



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE  
ESCUELA DE INGENIERIA

# **EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE OPERACIÓN EN BIORREACTORES DE BIOGÁS CON LACTOSA Y CELULOSA**

**JOSÉ LUIS GALAZ ORTIZ**

Tesis para optar al grado de  
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:  
**CÉSAR ANTONIO SÁEZ NAVARRETE**

Santiago de Chile, Octubre, 2020.

© 2020, José Luis Galaz Ortiz



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE  
ESCUELA DE INGENIERIA

# **EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE OPERACIÓN EN BIORREACTORES DE BIOGÁS CON LACTOSA Y CELULOSA**

**JOSÉ LUIS GALAZ ORTIZ**

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

**CÉSAR SÁEZ NAVARRETE**

**JORGE RAMOS GREZ**

**LEONARDO RODRÍGUEZ CORDOVA**

**JAIME NAVÓN COHEN**

Para completar las exigencias del grado de  
Magister en Ciencias de la Ingeniería.

Santiago de Chile, Octubre, 2020

A mi abuelo José, que en paz  
descanse. A Carolina, mi polola, y a  
mis padres y hermano, que siempre  
me motivan a seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A lo largo de todo el proceso de elaboración de este trabajo estuvieron muchas personas presentes, que permitieron transformar una idea en un tema concreto de tesis para desarrollar.

Quisiera destacar primero que todo a mis padres Pamela y Patricio, que me ayudaron a mantenerme constante y tener las metas claras para terminar el difícil proceso universitario.

A mi hermano Rodrigo, que me ayudó a despejarme cuando estaba encerrado en el trabajo, y a mi polola, Carolina, con quien compartí momentos inolvidables en este tiempo, y que fue quien me tuvo más paciencia para poder terminar el Magister y la carrera.

Por último, le agradezco a mi profesor guía, César, por haberme aguantado tanto tiempo en el magister y a mis compañeros de postgrado con los que compartí en las reuniones, pues me ayudaron cuando no sabía por dónde comenzar.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	4
2.1. Objetivos específicos.....	4
3. HIPÓTESIS .....	5
4. MARCO TEÓRICO .....	6
4.1. Digestión Anaeróbica.....	6
4.1.1. Hidrólisis.....	7
4.1.2. Ácidogenesis .....	7
4.1.3. Acetogénesis .....	8
4.1.4. Metanogénesis .....	8
4.2. Procesamiento de Glucosa .....	9
4.3. Enriquecimiento de Metano .....	9
4.4. Generación de metano e hidrógeno en condiciones de baja temperatura	11
4.5. Viabilidad del uso de biogás en el sur de Chile .....	13
4.6. Lactosuero .....	15
4.7. Consideraciones respecto al tipo de sustrato.....	16
4.7.1. Glucosa .....	16
4.7.2. Celulosa .....	16
4.7.3. Lactosa.....	17
4.8. Producción teórica de biogás.....	17

4.8.1. Producción considerando ecuación de sustrato .....	17
4.8.2. Producción considerando Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	19
4.8.3. Cálculo de producción teórica en el tiempo, por día .....	19
4.9. Consideraciones adicionales .....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
5.1. Descripción del funcionamiento de los biorreactores y nutrientes .....	22
5.1.1. Inóculo .....	22
5.1.2. Solución Stock .....	23
5.1.3. Bicarbonato de sodio .....	26
5.2. Descripción de condiciones de operación fijas y variables .....	26
5.3. Preparación de sustrato .....	27
5.4. Montaje .....	28
5.5. Sistema de medición y toma de muestras .....	29
6. RESULTADOS .....	31
6.1. Producción de biogás .....	32
6.2. Cromatografía de gases .....	34
6.2.1. Nitrógeno .....	35
6.2.2. Metano .....	35
6.2.3. Dióxido de Carbono .....	38
7. DISCUSIÓN .....	40
7.1. Análisis de producción de biogás .....	40
7.1.1. Biorreactores con sustrato Lactosa .....	40
7.1.2. Celulosa .....	42
7.1.3. Comparación entre ambos tipos de biorreactor .....	43
7.2. Análisis de contenido de metano con respecto al de dióxido de carbono .....	50
7.2.1. Lactosa .....	50
7.2.2. Celulosa .....	51
7.2.3. Razón entre contenido de metano y contenido de CO <sub>2</sub> .....	52
7.3. Análisis de volumen de metano y dióxido de carbono .....	55
7.3.1. Volumen de Metano .....	55
7.3.2. Volumen de dióxido de carbono .....	57
7.4. Datos estadísticos .....	57

8. CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	65
A N E X O S.....	69
Anexo A: Espectro bacteriano digestión anaeróbica.....	70
Anexo B: Fermentación y Respiración Anaeróbica.....	71
Anexo C: Fotos Biorreactores día 25 de marzo .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 5-1: Caracterización del inóculo utilizado. ....	23
Tabla 5-2: Contenido del medio basal para biorreactores de biogás. Adaptado de “Preparation of defined media” (Labatut, 2011). ....	23
Tabla 5-3: Medio basal utilizado en Solución A. ....	25
Tabla 5-4: Medio basal utilizado en Solución B. ....	25
Tabla 5-5: Valores medidos de bicarbonato de sodio, para cada biorreactor. ....	26
Tabla 5-6: Mediciones de Lactosa y Celulosa, por cada biorreactor. ....	27
Tabla 6-1: Mediciones de biogás (ml) en cada biorreactor, por día de medición. ....	32
Tabla 6-2: Mediciones de biogás acumulado (ml), por día de medición. ....	33
Tabla 6-3: Porcentajes de N <sub>2</sub> presentes en cada biorreactor (%), por día de medición. ....	35
Tabla 6-4: Porcentajes de metano presentes en cada biorreactor (%), por día de medición. .....	36
Tabla 6-5: Porcentajes de CO <sub>2</sub> presentes en cada biorreactor (%), por día de medición....	38
Tabla 7-1: Producción de biogás (ml) en biorreactores con Lactosa. ....	40
Tabla 7-2: Producción de biogás (ml) en biorreactores con Celulosa. ....	42
Tabla 7-3: Volumen de Metano (ml), por día de medición. ....	56
Tabla 7-4: Volumen de Dióxido de carbono (ml), por día de medición. ....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 4-1: Esquema digestión anaeróbica. Fuente: (GIZ, 2010) .....	6
Figura 4-2: Porcentaje de crecimiento de metanógenos en función de T° .....	12
Figura 4-3: Producción de biogás usando purín como sustrato. Fuente: (INDAP, 2018)...	14
Figura 5-1: Montaje biorreactores de biogás. El séptimo biorreactor, que aparece adelante en la foto, fue descartado.....	28
Figura 5-2: Biorreactor R <sub>5</sub> , con celulosa como sustrato.....	29
Figura 6-1: Biorreactor R <sub>1</sub> (lactosa) al lado del biorreactor R <sub>4</sub> (celulosa). .....	31
Figura 6-2: Biogás obtenido (ml) por día de medición. ....	32
Figura 6-3: Biogás acumulado (ml) por día de medición.....	33
Figura 6-4: Resultado GC medido en porcentajes de N <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> . La diferencia porcentual se completó con elementos trazas. ....	34
Figura 6-5: Porcentaje de metano (%) en cada biorreactor, por día de medición. ....	37
Figura 6-6: Volumen de CH <sub>4</sub> acumulado, por día de medición. ....	37
Figura 6-7: Porcentaje de CO <sub>2</sub> (%) en cada biorreactor, por día de medición. ....	38
Figura 6-8: Volumen de CO <sub>2</sub> , por día de medición.....	39
Figura 7-1: Extrapolación lineal producción de biogás (ml), cada 2 días desde el día 1, considerando producción acorde a función de primer orden. ....	44
Figura 7-2: Extrapolación de polinomios de grado 2 a la curva de producción acumulada de biogás, en biorreactores de Lactosa.....	45
Figura 7-3: Extrapolación de polinomios de grado 2 a la curva de producción acumulada de biogás, en biorreactores de Celulosa. ....	46

