presentes en los substratos y la velocidad de degradación de los microorganismos son los que tienen mayor influencia en el proceso (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991; Vavilin et al., 2008). La actividad enzimática depende en gran medida de las propiedades bioquímicas que componen el substrato como el volumen de masa que se disponga y la biodisponibilidad de este (Jash & Ghosh, 1996; Vavilin et al., 2001). Diversos estudios han llegado a comprobar que los residuos que contienen altos niveles de lípidos contribuyen al aumento de la producción de metano (Cirne et al., 2007). Es importante mencionar que los problemas de inhibición, la calidad del biogás producto del proceso y el equilibrio de los nutrientes pueden ser solucionados mediante la codigestión anaerobia, ya que, si de manera simultánea se disponen de dos o más substratos en este proceso, la relación carbono nitrógeno mejora y por ende los problemas mencionados anteriormente tienden a solucionarse (Nguyen et al., 2021). En consecuencia, los substratos usados en los procesos de codigestión anaerobia mejoran la composición de la carga orgánica aumentando de manera significativamente la eficiencia durante el proceso (Rodríguez-Chiang et al., 2016; Xie et al., 2017).

### - Inóculo

La optimización en los procesos de digestión anaerobia está relacionada con la adición de un agente inoculador debido a que la rápida producción de metano se ve afectada por la adición de microorganismos degradadores que provienen de un proceso anaerobio (Nakasima-López et al., 2017). Generalmente, se suelen usar inóculos provenientes de reactores UASB, reactores de lodos o reactores de biogás que no conlleven partículas sólidas de gran tamaño. Es importante decir que la muestra que es utilizada como inóculo no debe ser lavada con algún fluido ya que podrían eliminarse materiales y compuestos orgánicos propios de este (Angeladiki et al., 2007).

- **Relación sustrato/inoculo**

La relación entre el sustrato e inóculo es uno de los parámetros más relevantes de la digestión anaerobia puesto que de esta dependerá estrechamente la cantidad de microorganismos degradadores presentes en el proceso (Angeladiki et al., 2007). Es importante destacar que cada sustrato tiene una óptima relación con respecto al inóculo a usar (Lesteur et al., 2010), como por ejemplo, los sustratos que son menos degradables requieren una relación menor a 1, a diferencia de aquellos sustratos que son fácilmente degradables que requieren una relación mayor a 4 debido a que estos conllevan a una gran acumulación de ácidos grasos volátiles (Caillet et al., 2019).

## 1.2. MARCO NORMATIVO Y ASPECTO DE GOBERNANZA DE LA BIOECONOMÍA

**Tabla 1.** Actos y normas referentes a la bioeconomía.

ACTO NORMATIVO	ASUNTO	DESCRIPCIÓN
<b>Ley 1715 del 2014</b>	Por la cual se regula la integración de las energías renovables no convencionales al Sistema Energético Nacional	Integración de las fuentes de energía renovables y no convencionales al sistema energético nacional, incentivando el desarrollo de estas con el fin de atender las necesidades energéticas.
<b>Decreto 1287 del 2014</b>	Por el cual se establecen criterios para el uso de los biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.	La digestión anaerobia y aerobia son propuestas como alternativas para reducir el contenido de sólidos en las plantas depuradoras.
<b>Agenda 2030</b>	Por el cual se establecen 17 objetivos de desarrollo sostenible para las personas y para el planeta	Dentro del ODS No 6, se establecen compromisos de disminución de efluentes con alta carga contaminante y uso eficiente de los recursos hídricos. En el ODS No 11, el tratamiento y gestión de los desechos municipales y de otro tipo, hacen parte de las metas propuestas para contribuir con el objetivo referente a ciudades y comunidades sostenibles

ACTO NORMATIVO	ASUNTO	DESCRIPCIÓN
<b>Misión de sabios 2019</b>	Por el cual se establece rutas para construcción e implementación de la política pública de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación en biotecnología, bioeconomía y medio ambiente	Dentro de las áreas temáticas destacadas para el impulso de la ciencia y la tecnología e innovación, se resalta la energía sostenible, la biotecnología del medio ambiente y bioeconomía, impulsado hacia los objetivos de desarrollo sostenible integrando estrategias de desarrollo.
<b>Resolución 0792 del 2021</b>	Por la cual se ordena la apertura de la convocatoria para el apoyo a programas y proyectos de I+D+I que contribuyan a resolver los desafíos establecidos en la misión “bioeconomía para una Colombia potencia viva y diversa hacia una sociedad impulsada por el conocimiento”.	Se establece un apoyo de recursos financieros a programas que resuelvan desafíos que impulsen la misión de bioeconomía del país, especialmente a aquellos enfocados en el desarrollar, validar o comercializar productos y/o procesos que vinculen el aprovechamiento y la gestión eficiente de biomasa.

### 1.3. ANTECEDENTES

Algunos trabajos como (Abdul Aziz et al., 2019) realizan un estudio que se centra en determinar el potencial bioquímico de metano (PBM) de seis tipos de substratos añadiendo como catalizador dos tipos de inóculos, el bokashi tradicional y un inóculo industrial proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. La evaluación de las características fisicoquímicas de cada uno de los substratos se llevó a cabo mediante análisis de laboratorio. En este estudio se determinó que aquellos substratos a los cuales se le añadió Bokahi tradicional no generaron biogás, mientras que, aquellos substratos a los cuales se les añadió el inóculo industrial demostraron sí mostraron una producción de biogás según las cargas orgánicas contenidas en los substratos.

De igual manera, hay estudios que analizan el potencial de biometano de diferentes tipos de substratos, ya sea residuos de la agroindustria o residuos agrícolas, por ejemplo, (Suhartini et al., 2021) realizaron una prueba de PBM haciendo uso de cinco residuos provenientes de cultivos agrícolas entre ellos los residuos de la agroindustria de la palma de aceite. De este estudio se puede destacar que cada reactor manejó un volumen de trabajo de 40 ml y una temperatura de 37 °C.



Otros autores como (Wongfaed et al., 2020) investigaron la producción de metano y el comportamiento microbiano de los residuos de la agroindustria de la palma de aceite. Este estudio buscaba evaluar la influencia del glicerol como sustrato mediante una prueba de PBM. Esta prueba tuvo una relación sustrato/inoculo (S/I) de 2:1 y se realizó bajo condiciones mesófilas.

Por otra parte, (Cárdenas Cleves et al., 2016), realizaron algunas consideraciones de la prueba de PBM en donde se identificó la necesidad de estandarizar esta prueba para facilitar la comparación de resultados con otras investigaciones y su reproducibilidad en otros laboratorios.

Asimismo, en cuanto a la estandarización de estos test en (Angelidaki et al., 2009) se pudo encontrar algunas pautas para la realización de estos con el fin de unificar las unidades y técnicas en posteriores trabajos; de este estudio se destaca que los resultados de PBM siempre deben ir acompañados de una descripción clara del inóculo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GENERAL**

Implementar un montaje de referencia para la evaluación a escala de laboratorio del potencial bioquímico de metano de muestras lodos anaerobios para la degradación de contaminantes provenientes de la agroindustria colombiana

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar ensayos de biodegradación a pequeña escala para determinar el potencial bioquímico del metano de un residuo orgánico.
- Caracterizar el biorreactor disponible en el centro  $\varepsilon$ -bio para determinar las condiciones de operación en estado pseudoestable.
- Validar en un biorreactor batch el diseño experimental a escala de laboratorio.

### 3. DESARROLLO METODOLÓGICO

La presente sección se organiza, considerando que hay procedimientos y métodos comunes para toda la experimentación, a saber: (i) la caracterización del inóculo microbiano y (ii) la preparación de solución madre de sustrato (glicerol); los cuales son descritos en primer término. Paso seguido se procede a describir el componente metodológico relativo al montaje experimental para las mediciones de potencial metanogénico específico en la degradación de glicerol (objetivo 1) y luego el componente relativo a la validación a una escala de reactor de banco (objetivos 2 y 3).

#### 3.1. PROCEDIMIENTOS Y METODOS EXPERIMENTALES COMUNES A TODA LA FASE EXPERIMENTAL

##### 3.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL INOCULO

El inóculo microbiano fue tomado de las lagunas facultativas utilizadas como sistema de tratamiento de los efluentes de la extractora de aceite de palma de la empresa “Palmas Monterrey”, más precisamente de la denominada piscina de oxidación número dos. La muestra de lodo fue tomada de forma compuesta hasta completar 4 litros del fondo de la laguna, para buscar el lodo con mayor característica anaerobia, sobre las 10:24 am del día 26 de agosto del 2022. El lodo fue caracterizado a nivel de los parámetros mostrados en la tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros fisicoquímicos del inóculo

Variable	Unidad	Valor	Método	Laboratorio
Sólidos Disueltos	mg/L	5967	2540C – SM*	Biología y Ambiente - UNAB
Sólidos Suspendidos	mg/L	30900	2540D - SM	Biología y Ambiente - UNAB
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	mg/L	23070	2540E – SM	Biología y Ambiente - UNAB
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg O <sub>2</sub> /L	40740	5220C-SM	SIAMA**
Nitrógeno Total	mg N/L	2600	Titulometría	SIAMA**

\* Standard Methods Manual 2540 solids

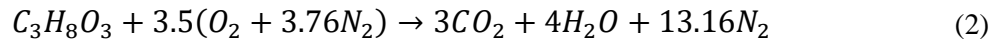
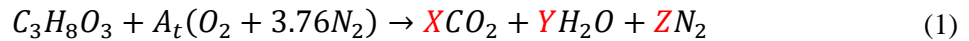
\*\* Datos reportados por el laboratorio externo en referencia en Anexo A

De manera particular el parámetro SSV ofrece una idea aproximada de la abundancia de microorganismos en la fuente del inóculo y cuanto aportan a la “DQO particular”<sup>1</sup>, es decir la no soluble, para luego tener garantía de que en los experimentos de determinación de PBM, el seguimiento se realiza exclusivamente sobre DQO soluble<sup>2</sup> que sería aportada mayoritariamente por el sustrato, en este caso el glicerol. El parámetro nitrógeno total, se determina para establecer que existe alguna presencia de este nutriente disponible para las pruebas de PBM, que sustente la síntesis celular en condiciones de limitada disponibilidad de nitrógeno.

### 3.1.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE SUBSTRATO (GLICEROL)

Para tal fin se preparó una solución objetivo de 24000 mgDQO/L aportados única y exclusivamente por el sustrato a degradar, es decir el glicerol; cuya fuente fue de tipo comercial distribuida por la empresa Market Químicos, con una concentración de 99,5% y una densidad de 1,26 g/cm<sup>3</sup>. Soluciones de otras concentraciones que fueron utilizadas en etapas subsiguientes de la experimentación, se obtuvieron por dilución de esta solución.