Figura 7-4: Extrapolación de datos desde el inicio estimado de producción. ....	47
Figura 7-5: Extrapolación de datos desde el inicio estimado de producción de cada tipo de biorreactor, sin considerar a R <sub>2</sub> y R <sub>4</sub> . ....	47
Figura 7-6: (a) Comportamiento inicial con extrapolación teórica, (b) comportamiento inicial con extrapolación basada en datos experimentales. ....	48
Figura 7-7: Cromatografía de gases en biorreactores de Lactosa. ....	50
Figura 7-8: Cromatografía de gases en biorreactores de Celulosa. ....	52
Figura 7-9: Porcentaje de CH <sub>4</sub> vs porcentaje de CO <sub>2</sub> , normalizando suma de ambos. ....	53
Figura 7-10: Porcentaje de CH <sub>4</sub> vs porcentaje de CO <sub>2</sub> en biorreactores de lactosa, normalizando la suma de ambos. ....	54
Figura 7-11: Porcentaje de CH <sub>4</sub> vs porcentaje de CO <sub>2</sub> en biorreactores de celulosa, normalizando la suma de ambos. ....	55
Figura 7-12: Promedio de Aire, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> , respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de lactosa. ....	58
Figura 7-13: Desviación estándar de Aire, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> , respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de lactosa. ....	59
Figura 7-14: Promedio de Aire, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> , respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de celulosa. ....	60
Figura 7-15: Desviación estándar de Aire, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> , respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de lactosa. ....	60

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo de tesis titulado “Efecto de la temperatura de operación en biorreactores de biogás con lactosa y celulosa” fue cuantificar la producción de biogás y metano frente a una reducción súbita de la temperatura de operación desde una operación sostenida a 30°C reduciéndose hasta los 22°C en la forma de un escalón. Se emplearon 6 biorreactores operados en modo batch durante 37 días de operación continua: 25 a 30°C y los días restantes, a 22°C. El inóculo anaeróbico se aclimató durante 60 días a 30°C previo a los experimentos principales. Los biorreactores emplearon separadamente lactosa y celulosa como sustratos representativos de residuos orgánicos con diferentes biodegradabilidades, de modo que 3 operaron con lactosa, el sustrato más lábil; y los otros 3, con celulosa. Se cuantificó el efecto de la disminución de la temperatura del sistema desde 30°C hasta 22°C para estos dos sustratos con miras a establecer una temperatura de biodegradación que requiera menos energía en términos de la mantención de la temperatura del digester y su operación en climas más fríos. Se observó que los biorreactores que emplearon lactosa como sustrato orgánico alcanzaron su *peak* de producción de metano en el día 30, mientras que los de celulosa comenzaron una producción sostenida desde el día 20, la que se mantuvo hasta la última medición. Para todo el período experimental, se obtuvo un máximo promedio de 133 ml de biogás para los biorreactores de lactosa con 20 ml de CH<sub>4</sub> producido, y 100 ml de biogás para el caso de celulosa con un máximo de 27 ml. Se concluye que el efecto de reducir la temperatura de operación desde los 30°C hasta 22°C resultó en una disminución significativa de la producción de biogás y metano a partir de celulosa en un 69 y 72%, respectivamente.

Palabras Claves: Biogás, generación de energía, lactosuero, desechos orgánicos, metano, BMP, temperatura psicrófila.

## ABSTRACT

The objective of this thesis work entitled "Effect of the operating temperature in biogas bioreactors with lactose and cellulose" was to quantify the production of biogas and methane by a reduction of the operating temperature from a steady operation at 30°C reducing to 22°C without intermediate temperatures. 6 bioreactors operated in batch mode were used for 37 days of continuous operation: 25 to 30°C and the remaining days, at 22°C. The anaerobic inoculum was acclimatized for 60 days at 30°C prior to the main experiments. The bioreactors used lactose and cellulose separately as representative substrates of organic waste with different biodegradability's, specifically: 3 operated with lactose, the most labile substrate; and the other 3 with cellulose. The effect of the decrease in the temperature of the system from 30°C to 22°C was quantified for these two substrates with a view to establishing a biodegradation temperature that requires less energy, in terms of maintaining the temperature of the digester and operating in colder climates.