La determinación de la DQO equivalente del sustrato se realiza a partir de la reacción de oxidación total; asumiendo la cantidad estequiométrica de oxígeno consumido como la DQO, así:



$$3.5 \frac{mmolO_2}{mmolGly} * 32 \frac{mgDQO}{mmolO_2} * \frac{1 mmolGly}{92 mgGly} = 1,217 \frac{mgDQO}{mgGly} \quad (3)$$

En el Anexo B, se muestra el paso a paso para la preparación de la solución de referencia.

---

<sup>1</sup> DQO Particular: representa la cantidad de materia orgánica compleja con un cierto tamaño molecular o células o sus residuos aportados por microorganismos y que se considera no es capaz de pasar un filtro Whatman de poro inferior a 1.2 micras (Sánchez Ramírez et al., 2017)

<sup>2</sup> DQO soluble: representa la cantidad de materia orgánica verdaderamente soluble presente en los efluentes y que debe pasar un filtro Whatman de poro inferior a 1.2 micras (Jimenez et al., 2005)

### 3.2.TEST DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

#### 3.2.1. ENSAYO EXPLORATORIO

Este se hizo para validar que el inóculo seleccionado tenía actividad bacteriana expresada en burbujeo de biogás al contacto con una solución de glicerol. Se realizaron nueve montajes de biodegradación para una relación arbitraria pero sugerida de inóculo/substrato de 0.25 (v/v) según literatura (SANGSRI et al., 2021), aportados por 60 ml de agua lodo previa dilución en agua destilada y 240 ml de solución de glicerol, para completar 300 ml.

El número de experimentos exploratorios montados se hizo según el montaje y diseño experimental descritos a continuación:

- **MONTAJE EXPERIMENTAL PARA EVALUACIÓN EXPLORATORIA DE ACTIVIDAD ANAEROBIA**

El montaje corresponde a biorreactores de plástico específicamente elaborados para pruebas biológicas fabricados por la empresa Biolife, cada uno de estos reactores fue dotado con una manguera de evacuación de biogás y herméticamente sellados para asegurar la ausencia de fugas o infiltraciones; el biogás o la evidencia de su producción se realiza por abundancia de burbujeo, pero sin cuantificación del volumen producido, en un tiempo de 11 días, al cabo del cual la observación de burbujeo es muy baja. El experimento se ilustra en la figura 1 y los detalles de su implementación y materiales utilizados se explican en el anexo C.

**Figura 1.** Montaje PBM exploratorio



## - DISEÑO EXPERIMENTAL

Para tener una prueba de PBM confiable, se partió de un diseño experimental a tres niveles, así, mínimo (-1), central (0) y superior (1), para las variables concentración de DQO en el reactor y la relación aparente sustrato/inóculo, medida como mgDQO/mgSSV, tomando la DQO en los biorreactores y la concentración de inóculo en la solución diluida en agua destilada previa adición al reactor.

Este diseño da lugar a nueve experimentos, tomando como límite la relación sustrato/inoculo sugerida por la literatura para sustratos fácilmente degradables como es el caso del presente estudio (Holliger et al., 2016)., que se recomienda sea de 2 a 4 o incluso superior. En el caso de la concentración de la DQO en los biorreactores, el rango de experimentación asumido se basa en rangos típicos bajos de DQO total en los efluentes de salida de plantas de biodiesel, que usualmente pueden ser 3 a 5 veces superiores al aporte de glicerol a esta DQO (Centeno, 2011; Coca, n.d.). La tabla 3 resume los niveles a evaluar para las dos variables objeto del diseño experimental.

**Tabla 3.** Variables y niveles propuestos en el diseño experimental para PBM

FACTORES DE DISEÑO	NIVELES		
	-1	0	1
CONCENTRACION DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO [mgDQO/L]	8000	16000	24000
RELACIÓN SUBSTRATO / INÓCULO APARENTE [mgDQO/L] / [mgSSV/L]	2	17	32

En la tabla que se encuentra a continuación, se muestran a detalle los nueve experimentos llevados a cabo. En el Anexo D se presenta el procedimiento para establecer los volúmenes de glicerol y lodo agregados en cada reactor.

**Tabla 4.** Diseño experimental para ajuste inicial de la técnica de PBM

REACTOR	SOLUCIONES DE INOCULACIÓN DE LODO		SOLUCIONES DE SUBSTRATO ANTES DE ADICIÓN AL REACTOR		CONCENTRACIÓN DE SUBSTRATO EN REACTOR DE 300 ML	RELACIÓN $S/I_{aparente}$
	VOLUMEN DE LODO CRUDO EN 60 ML	CONCENTRACIÓN mgSSV/L	VOLUMEN DE GLICEROL EN 240 ML	mgDQO/L	mgDQO/L	
1	10,4	4000	1,56	8000	8000	2
2	2,45	941,18	3,13	16000	16000	17
3	1,95	750	4,69	24000	24000	32

REACTOR	SOLUCIONES DE INOCULACIÓN DE LODO		SOLUCIONES DE SUBSTRATO ANTES DE ADICIÓN AL REACTOR		CONCENTRACIÓN DE SUBSTRATO EN REACTOR DE 300 ML	RELACIÓN S/I <sub>aparente</sub>
	VOLUMEN DE LODO CRUDO EN 60 ML	CONCENTRACIÓN mgSSV/L	VOLUMEN DE GLICEROL EN 240 ML	mgDQO/L	mgDQO/L	
4	1,22	470,59	1,56	8000	8000	17
5	0,65	250	1,56	8000	8000	32
6	20,81	8000	3,13	16000	16000	2
7	1,3	500	3,13	16000	16000	32
8	31,21	12000	4,69	24000	24000	2
9	3,67	1411,76	4,69	24000	24000	17

### 3.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL PBM CUANTITATIVO

En este montaje, se buscó asegurar la medición efectiva de la cantidad de biogás generado de seis reactores mediante un método de desplazamiento simple en columna de agua, como lo muestra la figura 2.

**Figura 2.** Montaje BPM cuantitativo.



Por una parte, se hizo el montaje de los tres reactores que mostraron una mayor actividad en el ensayo exploratorio, mientras que, el montaje de los reactores restantes se llevó a cabo para evaluar un punto medio entre 2 y 17, por triplicado en la relación S/I, pero más cercano a lo recomendado por la literatura de S/I = 4 (Holliger et al., 2016), con el fin de validar esta

recomendación experimental y de paso asegurar su reproducibilidad. Finalmente, estos tres reactores se ajustaron a una relación  $S/I = 3.2$ .

En este orden de ideas la tabla 5, muestra las condiciones experimentales de cada uno de los 6 test realizados.

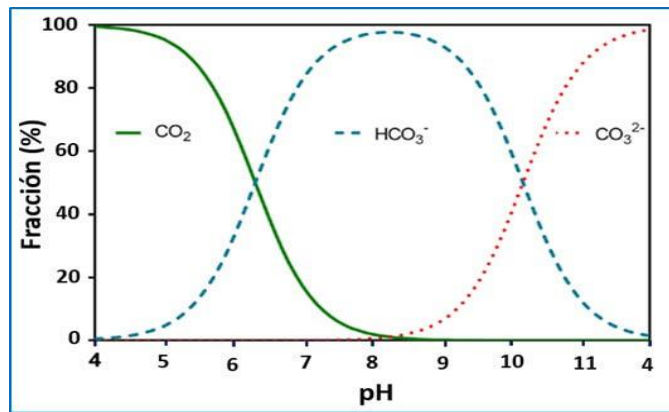
**Tabla 5.** Diseño experimental para ajuste preliminar de la técnica de PBM

REACTOR	SOLUCIONES DE INOCULACIÓN DE LODO		SOLUCIONES DE SUBSTRATO ANTES DE ADICIÓN AL REACTOR		CONCENTRACIÓN DE SUBSTRATO EN REACTOR DE 300 ML	RELACIÓN $S/I_{\text{aparente}}$
	VOLUMEN DE LODO CRUDO EN 60 ML	CONCENTRACIÓN mgSSV/L	VOLUMEN DE GLICEROL EN 240 ML	mgDQO/L	mgDQO/L	
1	10,4	4000	1,56	8000	8000	2
2	2,45	941,18	3,13	16000	16000	17
3	31,21	12000	4,69	24000	24000	2
4	19,51	7500	4,69	24000	24000	3,2
5	13	5000	3,13	16000	16000	
6	6,5	2500	1,56	8000	8000	

Este ensayo fue seguido durante 3 semanas mediante las siguientes técnicas de medición:

- Producción de biogás: por desplazamiento de columna de líquido medido a diario entre semana.
- DQO: medida al inicio del experimento y al final mismo, mediante la técnica de DQO soluble, es decir filtrando el medio final disponible en el reactor para eliminar la DQO particular aportado por los microorganismos y asegurarse que el valor de la DQO medido corresponde mayoritariamente al glicerol remanente en los reactores.
- pH medido los días 0 (inicio), 5, 10 y 15 para los experimentos 1, 2 y 3, mientras que, en los días 0 (inicio) y 15 para los experimentos 4, 5 y 6.
- Valoración teórica de la concentración de metano, se hizo utilizando la figura 3, mostrada a continuación:

**Figura 3.** Variación de la fracción de CO<sub>2</sub> en digestores anaerobios a diferentes en función del nivel de pH (van Lier, 2014)



### 3.3. CARACTERIZACIÓN DEL BIORREACTOR BIOFLO 110

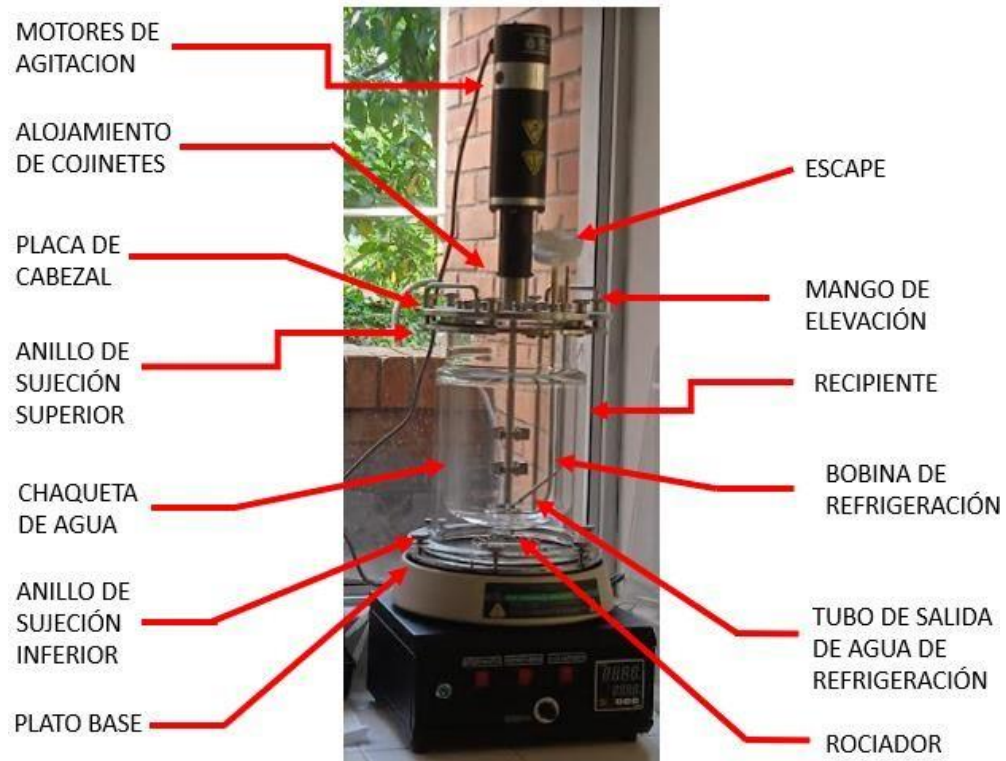
Una vez asegurada la disponibilidad de una técnica confiable de PBM para estudiar la degradación anaerobia del glicerol en fase acuosa, se procedió a apoyar el proceso de escalamiento de estos ensayos de pequeña escala en biorreactores batch de 300 ml a un sistema de una capacidad mucho mayor, disponible en el laboratorio del Centro  $\epsilon$ -BiO, denominado BioFlo 110 y que cuenta con facilidades adicionales para agitación mecánica y calentamiento, de la siguiente manera:

#### 3.3.1. VERIFICACION DE FUNCIONALIDAD Y FACILIDADES OPERATIVAS

Se pudo identificar que el biorreactor “BioFlo 110 Modular Benchtop Fermentor” de la compañía New Brunswick Scientific está constituido por las siguientes partes:

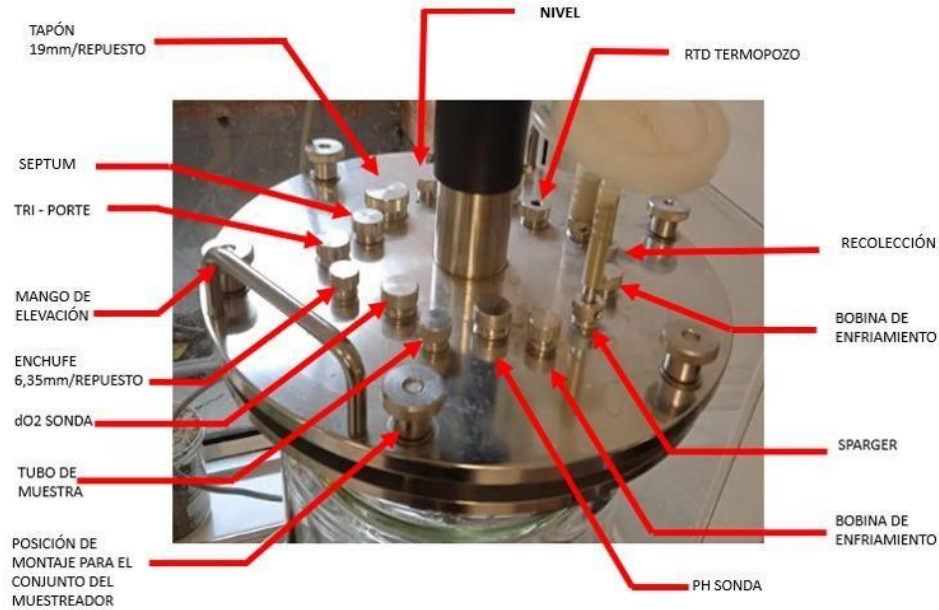


**Figura 4.** Principales partes y componentes del biorreactor BioFlo 110



Como se puede observar en la figura 4, este cuenta con una chaqueta de vidrio externa la cual cumple con la función de controlar la temperatura de la sección interna del medio de reacción; esta capa que se asienta sobre la placa de calentamiento cuenta con dos orificios para el ingreso y salida de agua a la capa de vidrio, si se quiere trabaja con flujo continuo de agua como refrigerante. Se remarca que, su volumen total es de 7.5 litros, pero su volumen de trabajo efectivo es de 4.5 litros. Por otra parte, en base a su manual, en la figura 5 se pueden identificar los puertos de inyección de materiales o para la instalación de medidores con los que cuenta este biorreactor en su tapa de sello superior.

**Figura 5.** Componentes de la tapa del biorreactor



Dado que este biorreactor no cuenta con un equipo de control propio de su fabricante de la siguiente manera se procedió a establecer los rangos reales de operación del agitador mecánico y la correlación de la temperatura externa de calentamiento vs. Temperatura interna del medio de reacción, en un sistema de no recambio de agua de enfriamiento (no entrada-no salida).

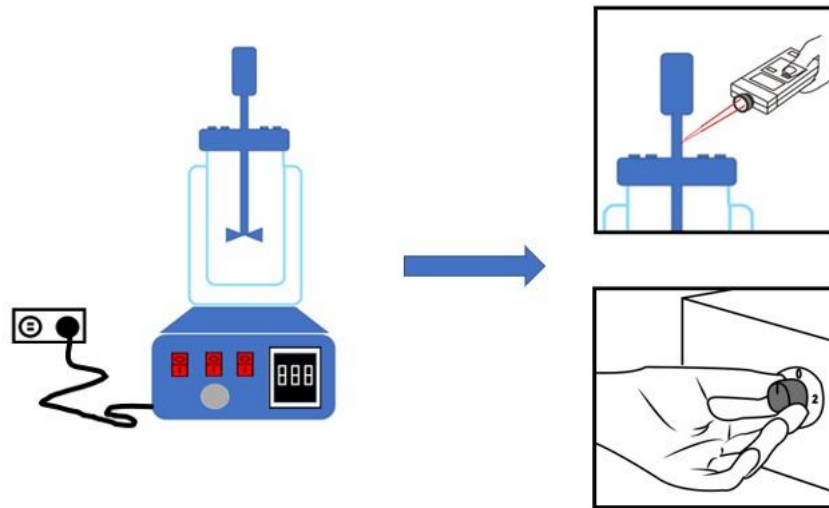
### 3.3.2. VERIFICACIÓN DE MEDICIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES BIORREACTOR BIOFLO 110

Las variables que se lograron evaluar en su forma de medición fueron el rango de agitación de las aspás (rpm) y la correlación de la temperatura externa de calentamiento vs. temperatura interna del medio de reacción.

- **VELOCIDAD DE AGITACIÓN DE LAS ASPAS:**

Se determinaron los diferentes niveles de agitación mecánica del reactor ubicando un tacómetro en la parte de alojamiento de los cojinetes del motor del biorreactor como se puede observar en la figura 6.

**Figura 6.** Medición de velocidad del eje del motor mecánico



- **CORRELACIÓN DE LA TEMPERATURA EXTERNA DE CALENTAMIENTO VS. TEMPERATURA INTERNA DEL MEDIO DE REACCIÓN**

Para la sección interna del medio de reacción del biorreactor se hicieron mediciones en diferentes espacios de tiempo para determinar qué temperatura habría si la temperatura externa de calentamiento primero fuera 50°C y luego de 70°C respectivamente. Como se puede observar en la figura 7 estas mediciones se hicieron con una termocupla tipo T y con un multímetro.

**Figura 7.** Medición de temperatura interna del bioreactor



### 3.4.VALIDACIÓN DEL MEJOR EXPERIMENTO EN REACTOR BIOFLO 110

Con el fin de evaluar la influencia de la temperatura y la agitación, el reactor con mayor generación de biogás y remoción de DQO de los ensayos previos fue escalado a 1 litro en el reactor BioFlo 110 a una temperatura de 37 °C sugerida según la literatura (Ghaleb et al., 2020) y a una agitación constante. Asimismo, se hizo otro montaje con los mismos volúmenes de lodo, glicerol y agua destilada en un reactor in vitro sin agitación y a una temperatura ambiente, pero con un volumen de 1 litro intermedio entre los utilizados en los test de PBM y el BioFlo 110

Los dos experimentos se ilustran en la figura 8 y los detalles de su implementación, como también, los materiales utilizados se explican en el anexo E. Por otra parte, es importante decir que el procedimiento para establecer los volúmenes de glicerol y lodo agregados en cada reactor se detallan en el anexo F.

**Figura 8.** Validación del mejor experimento

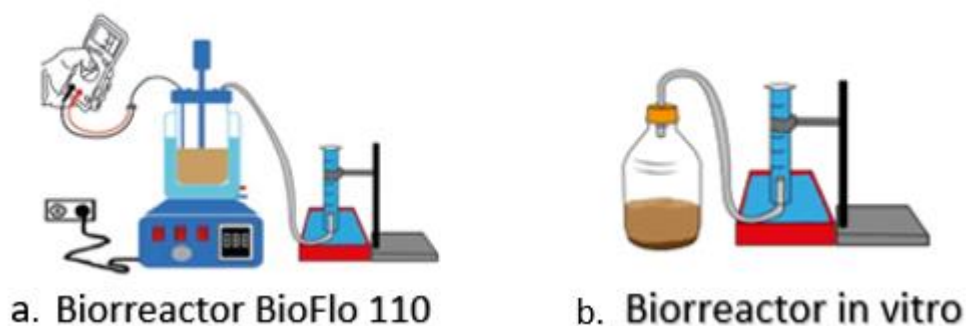


Figura 8a. Esquema del montaje en el biorreactor BioFlo 110. Figura 8b. Esquema del montaje en el biorreactor in vitro.

Este ensayo fue seguido durante cinco días cuantitativamente mediante las siguientes técnicas:

- Producción de biogás: por desplazamiento de columna de líquido medido a diario entre semana.
- DQO: medida al inicio del experimento y al final de este, mediante la técnica de DQO soluble, es decir filtrando el medio final disponible en el reactor para eliminar la DQO particular aportado por los microorganismos y asegurarse que el valor de la DQO medido corresponde mayoritariamente al glicerol remanente en los reactores.
- pH medido al inicio del experimento y al final de el mismo

## 4. RESULTADOS

### 4.1. RESUMEN

A continuación, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en relación a la actividad de burbujeo en los reactores, la medición del consumo de sustrato y la producción de biogás en diferentes reactores, la caracterización de las condiciones de operación del reactor BioFlo 110 y la validación de los ensayos de degradación del glicerol en este.