It was observed that the bioreactors that used lactose as an organic substrate reached their peak of methane production on day 30, while those with cellulose began a sustained production from day 20, which was maintained until the last measurement. For the entire experimental period, an average maximum of 133 ml of biogas was obtained for the lactose bioreactors with 20 ml of CH<sub>4</sub> produced, and 100 ml of biogas for the case of cellulose with a maximum of 27 ml. It is concluded that the effect of reducing the operating temperature from 30°C to 22°C resulted in a significant decrease in the production of biogas and methane from cellulose by 69 and 72%, respectively.

Keywords: Biogas, generation of energy, whey, organic waste, methane, BMP,  
Psychrophilic temperature.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la contaminación ambiental se ha posicionado como uno de los problemas más relevantes, tanto en las ciudades como en el mundo en general. De hecho, dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) la contaminación aparece indirectamente en al menos 5 de los objetivos: agua limpia y saneamiento, energía limpia y no contaminante; industria, innovación e infraestructura; vida submarina y vida de ecosistemas terrestres (ONU, 2020). Sin embargo, en ciudades se ve principalmente en los objetivos 11: Ciudades y comunidades sostenibles, y 12: Producción y Consumo responsables (Ministerio del Medio Ambiente, 2020).

En paralelo, a nivel mundial junto con las ciudades, otro de los factores relevantes se ve en el ODS 5: Energía Limpia y no contaminante. Esto debido a que el uso de combustibles fósiles sigue siendo el mayor porcentaje de la matriz energética, concentrando el 87% de la producción (Pachiega et al., 2019), lo que provoca una gran cantidad de emisión de gases de efecto invernadero, acelerando el calentamiento global y aumentando la contaminación.

Como alternativa, desde finales del siglo XX existe un auge por el uso de energías renovables, destacándose entre ellas Solar, Eólica y Biomasa. Ésta última, a diferencia de las otras dos, puede utilizar materia orgánica y residuos para su generación, lo que la posiciona como una de las energías más relevantes, considerando que solo en 2016 se generaron más de 2010 millones de toneladas de basura, las cuales pueden aumentar a 3400 millones en 2030 (World Bank Group, 2018).

Dentro de la biomasa, el proceso más utilizado es el de generación de biogás a través de digestión anaeróbica (o anaerobia). La digestión anaeróbica (DA) es un proceso biológico en el cual se produce biocombustible a partir de materia orgánica, en la forma de una mezcla de gases fundamentalmente constituida por metano y CO<sub>2</sub>. El metano contenido en el biogás puede ser concentrado y utilizado en las redes de gas natural o en otras aplicaciones diversas, incluyendo transporte (GIZ, 2010). Sin embargo, las condiciones de operación de los biorreactores anaeróbicos implican un alto consumo energético, ya que el funcionamiento estándar del sistema requiere temperaturas en el rango mesofílico de temperaturas (del orden de 30°C) y en el rango termofílico de temperaturas (del orden de 55°C). Más aún, si los sistemas están debidamente aislados, los costos de mezcla, limpieza y compresión del biogás pueden resultar significativos y comprometer la economía del proceso (Bassani, Kougias, Treu, & Angelidaki, 2015).

Por otra parte, si el sistema funciona a temperaturas sub-óptimas, ya sea mesofílicas o termofílicas, se puede producir la inhibición de los microorganismos que producen metano (metanogénicos), por lo que pocos sistemas operan por debajo de los 25°C. Sin embargo, se ha retomado la atención en estos sistemas debido a que se requiere un menor costo energético (Wei & Guo, 2018). Además, al acercarse a condiciones psicrófilas (< 20°C) existe un aumento en la proliferación de bacterias homoacetogénicas, las cuales generan H<sub>2</sub> (Zabranska & Pokorna, 2018), un combustible con alto poder calorífico (Hans & Kumar, 2019) el cual aumenta la eficiencia del biogás obtenido, lo que muestra una oportunidad de estudio para una aplicación en zonas frías como el sur de Chile (Deva, y otros, 2019).