- En el ensayo exploratorio, se observó la actividad de burbujeo en cada reactor durante el experimento, y se encontró que los reactores 1, 2 y 8 presentaron actividad y formación de una capa superficial de lodo. Esta actividad se manifestó en la formación de burbujas y en la precipitación de una capa superficial de lodo en estos tres reactores.
- En el estudio del montaje experimental BPM cuantitativo, se muestran los resultados de la medición del consumo de sustrato (glicerol) medido como DQO y la producción de biogás en los reactores 1, 2, 3, 5 y 6. Los resultados indican una biodegradabilidad inicial rápida en todos los reactores, con una mayor pendiente en las curvas entre los días 0 y 5, seguido de una tendencia a la estabilización. Los reactores 1 y 2 presentaron problemas en la medición de la producción de biogás debido a la falta de agitación y la formación de una capa flotante. El reactor 3 mostró la producción acumulada más alta de biogás, pero solo fue posible medir mediante agitaciones periódicas. Los reactores 5 y 6 mantuvieron una relación  $S/I = 3.2$  y el reactor 6 tuvo una mayor adaptación al sustrato y remoción de DQO. Los resultados experimentales de la producción de biogás fueron cerca de 3 veces menor a la predicción teórica en los reactores 3, 5 y 6, lo cual se relaciona con los porcentajes de remoción de glicerol evaluados como DQO. El experimento en el reactor 6 obtuvo los mejores resultados en todo el estudio.
- En la caracterización de las condiciones de operación del reactor se pudo establecer que el sistema de agitación mecánica con aspas o molinete tiene una velocidad de 270 rpm cuando la perilla del equipo de control del reactor está entre los niveles 6 y 0. Aunque el manual del reactor indica una velocidad máxima de agitación de 1200 rpm, las mediciones muestran que la velocidad real es de 3120 rpm. Se destaca que la temperatura de la sección interna del medio de reacción del biorreactor aumenta a 40 [°C] después de una hora y diez minutos si la temperatura externa de calentamiento es de 50 [°C], y a 50 [°C] si la temperatura externa es de 70 [°C]. Estos datos se muestran en las figuras 13 y 14.
- En la validación de ensayo de degradación de glicerol se realizó un experimento en el reactor BioFlo 110 y en un reactor in vitro de mayor escala. Se escaló el experimento número seis del montaje experimental al reactor BioFlo 110 y al reactor in vitro para validar su reproducibilidad a mayor escala. Ambos experimentos presentaron una remoción de DQO por encima del 30%, con un consumo de sustrato similar al del experimento a menor escala. Se determinó que la mayor remoción de

DQO se produce a una temperatura más alta y a una agitación constante. Se estableció que después del quinto día, el biogás producido debería estar compuesto principalmente por dióxido de carbono. En la figura 15 no se muestra la producción acumulada de biogás del reactor BioFlo 110 debido a que no se detectó un desplazamiento de la columna de líquido, mientras que en el reactor in vitro se evidenció un desplazamiento de más de 150 ml a pesar de haberse evidenciado el flotante formado en la parte superior del reactor.

#### 4.2. ENSAYO EXPLORATORIO

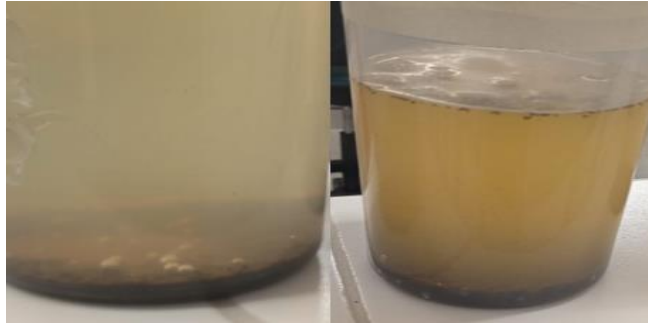
La siguiente tabla muestra la actividad de burbujeo cada reactor a lo largo de este experimento, encontrándose que los reactores 1, 2 y 8 presentaron actividad y la formación de una capa superficial de lodo, como se muestra en la figura 9:

**Tabla 6.** Observación de actividad ensayo exploratorio.

	REACTORES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>DIA 1</b>	NO HUBO OBSERVACIONES								
<b>DIA 2</b>									
<b>DIA 3</b>									
<b>DIA 4</b>									
<b>DIA 5</b>									
<b>DIA 6</b>									
<b>DIA 7</b>									
<b>DIA 8</b>	NO HUBO OBSERVACIONES								
<b>DIA 9</b>									
<b>DIA 10</b>									
<b>DIA 11</b>									

Los reactores uno, dos y ocho presentaron actividad que se manifestó en la formación de burbujas y en la precipitación de una capa superficial de lodo. Lo anterior mencionado, se puede ver a continuación:

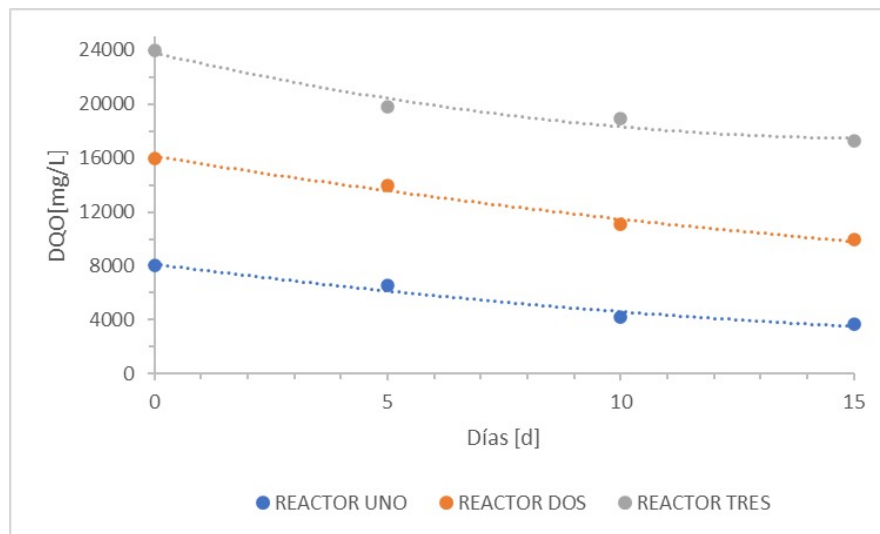
**Figura 9.** Manifestación de actividad en los reactores



#### 4.3.MONTAJE EXPERIMENTAL BPM CUANTITATIVO

En primera instancia se muestran los resultados correspondientes al estudio de PBM en los reactores 1, 2, 3, del experimento cuantitativo. En primer lugar, se muestra, el seguimiento realizado sobre el consumo de sustrato (glicerol) medido como DQO a lo largo de los 15 días en los reactores 1, 2 y 3 en este experimento, ilustrado en la figura 10.

**Figura 10.** Remoción de DQO en los reactores 1,2,3 del test de PBM

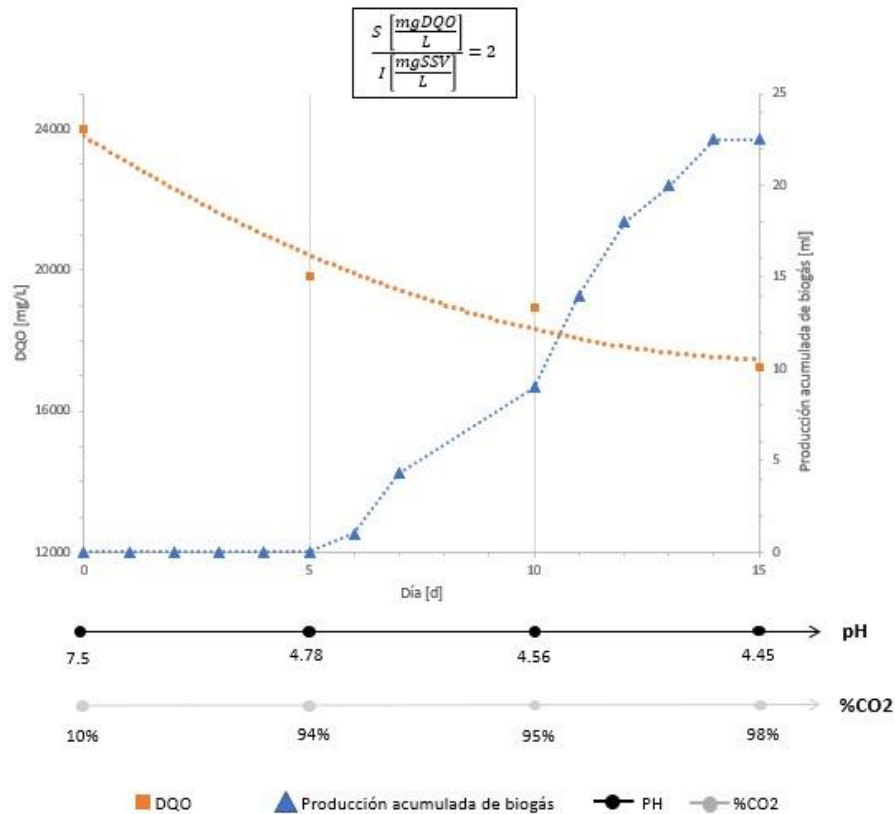


En todos los reactores se observa una biodegradabilidad inicial de rápido inicio, con una mayor pendiente en las curvas entre los días 0 y 5, luego se observa una tendencia a la estabilización y en todos los casos la remoción de DQO soluble, es decir la eliminación de glicerol, fue del orden de 4350 a 6750 mg/L.

En el primer reactor, no fue posible hacer un seguimiento efectivo a la producción de biogás y en el segundo solo parcial, lo que puede estar asociado a que no se hizo agitación de los reactores y este quedó atrapado en el flotante formado en la parte superior de ellos mismos, en tanto que en el reactor 3 se logró medir una producción acumulada de biogás de hasta 22.5 ml., pero que solo fue posible obtener por agitaciones periódicas del reactor, dado que el biogás tiende a quedar atrapado por la película de flotante, por lo que la producción

observada después del quinto día contiene biogás producido en los primeros días del ensayo y siendo así es imposible predecir la composición del biogás producido después de este momento. Sin embargo, y en consideración de las mediciones de pH realizadas y de la información aportada por la figura 3 se puede establecer que después del día quinto el biogás producido debería ser compuesto en su mayoría por dióxido de carbono. Estas observaciones se apoyan de forma complementaria con la figura 10 antes presentada, con la figura 11 mostrada a continuación:

**Figura 11.** Producción acumulada de biogás en función de la remoción de DQO en el reactor 3



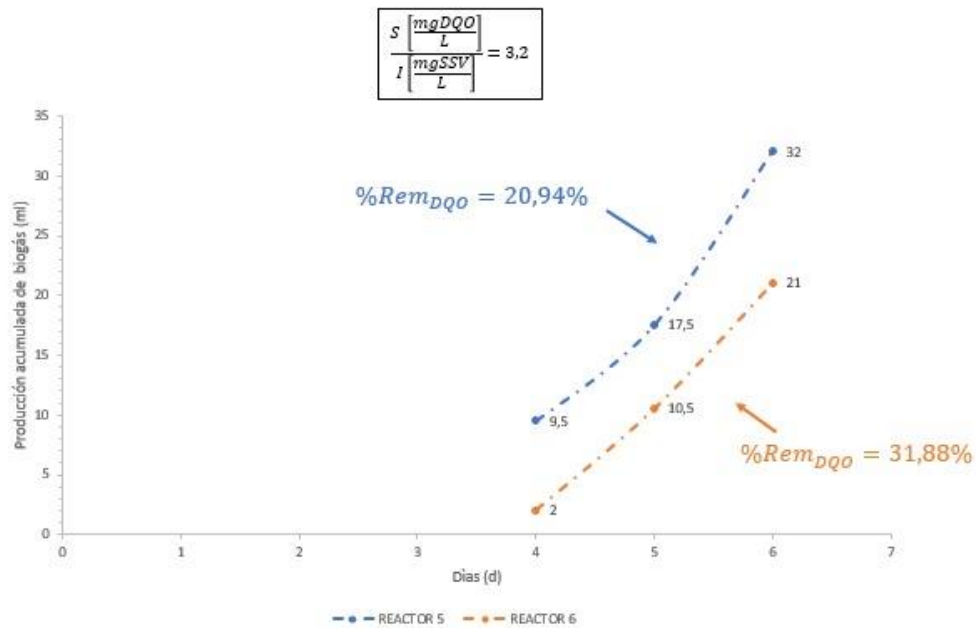
En segunda instancia, en la figura 12 se muestran los resultados de producción acumulada de biogás y de consumo de sustrato para los reactores 5 y 6, donde se mantuvo una relación  $S/I = 3.2$ . En esta figura no se muestra la producción acumulada de biogás para el reactor 4, debido a que la capa de flotante demasiado espesa impidió, el flujo continuo del biogás y por lo tanto, no fue posible hacer un seguimiento efectivo a dicha producción; la cual solo fue detectada al final cuando el biogás acumulado logro desplazar la columna de líquido al final del experimento, pero si fue posible medir el consumo de DQO correspondiente a esta producción, siendo de 23,54% de la carga inicial

Por otra parte, luego del día 9, la producción acumulada de biogás en los reactores en mención había superado los 50 ml y en este punto la columna de agua no era suficiente para hacer la



medición. Asimismo, se determinó que el reactor 6 tuvo una mayor adaptación al sustrato y un mayor porcentaje de remoción de DQO que los demás.

**Figura 12.** Producción acumulada de biogás en los reactores 5 y 6



Finalmente, para los reactores 3,5 y 6 se procedió a contrastar la producción experimental medida de biogás con la predicción teórica de los modelos de degradación anaerobia dada por la ecuación sugerida por el IPCC:

$$Max_{prod} \left[ \frac{mgCH_4}{mgDQO} \right] * \frac{DQO_{removida} \left[ \frac{mgDQO}{L} \right] * V_{reactor} [L]}{Duración\ del\ experimento\ (días)} * \left( \rho_{CH_4} \left[ \frac{mg}{ml} \right] \right)^{-1} * 2 \left[ \frac{ml\ Biogás}{mlCH_4} \right] \quad (4)$$

Donde en la ecuación (4), el factor  $0.25 \text{ mgCH}_4/\text{mgDQO}_{Removida}$  representa la máxima producción teórica de metano y MFC es el factor de corrección por liberación efectiva del metano en un proceso anaerobio, que es de 0.8 y el factor multiplicador 2 ml biogás/mlCH<sub>4</sub>, se asume, considerando una composición equimolar de biogás acumulado 50% CH<sub>4</sub> / 50% CO<sub>2</sub>.

Como resultado se obtiene la tabla 7, donde se observa que para los reactores 3, 5 y 6 la producción experimental es cerca de 3 veces menor a la predicción teórica en los reactores, lo cual es completamente coherente con los porcentajes de remoción del sustrato glicerol, evaluado como DQO, especialmente en los reactores 3 y 6 donde la remoción estuvo alrededor del 30%, siendo el experimento realizado en el reactor 6 el de mejor resultado en todo el estudio.

**Tabla 7.** Cálculo de la producción máxima teórica de metano

REACTOR	TIEMPO [d]	% REMOCIÓN DQO	DQO <sub>removida</sub> [mg/L]	PRODUCCIÓN TEÓRICA DE BIOGÁS (Según Ec. 4) - [ml Biogás /d]	PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL [ml Biogás /d]
3	15	28,13%	6750	83,08	22,5
5	7	20,94%	3350	88,35	32
6	7	31,88%	2550	67,25	21,4

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL REACTOR

##### 4.4.1. CONTROL DE AGITACIÓN

Con relación al ajuste del sistema de agitación mecánica con aspas o molinete, se pudo observar que cuando la perrilla del equipo del control del reactor estuvo entre los niveles 6 y 0 se registró una velocidad de 270 rpm siendo este el primer intervalo con movimiento en el eje. Asimismo, a pesar de que en el manual del reactor se reflejará una máxima velocidad de agitación de 1200 rpm, como el equipo de control no es propio del reactor, en las mediciones se determinó que esta velocidad en realidad es de 3120 rpm. En la figura 13 que se encuentra a continuación se pueden observar la graduación de los rangos agitación establecidos para este dispositivo.

**Figura 13.** Velocidad de agitación de las aspas

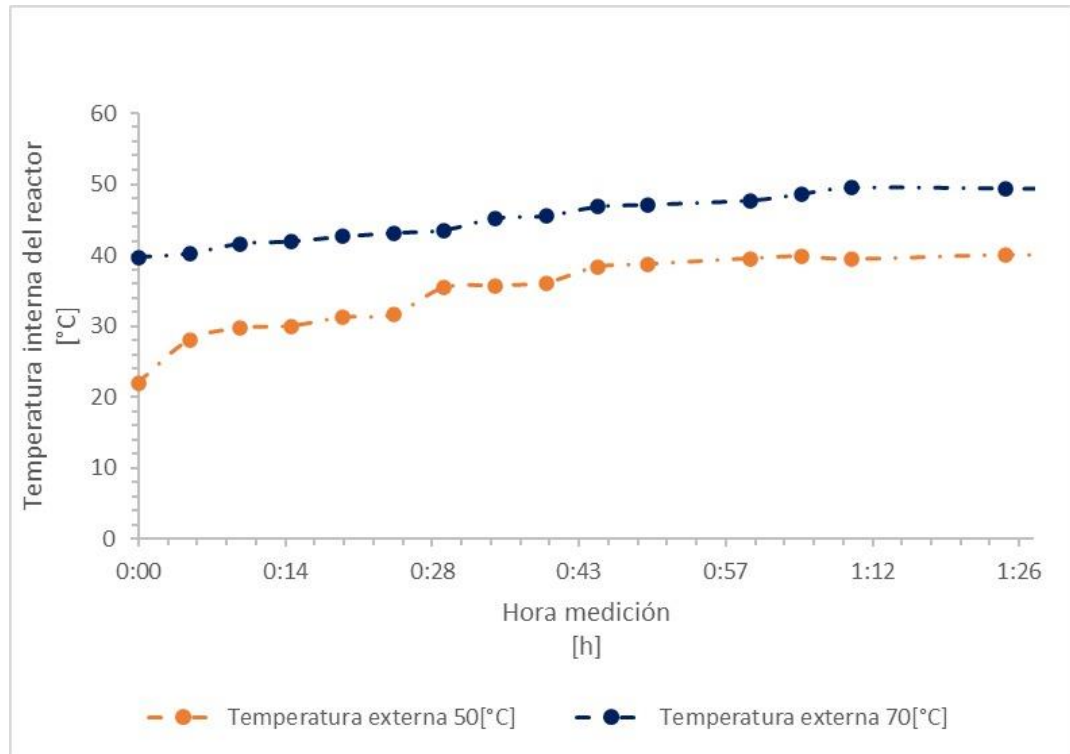


Con relación a la temperatura de la sección interna del medio de reacción del biorreactor vs. la temperatura externa de calentamiento se destaca que luego de una hora y diez minutos la sección interna en mención alcanza una temperatura de 40 [°C] si la temperatura externa tiene una temperatura de 50 [°C], mientras que, si esta se encuentra a 70 [°C], la sección interna del reactor alcanza una temperatura de 50 [°C]. Lo comentado anteriormente, se puede encontrar en la siguiente figura.

#### **4.4.2. VARIABLE TEMPERATURA**

La figura 14 muestra que luego de una hora y diez minutos la sección interna del medio de reacción del reactor alcanza una temperatura de 40 [°C] si la temperatura externa tiene una temperatura de 50 [°C], mientras que, si esta se encuentra a 70 [°C], la sección interna del reactor alcanza una temperatura de 50 [°C]. Lo comentado anteriormente, se puede encontrar en la siguiente figura.

**Figura 14.** Medición de temperatura en el interior del biorreactor.



#### **4.5. VALIDACIÓN DE ENSAYO DE DEGRADACION DE GLICEROL EN EL REACTOR BIOFLO 110 Y EN EL REACTOR IN VITRO BIOREACTORES DE MAYOR ESCALA**

Se escaló el experimento número seis del montaje experimental con una relación  $S/I = 3.2$  al reactor BioFlo 110 y a un reactor in vitro de 1 L, para validar de que este es reproducible a una mayor escala. En primera instancia se pudo observar que los dos experimentos presentan una remoción de DQO por encima del 30% como se evidencia en la tabla 8. Es importante decir que el consumo de substrato seguido por esta remoción es similar al del experimento a una menor escala, no obstante, se determinó que hay una mayor remoción de este parámetro a una mayor temperatura y a una agitación constante como es el caso del biorreactor BioFlo 110, sin embargo, no está clara la influencia de estas dos variables en la remoción DQO, más allá que la de suponer que estas facilitan un mayor agitación del biogás producido, facilitando su liberación.