Basado en lo anterior, en esta tesis se introducirá primero al tema de Digestión Anaeróbica, para luego describir los métodos actuales de mejora de biogás, que llevaron al planteamiento de la hipótesis y del diseño experimental realizado.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto de la reducción gradual de temperatura de sistemas de biodigestión anaeróbica de sustratos lábiles, en la bioproducción de metano y biohidrógeno.

### **2.1. Objetivos específicos**

- i. Implementar un sistema de producción de metano empleando sustratos de alta biodisponibilidad.
- ii. Realizar ensayos de bioproducción de metano en biorreactores en triplicado.
- iii. Determinar el efecto de la reducción de la temperatura de los biorreactores en la bioproducción de metano y H<sub>2</sub>.
- iv. Caracterizar a través de cromatografía de gases y volumetría la biomasa degradada en estado mesofílico y en temperaturas de 22°C, provenientes de un sustrato estándar (celulosa) y un lactosuero (Fernández Rodríguez, Martínez Torres, Morán Palao, & Gómez Barrios, 2016), que será representado con lactosa.
- v. Estimar la energía del combustible resultante a bajas temperaturas, y su factibilidad general de uso en zonas de latitudes frías, como por ejemplo en el sur de Chile.

### **3. HIPÓTESIS**

En el proceso de digestión anaeróbica existe un rango de temperaturas en la que la producción de biometano se mantiene aproximadamente constante al reducir gradualmente la temperatura del sistema entre los 30 y 20°C.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Digestión Anaeróbica

La Digestión Anaeróbica (DA) es un proceso biológico en el cual la materia orgánica (en ausencia de oxígeno) se descompone formando lo que se conoce como biogás. La composición de éste es de 50-75% de  $\text{CH}_4$  y 25-50% de  $\text{CO}_2$  (más un porcentaje de elementos traza, como  $\text{H}_2$ ), donde la proporción exacta depende del sustrato inicial y del tiempo en el que se gestó el proceso (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. [FNR], 2010).

El proceso de Digestión Anaeróbica está compuesto por 4 etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, las cuales se muestran en la Figura 4-1. En cada una de estas se concibe como producto el sustrato para la etapa siguiente, siendo las últimas 2 las más complejas. En particular, la metanogénesis corresponde a la etapa más compleja del proceso, ya que se requiere de una ausencia total de hidrógeno (las bacterias archaica son

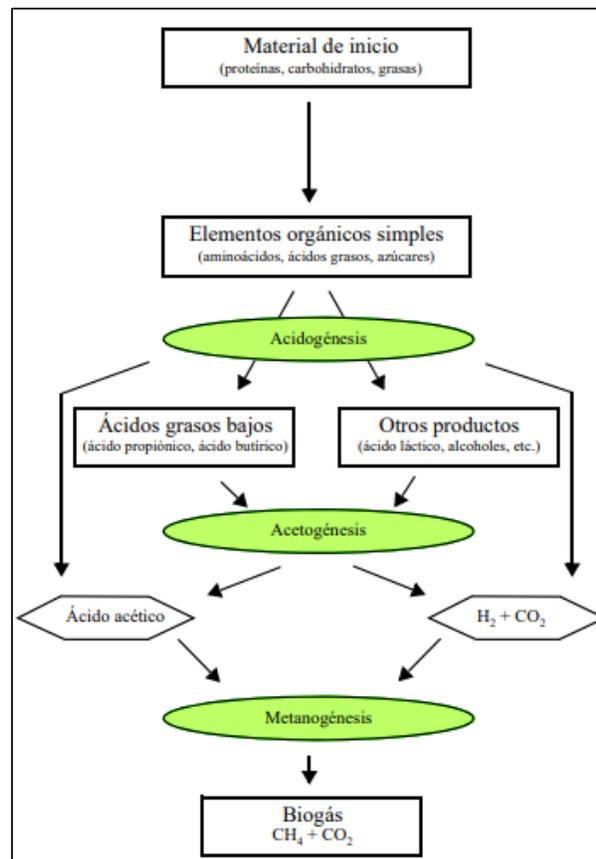


Figura 4-1: Esquema digestión anaeróbica. Fuente: (GIZ, 2010)

muy sensibles a su concentración) y funcionar a temperaturas sobre la temperatura ambiente, en lo que se define como condiciones mesofílicas y termofílicas.

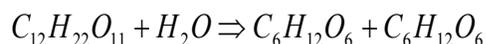
#### 4.1.1. Hidrólisis

La primera etapa, hidrólisis, es un proceso de degradación de moléculas complejas a moléculas básicas. Así, si la materia orgánica estaba compuesta por grasas, proteínas y carbohidratos, el producto final de esta etapa estará compuesta por ácidos grasos, aminoácidos y azúcares, gracias a bacterias y a un proceso enzimático de descomposición. Algunas de las bacterias relevantes durante este proceso, son Clostridium, Acetovibrio, Bacteroides y Estafilococo, las cuales descomponen las cadenas poliméricas en monómeros, utilizando enzimas extracelulares, tales como celulasas, proteasas y lipasas, como catalizadores (De la Rubia, Villamil, & Mohedano, 2020).

En el caso de la Celulosa, durante la hidrólisis se descompone en moléculas básicas de Glucosa (Scharer & Moo-Young, 1979), acorde a la siguiente reacción:



Por su parte, la Lactosa se hidroliza y se transforma en moléculas de Glucosa y Galactosa, ambas con la misma fórmula de  $C_6H_{12}O_6$ .



#### 4.1.2. Ácidogenesis

Una vez que se tienen cadenas más pequeñas y simples, el sustrato pasa a la etapa de acidogénesis, en donde bacterias fermentadoras ácido-génicas transforman los elementos básicos en ácidos tales como: acético, propiónico, butírico y prebiótico (ácidos grasos

bajos), además de otros productos como ácido láctico, acetato,  $H_2$  y  $CO_2$  (GIZ, 2010), siendo estos últimos tres productos que servirán para etapas posteriores.

Las bacterias “bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes”, y Proteobacteria son las más comunes en este proceso (De la Rubia, Villamil, & Mohedano, 2020).

#### **4.1.3. Acetogénesis**

Aunque el acetato,  $H_2$  y  $CO_2$  son productos que sirven en metanogénesis, el resto de los productos de la etapa anterior, requieren de más transformaciones. Así, los ácidos grasos bajos se oxidan por medio de bacterias acetogénicas, produciendo ácido acético,  $H_2$  y  $CO_2$ , siendo éstos los precursores de biogás (Nguyen, Nitayavardhana, Sawatdeenarunat, Surendra, & Kumar Khanal, 2019).

Algunas de las bacterias involucradas en esta etapa son: Syntrophobacter, Syntrophomonas y Syntrophus (De la Rubia, Villamil, & Mohedano, 2020).

#### **4.1.4. Metanogénesis**

Finalmente, cuando se tienen éstos productos, las bacterias arqueas metanogénicas transforman ácido acético, y a la vez  $H_2$  y  $CO_2$  en  $CH_4$ . El proceso de generación de metano es llevado a cabo por distintas bacterias dependiendo del caso, de modo que la generación de  $CH_4$  a partir de ácido acético es realizada por bacterias acetoclásticas, y la generación de metano a través de hidrógeno y dióxido de carbono es llevado a cabo por las metanógenas hidrogenotróficas (GIZ, 2010).

#### **4.2. Procesamiento de Glucosa**

Tanto la Celulosa como la Lactosa, tienen en común que luego de la hidrólisis generan Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ). Esta molécula de azúcar es la que es tratada en los procesos de digestión anaeróbica, y de ésta se producen principalmente los derivados que se transforman en metano. De acuerdo a la publicación en la guía Manual de Biogás, del Ministerio de Energía de Chile (Ministerio de Energía, 2011), el 70% del biogás que se produce deriva de la fermentación anaeróbica, proceso en el que se transforma glucosa en etanol, el cual luego es transformado a metano vía bacterias acetoclásticas (GIZ, 2010), mientras que el otro 30% proviene de la respiración anaeróbica, en donde la glucosa pasa por un proceso más complejo que involucra aceptores de electrones externos para la degradación. En Anexos aparecen esquemas de ambos procesos.