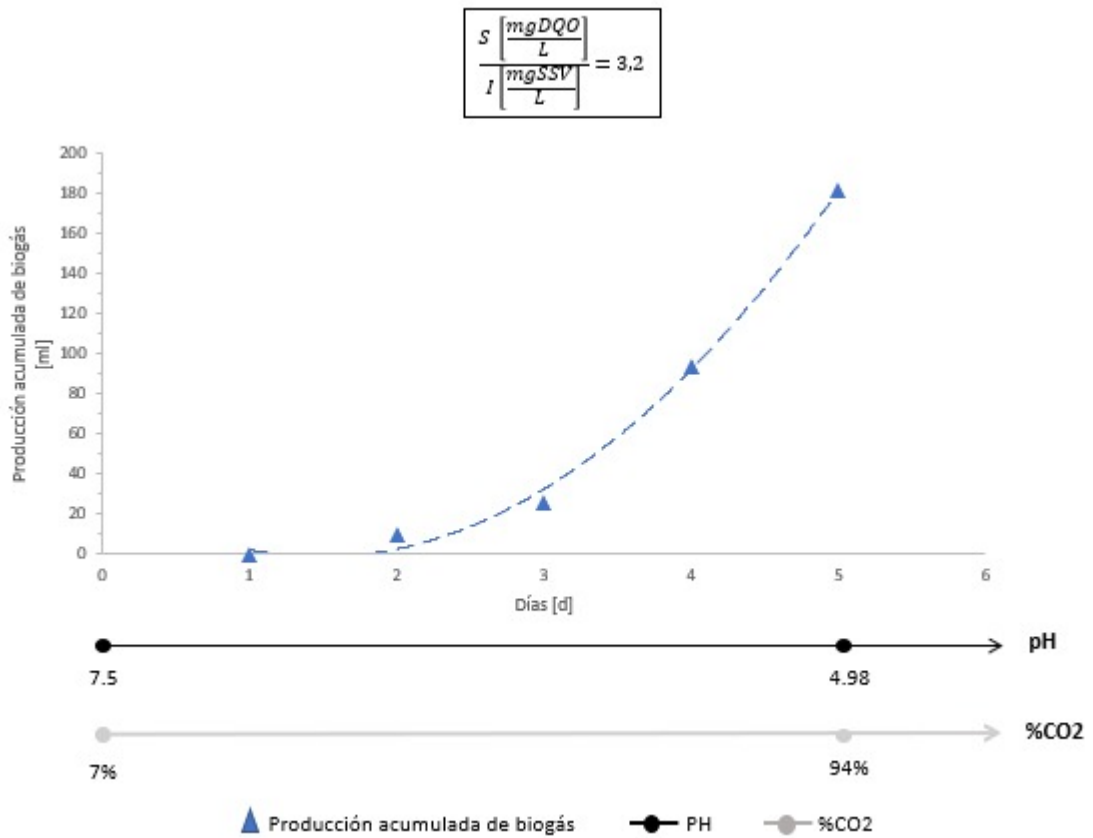
En segunda instancia, en consideración de las mediciones de pH realizadas y de la información aportada por la figura 3 se puede establecer que después del quinto día el biogás producido debería estar compuesto en su mayoría por dióxido de carbono. Finalmente, en la figura 15 no se muestra la producción acumulada de biogás del reactor BioFlo 110 debido a

que no se detectó un desplazamiento de la columna de líquido, mientras que, en el reactor in vitro se evidenció un desplazamiento de más de 150 ml a pesar de haberse evidenciado el flotante formado en la parte superior del reactor,

**Tabla 8.** Porcentajes de remoción de DQO en el biorreactor Bioflo 110 y en el reactor in vitro.

REACTOR	REMOCIÓN DE DQO
BIOFLO 110	41,00%
IN VITRO	35,50%

**Figura 15.** Acumulación diaria de biogás en el reactor in vitro



## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se realizaron seis pruebas de potencial bioquímico de metano para el sustrato glicerol, medido como DQO en el rango de 8000 a 24000 mgDQO/L de glicerol, observándose que hay una muy rápida degradación que posiblemente corresponde a la producción de biogás.
- La rápida acidificación evidenciada en los experimentos (todos realizados sin ajuste de nutrientes, pH o inductores biológicos), es la causa más probable de que se inhiba la producción de metano como se evidencia en la figura 3 y por consiguiente, es presumible que el biogás generado luego del quinto día esté compuesto en su mayoría por dióxido de carbono.
- Se logra validar que los test de PBM con relaciones S/I cercanos a 4 son los que mayor generación de biogás generan en los primeros días de experimentación (0 – 5 días).
- Se pudo observar que el inóculo seleccionado en el presente estudio funciona para la degradación de glicerol puesto que se evidencia un consumo de este sustrato, no obstante, el test de PBM puede ser mejorado agregando nutrientes menores.
- Para el estudio de doctorado se aconseja hacer un diseño experimental que le permita medir la producción de biogás en los primeros cinco días debido a la rápida degradación del sustrato y a su rápida acidificación o implementar estrategias experimentales para lograr una estabilidad más prolongada en la producción de biogás
- Se deja las condiciones básicas de trabajo en dos variables operacionales del reactor BioFlo 110 disponible en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Autónoma de Bucaramanga: agitación y temperatura.
- Durante el experimento realizado en el reactor BioFlo110, la falta de desplazamiento de agua en la columna puede deberse a la presión del gas en el espacio entre el reactor y la manguera que se conecta a la columna de desplazamiento de agua. Sin embargo, al analizar las gráficas propuestas por Van Lier y los niveles de pH medidos durante los 5 días de estudio, se descubrió que el biogás generado contiene una proporción más alta de CH<sub>4</sub>. Como las moléculas de CH<sub>4</sub> son aproximadamente tres veces más pequeñas que las de CO<sub>2</sub>, es posible que el biogás generado dentro del reactor, al ser rico en CH<sub>4</sub>, no sea suficiente para vencer la presión de la columna de agua.
- Se recomienda que los test de PBM se lleven a cabo sobre un Shaking Water Bath como el que se encuentra en el laboratorio de biotecnología de la UNAB de la marca Thermo Scientific; esto debido a que los reactores deben tener una leve y constante agitación para evitar la formación del flotante formado en la parte superior de estos. En la figura que se muestra a continuación se puede observar el equipo en mención.

**Figura 16** . Shaking Water Bath (Thermo Scientific) disponible en el laboratorio  $\varepsilon$ -bio.



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Aziz, N. I. H., Hanafiah, M. M., & Mohamed Ali, M. Y. (2019). Sustainable biogas production from agrowaste and effluents – A promising step for small-scale industry income. *Renewable Energy*, 132, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.149>
- Aguiar, S., Arboleda, L., & Uvidia, H. (2021). Aprovechamiento de residuos agroindustriales como alternativa en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Alfa*, 5(15), 649–660. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i15.145>
- Angeladiki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, L., Guwy, A., Jenicek, P., Kalyuzhnyi, S., & van Lier, J. (2007). *Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition (ABAI) Task Group Meeting 9th to 10th October 2006, in Prague*.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5), 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2008.06.002>
- Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., & Cetecioglu, Z. (2018). Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresour Technol*, 268, 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.042>
- Bentley, R., & Chasteen G, T. (2003). Biomethylation of Selenium and Tellurium: Microorganisms and Plants. *Chem Rev*, 103(1), 1–26.

- Caillet, H., Lebon, E., Akinlabi, E., Madyira, D., & Adelard, L. (2019). Influence of inoculum to substrate ratio on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests of sugarcane distillery waste water. *Procedia Manufacturing*, 35, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.05.037>
- Cárdenas Cleves, L. M., Parra Orobio, B. A., Torres Lozada, P., & Vásquez Franco, C. H. (2016). Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos. *Revista ION*, 29(1), 95–108. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016008>
- Cardona Alzate, C. A., Serna-Loaiza, S., & Ortiz-Sanchez, M. (2020). Sustainable Biorefineries: What was Learned from the Design, Analysis and Implementation. *Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems*, 8(1), 88–117. <https://doi.org/10.13044/j.sdewes.d7.0268>
- Carus, M., & Dammer, L. (2018). The Circular Bioeconomy—Concepts, Opportunities, and Limitations. *Industrial Biotechnology*, 14(2), 83–91. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.29121.mca>
- Centeno, M. (2011). *Gestión y valorización energética de los lodos fisicoquímicos y biológicos generados en el tratamiento de efluentes industriales de la empresa Bio-D S.A.* Universidad Autónoma de Bucaramanga.
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008a). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008b). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Cirne, D. G., Paloumet, X., Björnsson, L., Alves, M. M., & Mattiasson, B. (2007). Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, 32(6), 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.04.003>
- Coca, M. (n.d.). *Planta de tratamiento de aguas residuales procedentes de la producción de biodiesel.* Universidad de Valladolid.
- Dahiya, S., Sarkar, O., Swamy, Y. V., & Venkata Mohan, S. (2015). Acidogenic fermentation of food waste for volatile fatty acid production with co-generation of biohydrogen. *Bioresource Technology*, 182, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.007>
- Demirel, B., & Scherer, P. (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy*, 35(3), 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.022>
- Deublein, D., & Steinhauser, A. (2008). *Biogas from Waste and Renewable Resources.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527621705>



- Facchin, V., Cavinato, C., Pavan, P., & Bolzonella, D. (2013). Batch and Continuous Mesophilic Anaerobic Digestion of Food Waste: Effect of Trace Elements Supplementation. *Chemical Engineering Transactions*, 32.
- Garcia-Nunez, J. A., Rodriguez, D. T., Fontanilla, C. A., Ramirez, N. E., Silva Lora, E. E., Frear, C. S., Stockle, C., Amonette, J., & Garcia-Perez, M. (2016). Evaluation of alternatives for the evolution of palm oil mills into biorefineries. *Biomass and Bioenergy*, 95, 310–329. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.020>
- Ghaleb, A. A. S., Kutty, S. R. M., Ho, Y. C., Jagaba, A. H., Noor, A., Al-Sabaei, A. M., Kumar, V., & Saeed, A. A. H. (2020). Anaerobic co-digestion for oily-biological sludge with sugarcane bagasse for biogas production under mesophilic condition. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991(1), 012084. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012084>
- Hansen, T. L., Schmidt, J. E., Angelidaki, I., Marca, E., Jansen, J. la C., Mosbæk, H., & Christensen, T. H. (2004). Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*, 24(4), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2003.09.009>
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Lacos, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515–2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
- Jain, S., Jain, S., Wolf, I. T., Lee, J., & Tong, Y. W. (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. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.091>
- Jash, T., & Ghosh, D. N. (1996). Studies on the solubilization kinetics of solid organic residues during anaerobic biomethanation. *Energy*, 21(7–8), 725–730. [https://doi.org/10.1016/0360-5442\(95\)00123-9](https://doi.org/10.1016/0360-5442(95)00123-9)
- Jimenez, J. A., la Motta, E. J., & Parker, D. S. (2005). Kinetics of Removal of Particulate Chemical Oxygen Demand in the Activated-Sludge Process. *Water Environment Research*, 77(5), 437–446. <https://doi.org/10.2175/106143005X67340>
- Kainthola, J., Kalamdhad, A. S., & Goud, V. v. (2019). A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. *Process Biochemistry*, 84, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.023>
- Kallistova, A. Yu., Goel, G., & Nozhevnikova, A. N. (2014). Microbial diversity of methanogenic communities in the systems for anaerobic treatment of organic waste. *Microbiology*, 83(5), 462–483. <https://doi.org/10.1134/S0026261714050142>

- Karim, K., Hoffmann, R., Thomas Klasson, K., & Al-Dahhan, M. H. (2005). Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mode of mixing. *Water Research*, *39*(15), 3597–3606. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.019>
- Kumar, A., & Samadder, S. R. (2020). Performance evaluation of anaerobic digestion technology for energy recovery from organic fraction of municipal solid waste: A review. *Energy*, *197*, 117253. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117253>
- Kumar, S. (2011). Composting of municipal solid waste. *Critical Reviews in Biotechnology*, *31*(2), 112–136. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.492207>
- Kwietniewska, E., & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *34*, 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.041>
- Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J. M., Junqua, G., & Steyer, J. P. (2010). Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochemistry*, *45*(4), 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.018>
- Li, D., Liu, S., Mi, L., Li, Z., Yuan, Y., Yan, Z., & Liu, X. (2015). Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and cow manure. *Bioresource Technology*, *189*, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.033>
- Li, R., Chen, S., Li, X., Saifullah Lar, J., He, Y., & Zhu, B. (2009). Anaerobic Codigestion of Kitchen Waste with Cattle Manure for Biogas Production. *Energy & Fuels*, *23*(4), 2225–2228. <https://doi.org/10.1021/ef8008772>
- Li, X., Li, L., Zheng, M., Fu, G., & Lar, J. S. (2009). Anaerobic Co-Digestion of Cattle Manure with Corn Stover Pretreated by Sodium Hydroxide for Efficient Biogas Production. *Energy & Fuels*, *23*(9), 4635–4639. <https://doi.org/10.1021/ef900384p>
- Li, Y., Park, S. Y., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>
- Llabrés-Luengo, P., & Mata-Alvarez, J. (1988). Influence of temperature, buffer, composition and straw particle length on the anaerobic digestion of wheat straw—Pig manure mixtures. *Resources, Conservation and Recycling*, *1*(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(88\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0921-3449(88)90005-5)
- Lombardi, L., & Francini, G. (2020). Techno-economic and environmental assessment of the main biogas upgrading technologies. *Renewable Energy*, *156*, 440–458. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.083>
- Macherzyński, B. (2018). Biochemical Neutralization of Coke Excess Sewage Sludge During Anaerobic Digestion Process. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *32*(2), 239–246. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2016.1041>

- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *45*, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>
- Mata-Alvarez, J. (2015). Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes. *Water Intelligence Online*, *4*(0), 9781780402994–9781780402994. <https://doi.org/10.2166/9781780402994>
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., & Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *36*, 412–427. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, *74*(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)
- Merlin Christy, P., Gopinath, L. R., & Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *34*, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>
- Meynell, P.-J. (1976). *Methane : planning a digester*. Prism Press.
- Nakasima-López, M., Taboada-González, P., Aguilar-Virgen, Q., & Velázquez-Limón, N. (2017). Adaptación de Inóculos Durante el Arranque de la Digestión Anaerobia con Residuos Sólidos Orgánicos. *Información Tecnológica*, *28*(1), 199–208. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100020>
- Nguyen, L. N., Kumar, J., Vu, M. T., Mohammed, J. A. H., Pathak, N., Commault, A. S., Sutherland, D., Zdarta, J., Tyagi, V. K., & Nghiem, L. D. (2021). Biomethane production from anaerobic co-digestion at wastewater treatment plants: A critical review on development and innovations in biogas upgrading techniques. *Science of The Total Environment*, *765*, 142753. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142753>
- Panichnumsin, P., Nopharatana, A., Ahring, B., & Chaiprasert, P. (2010). Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure. *Biomass and Bioenergy*, *34*(8), 1117–1124. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.02.018>
- Parkin, G. F., & Owen, W. F. (1986). Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges. *Journal of Environmental Engineering*, *112*(5), 867–920. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1986\)112:5\(867\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1986)112:5(867))
- Pavlostathis, S. G., & Giraldo-Gomez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Control*, *21*(5–6), 411–490. <https://doi.org/10.1080/10643389109388424>

- Quispe, C. A. G., Coronado, C. J. R., & Carvalho Jr., J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475–493. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.017>
- Reda, T., Plugge, C. M., Abram, N. J., & Hirst, J. (2008). Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10654–10658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801290105>
- Ren, Y., Yu, M., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Huang, Q., & Liu, Y. (2018). A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. *Bioresource Technology*, 247, 1069–1076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.109>
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (n.d.). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*.
- Rodriguez-Chiang, L., Llorca, J., & Dahl, O. (2016). Anaerobic co-digestion of acetate-rich with lignin-rich wastewater and the effect of hydrotalcite addition. *Bioresource Technology*, 218, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.074>
- Sánchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., & Martín, A. (2001). Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. *Process Biochemistry*, 37(5), 483–489. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00240-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00240-0)
- Sánchez Ramírez, J., Ribes, J., Ferrer, J., & García-Usach, M. F. (2017). Obtención de los principales parámetros del agua residual urbana empleados en los modelos matemáticos de fangos activados a partir de una caracterización analítica simple. *Ingeniería y Región*, 17, 33. <https://doi.org/10.25054/22161325.1534>
- SANGSRI, S., SIRIPATANA, C., RAKMAK, N., WADCHASIT, P., & JIJAI, S. (2021). Evaluating Biomethane Potential of Inocula from Different Active Biogas Digesters for Palm Oil Mill Effluent by BMP and SMA: Effect of Dilution and Sources. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 18(1). <https://doi.org/10.48048/wjst.2021.6515>
- Sperling, M. (2005). *Principios do tratamento biológico de águas residuárias*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Stichting Toegepast Onderzoek Reiniging Afvalwater (STORA). (1985). *Optimalisatie van de gistingsgasproductie*.
- Suhartini, S., Nurika, I., Paul, R., & Melville, L. (2021). Estimation of Biogas Production and the Emission Savings from Anaerobic Digestion of Fruit-based Agro-industrial Waste and Agricultural crops residues. *BioEnergy Research*, 14(3), 844–859. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10209-5>
- Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., & Adani, F. (2009). Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of

- biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource Technology*, 100(12), 3140–3142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.012>
- Turovskiy, I. S., & Mathai, P. K. (2006). *Wastewater Sludge Processing*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/047179161X>
- van Lier, J. (2014). *Notas de curso*.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J., & Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*, 28(6), 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>
- Vavilin, V. A., Rytov, S. v., Lokshina, L. Ya., Rintala, J. A., & Lyberatos, G. (2001). Simplified hydrolysis models for the optimal design of two-stage anaerobic digestion. *Water Research*, 35(17), 4247–4251. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00148-8)
- Venkata Mohan, S., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M. V., Kumar, A. N., & Sarkar, O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. *Bioresource Technology*, 215, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.130>
- Wang, K., Yin, J., Shen, D., & Li, N. (2014). Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH. *Bioresource Technology*, 161, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.088>
- Westerholm, M., Isaksson, S., Karlsson Lindsjö, O., & Schnürer, A. (2018). Microbial community adaptability to altered temperature conditions determines the potential for process optimisation in biogas production. *Applied Energy*, 226, 838–848. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.06.045>
- Wongfaed, N., Kongjan, P., Prasertsan, P., & O-Thong, S. (2020). Effect of oil and derivative in palm oil mill effluent on the process imbalance of biogas production. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119110. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119110>
- Xie, S., Wickham, R., & Nghiem, L. D. (2017). Synergistic effect from anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.037>
- Xu, F., Shi, J., Lv, W., Yu, Z., & Li, Y. (2013). Comparison of different liquid anaerobic digestion effluents as inocula and nitrogen sources for solid-state batch anaerobic digestion of corn stover. *Waste Management*, 33(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.006>
- Yu, M., Wu, C., Wang, Q., Sun, X., Ren, Y., & Li, Y.-Y. (2018). Ethanol prefermentation of food waste in sequencing batch methane fermentation for improved buffering capacity and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, 248, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.013>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.261>
- Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., & Tan, T. (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.038>
- Zhang, L., Lee, Y.-W., & Jahng, D. (2011). Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: Focusing on the role of trace elements. *Bioresource Technology*, 102(8), 5048–5059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.082>
- Zhao, J., Wang, D., Liu, Y., Ngo, H. H., Guo, W., Yang, Q., & Li, X. (2018). Novel stepwise pH control strategy to improve short chain fatty acid production from sludge anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, 249, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.050>

## ANEXOS

### Anexo A. Datos reportados por el laboratorio SIAMA



#### REPORTE DE RESULTADOS N° 214867

Fecha de emisión: 14 de septiembre de 2022	Código de la muestra: 214867
Solicitante: CAMILO ANDRES ORTIZ ENCISO	
Dirección: AV. 42 # 48- 11	
Muestra: PALMERAS DE MONTERREY PISCINA 2	
Fecha de muestreo: 27 de agosto de 2022	Matriz: LODO
Fecha de recepción: 9 de septiembre de 2022	Responsable de muestreo: SOLICITANTE
Envase o empaque: Plástico	Procedimiento de muestreo: SOLICITANTE
Tipo de muestreo: Puntual	Tamaño de la muestra: 500 ml
Condiciones de recepción de la muestra: Adecuada	Plan de muestreo: //
Observaciones: //	

FECHA DE ANÁLISIS	VARIABLE	MÉTODO	RESULTADOS	UNIDADES
9/09/2022	DQO	SM 5220 C	40740	mg O <sub>2</sub> /L
12/09/2022	NITRÓGENO TOTAL	Kjeldahl/Titulometria	2600	mg N/L

**SM: STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. AWWA, WEF, APHA 23th.**

**OBSERVACIONES:**

La muestra a la que se refieren los datos de este reporte, ha sido proporcionada por el SOLICITANTE, por lo tanto SIAMA no es responsable del origen o fuente de donde se ha extraído dicha muestra. En consecuencia los datos que figuran en el informe no constituyen una garantía de la representatividad de la (s) muestra(s) y por tanto se refiere(n) única y exclusivamente a dicha(s) muestra(s).

Los resultados son válidos para la muestra analizada. No se pueden reproducir sin la previa autorización de SIAMA. Este reporte de resultados es válido únicamente si tiene sello seco.

**Aprobó:**

**MARÍA DEL PILAR VARGAS RIVERA**  
DIRECTORA DE FÍSICOQUÍMICA  
QUÍMICA AMBIENTAL PQAmb 00029

**FIN DEL REPORTE DE RESULTADOS**

Cualquier modificación no autorizada, fraude o falsificación del contenido o de la apariencia de este documento es ilegal y los culpables pueden ser procesados con el máximo rigor de la ley.

Código	R - 051	Versión	0.4	Fecha	10/02/2020	Página	1 de 1
--------	---------	---------	-----	-------	------------	--------	--------

Servicios Integrados para la Industria del Agro, Minero - Energética y el Medio Ambiente.

[www.siama.co](http://www.siama.co)

Carrera 24 No. 36 - 11. Teléfonos +57 7 634 80 00 Celular 318 707 0821 Bucaramanga - Colombia . info@siama.co

## Anexo B. Procedimiento llevado a cabo para la preparación de la solución de referencia

Para determinar la concentración inicial de la solución de referencia, se hace el siguiente cálculo:

$$C_{inicial} * V_{inicial} = C_{final} * V_{final}$$
$$C_{inicial} = \frac{24000 \frac{mgDQO}{L_{solución}} * 0.3 L}{0.240 L}$$
$$C_{inicial} = 30000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}$$

En base a lo anterior, de la siguiente manera se determinó la cantidad de masa de glicerol por litro de solución que se encuentra en el reactor:

$$= \frac{30000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}}{1.217 \frac{mgDQO}{mgGly}}$$
$$= 24650.78 \frac{mgGly}{L_{solución}}$$

Haciendo uso de la densidad y teniendo conocimiento de la masa de glicerol por litro de solución, se estableció que:

$$= \frac{24.65 \frac{gGly}{L_{solución}}}{1.26 \frac{gGly}{ml \text{ de glicerina}}}$$
$$= 19.56 \frac{ml \text{ de glicerina}}{L_{solucion}}$$

Para determinar el volumen de glicerol requerido que se debe agregar en 300 ml de volumen de trabajo por reactor:

$$\frac{X \text{ ml de Glicerina}}{240 \text{ ml de solución}} = \frac{19.56 \text{ ml de glicerina}}{1000 \text{ de solución}}$$

Por consiguiente, para 24000 mgDQO/L, se requirieron 4.69 ml de glicerol.



## **Anexo C. Procedimiento para la implementación y materiales usados en el ensayo exploratorio**

### **a) Materiales usados:**

- 2 metros de manguera de silicona reforzada  $\varnothing$  1/8"
- 1 metro de manguera de laboratorio  $\varnothing$  1/8"
- Pegante para mangueras y tuberías
- Cinta de enmascarar
- Cinta teflón  $\frac{1}{2}$  "-10m
- 4 barras de silicona
- Agua destilada
- 6 frascos humidificadores de oxígeno de 500 ml
- 4 frascos humidificadores de oxígeno de 400 ml

### **b) El procedimiento realizado para el montaje de cada reactor fue el siguiente:**

1. Se realizó una prueba de fugas en los frascos humidificadores. Esta prueba consistió en llenar de agua los frascos en mención para que mediante la observación se pudiera determinar si hay una salida de agua y en caso de que la hubiera, se procedió a corregirla mediante silicona.
2. Se hizo la preparación de las concentraciones tanto de glicerol como de lodo para cada experimento.
3. Se vertieron las concentraciones en mención en los frascos humidificadores
4. Se realizó el sellamiento del conjunto frasco-manguera con el fin de asegurar hermeticidad. Las uniones son sellados con silicona caliente y cinta de enmascarar, mientras que, las conexiones de las mangueras se realizaron usando pegamento para tuberías.
5. Se adicionó agua a las probetas y en estas se sumergió la manguera que conecta al reactor.

Anexo D. Procedimiento llevado a cabo para establecer los volúmenes de glicerol y lodo agregado en cada reactor del ensayo exploratorio:

- a) **Para establecer el volumen de glicerol agregado en 300 ml de volumen de trabajo en los reactores 1, 4 y 5 se hizo lo siguiente:**

$$\begin{aligned}
 C_{inicial} * V_{inicial} &= C_{final} * V_{final} \\
 C_{inicial} &= \frac{8000 \frac{mgDQO}{L_{solución}} * 0.3 L}{0.240 L} \\
 C_{inicial} &= 10000 \frac{mgDQO}{L_{solución}} \\
 &= \frac{10000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}}{1.217 \frac{mgDQO}{mgGly}} \\
 &= 8216,93 \frac{mgGly}{L_{solución}} \\
 &= \frac{8,22 \frac{gGly}{L_{solución}}}{1.26 \frac{gGly}{ml \text{ de glicerina}}} \\
 &= 6.52 \frac{ml \text{ de glicerina}}{L_{solucion}} \\
 \frac{X \text{ ml de Glicerina}}{240 \text{ ml de solución}} &= \frac{6.52 \text{ ml de glicerina}}{1000 \text{ de solución}}
 \end{aligned}$$

$$X \text{ ml de glicerina} = 1.56 \text{ ml de glicerina}$$

- b) **Para establecer el volumen de glicerol agregado en 300 ml de volumen de trabajo en los reactores 2, 6 y 7 se hizo lo siguiente:**

$$\begin{aligned}
 C_{inicial} * V_{inicial} &= C_{final} * V_{final} \\
 C_{inicial} &= \frac{16000 \frac{mgDQO}{L_{solución}} * 0.3 L}{0.240 L}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
C_{inicial} &= 20000 \frac{mgDQO}{L_{solución}} \\
&= \frac{20000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}}{1.217 \frac{mgDQO}{mgGly}} \\
&= 16433,85 \frac{mgGly}{L_{solución}} \\
&= \frac{16,43 \frac{gGly}{L_{solución}}}{1.26 \frac{gGly}{ml \text{ de glicerina}}} \\
&= 6.52 \frac{ml \text{ de glicerina}}{L_{solucion}}
\end{aligned}$$

$$\frac{X \text{ ml de Glicerina}}{240 \text{ ml de solución}} = \frac{13 \text{ ml de glicerina}}{1000 \text{ de solución}}$$

$$X \text{ ml de glicerina} = 3,13 \text{ ml de glicerina}$$

- c) **Para establecer el volumen de glicerol agregado en 300 ml de volumen de trabajo en los reactores 3, 8 y 9 se hizo lo siguiente:**

$$C_{inicial} * V_{inicial} = C_{final} * V_{final}$$

$$C_{inicial} = \frac{24000 \frac{mgDQO}{L_{solución}} * 0.3 \text{ L}}{0.240 \text{ L}}$$

$$C_{inicial} = 30000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{30000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}}{1.217 \frac{mgDQO}{mgGly}}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= 24650,78 \frac{mgGly}{L_{solución}} \\
&= \frac{24,65 \frac{gGly}{L_{solución}}}{1,26 \frac{gGly}{ml \text{ de glicerina}}} \\
&= 19,56 \frac{ml \text{ de glicerina}}{L_{solucion}} \\
\frac{X \text{ ml de Glicerina}}{240 \text{ ml de solución}} &= \frac{19,56 \text{ ml de glicerina}}{1000 \text{ de solución}}
\end{aligned}$$

$$X \text{ ml de glicerina} = 4,69 \text{ ml de glicerina}$$

**d) Procedimiento para establecer el volumen de lodo agregado en 300 ml de volumen de trabajo en un reactor:**

Para preparar la solución de lodo, el lodo virgen se vertió en un recipiente y se aforó a 60 ml con agua destilada, posteriormente, este volumen fue vertido a los 300 ml de mezcla de trabajo del reactor. De la siguiente manera se estableció el volumen vertido para cada reactor. A modo de ejemplo, para el experimento uno, se necesita  $4000 \frac{mgSSV}{L}$  en la mezcla en mención de 60 ml y para esto se hace el siguiente cálculo:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_{\text{lodo virgen}} = \frac{4000 \frac{mgSSV}{L_{solucion}} * 60 \text{ ml}}{23070 \frac{mgSSV}{L_{solucion}}}$$

Por consiguiente, para  $4000 \text{ mgSSV/L}$  en 60 ml, se requirieron 10,4 ml de lodo virgen.

## **Anexo E. Procedimiento para la implementación y materiales usados en el ensayo la validación del mejor experimento**

### **a) Procedimiento llevado a cabo para el montaje del reactor BioFlo 110:**

1. Se retiró la tapa superior del reactor junto al motor de aspas desajustando los pernos que fijan la tapa superior con el recipiente de vidrio
2. Se limpió el interior del recipiente utilizando agua destilada y papel absorbente
3. La mezcla con mayor remoción de DQO se escaló a 1 litro y se vertió cuidadosamente dentro del reactor.
4. Se ensambló la tapa superior del reactor junto con el motor de aspas ajustando los pernos que fijan la tapa superior con el recipiente de vidrio.
5. Para evitar fugas, se verificó el ajuste de los pernos y se adicionó silicona caliente a aquellos que presentarán agujeros en la parte superior de la cabeza
6. Sobre una taza, se ubicó una probeta invertida llena de 500 ml de agua y se adaptó a un soporte universal. Posteriormente, la manguera que proviene del reactor se introdujo dentro de la probeta.
7. Se procedió a llenar la taza en mención con agua
8. Se encendió el reactor y se ajustó la temperatura de la placa para garantizar una temperatura de 37 °C
9. Se verificó con un multímetro la temperatura dentro del reactor

### **b) Procedimiento llevado a cabo para el montaje del reactor in vitro:**

1. Se esterilizó un recipiente de vidrio de un volumen de 2 litros.
2. Se realizó una perforación de un diámetro de 1/8 de pulgada a la tapa del recipiente. Posteriormente en este, se introdujo una sección de 2 cm de manguera de laboratorio.
3. Al igual que en el montaje anterior, el mejor experimento con mayor remoción de DQO y generación de biogás se escaló a 1 litro y se vertió en el recipiente.
4. Asimismo, se agregó silicona caliente a las uniones de la tapa del recipiente con la manguera. Adicionalmente se usó cinta de enmascarar para garantizar hermeticidad en todo el sistema.
5. Sobre una taza, se ubicó una probeta invertida llena de 300 ml de agua y se adaptó a un soporte universal. Posteriormente, la manguera que proviene del recipiente de vidrio se introdujo dentro de la probeta.
6. Se procedió a llenar la taza en mención con agua

**Anexo F. Procedimiento llevado a cabo para establecer los volúmenes de glicerol y lodo agregado en cada reactor en la validación del mejor experimento**

**a) Para establecer el volumen de glicerol agregado en un litro de volumen de trabajo en el reactor:**

De la siguiente manera se determinó la cantidad de masa de glicerol por litro de solución que se encuentra en el reactor:

$$\begin{aligned} &= \frac{8000 \frac{mgDQO}{L_{solución}}}{1.217 \frac{mgDQO}{mgGly}} \\ &= 6573,54 \frac{mgGly}{L_{solución}} \end{aligned}$$

Haciendo uso de la densidad y teniendo conocimiento de la masa de glicerol por litro de solución, se estableció que:

$$\begin{aligned} &= \frac{6,57 \frac{gGly}{L_{solución}}}{1,26 \frac{gGly}{ml \text{ de glicerina}}} \\ &= 5,21 \frac{ml \text{ de glicerina}}{L_{solucion}} \end{aligned}$$

Por consiguiente, para 8000 mgDQO/L en un volumen de trabajo de un litro se necesitan 5,21 ml de glicerina.

**b) Para establecer el volumen lodo agregado en un litro de volumen de trabajo en el reactor:**

Para el experimento uno se necesitó  $2500 \frac{mgSSV}{L}$  y para esto se estableció que:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_{\text{lodo virgen}} = \frac{2500 \frac{\text{mgSSV}}{\text{Lsolucion}}}{23070 \frac{\text{mgSSV}}{\text{Lsolucion}}}$$

Por consiguiente, para 2500 mgSSV/L en un litro de mezcla, se requirieron 108,36 ml de lodo virgen.