#### **4.3. Enriquecimiento de Metano**

El metano tiene un poder calorífico de 55 kJ/g (Bolzonella, y otros, 2018), y está presente en gran medida dentro del gas natural, por lo que la transformación de biogás a combustible (90% de metano o más) es esencial para que el uso de biocombustible sea viable. Esto debido a que el contenido de  $CO_2$  presente puede llegar a ser de un 50%, lo que disminuye el poder calorífico, ya que el  $CO_2$  no es combustible. Debido a ello, se busca disminuir su porcentaje en el producto final.

El proceso se conoce como enriquecimiento de metano y requiere de un consumo eléctrico no menor, pues se debe separar el  $CO_2$  de la mezcla. El gasto de energía eléctrica provoca que en algunas plantas sea contraproducente realizar ese gasto energético para generar

biometano, y se opta por utilizar el biogás dentro de una máquina térmica. No obstante, hay alternativas para evitar la separación del producto final.

Por una parte, está el enfoque de enriquecimiento de biogás agregando procesos o gases en las fases finales de producción, para así aprovechar el excedente de biogás. Hay casos en donde se fomenta la generación de metano vía metanogénesis hidrogenotrófica (biometanación), creando una etapa adicional en el proceso, donde inyecta gas hidrógeno ( $H_2$ ) en la mezcla para favorecer la reacción entre  $H_2$  y  $CO_2$  para producir metano (Bassani I. , Kougias, Treu, & Angelidaki, 2015). Este proceso muestra un aumento promedio de un 17% de la cantidad de metano en biorreactores mesofílicos y termofílicos, llegando incluso a un 89% de metano en la composición final. Sin embargo, requiere tener  $H_2$  disponible en estado gaseoso y un sistema en el que pueda tener una buena transferencia a fase líquida.

También se busca eliminar el  $CO_2$  de la mezcla sin utilizar métodos de alto consumo energético, en donde a través de un sistema de energías renovables se genera la energía necesaria para la inyección de  $H_2$  utilizando efecto Venturi (Jensen, y otros, 2018), o usando otros sistemas para generar  $H_2$  renovable (Rachbauer, Voitl, Bochmann, & Fuchs, 2016). En todos estos casos, las mejoras del proceso se enfocan en el final de este.

Otras investigaciones han explorado la posibilidad de producir hidrógeno y de producir una mezcla entre hidrógeno y metano llamada “biohitano”, donde a través de una división del proceso de digestión anaeróbica en 2 etapas, se genera hidrógeno y metano por separado. Luego esta mezcla se une y se genera un combustible con hasta un 30% de hidrógeno, con un poder calorífico más alto, ya que el poder calorífico del hidrógeno es

de 143 kJ/g (Bolzonella, y otros, 2018). Así, asumiendo que el poder calorífico de una mezcla se calcula como la suma del poder calorífico de cada combustible por su fracción molar, se obtendría un máximo de 81,4 kJ/g.

Todos los casos mencionados son viables y sirven en industrias como la automotriz, o en sistemas a gran escala. Sin embargo, se explorará la opción de generación de metano a baja temperatura, para buscar una forma de trabajar con sistemas que requieran una temperatura de operación más cercana a la temperatura ambiente.

#### **4.4. Generación de metano e hidrógeno en condiciones de baja temperatura**

Como ya se mencionó antes, las bacterias metanogénicas tienen su funcionamiento ideal en temperaturas sobre 30 grados, donde existe una adecuada cinética en las reacciones de todo el proceso y se logra una producción óptima (Dev, y otros, 2019). La temperatura ideal de producción es de 37-42°C – lo que se ilustra en la Figura 4-2 – y la mayoría de los biorreactores estándar de gran tamaño se utilizan en este rango. Debido a lo anterior, los trabajos se concentran en su mayoría en esas condiciones. Sin embargo, al disminuir la temperatura de producción bajo 30°C se tiene la ventaja de que no se necesita calentar el sustrato ni el digestor (GIZ, 2010). Esto representa una oportunidad en la producción de biogás a escala pequeña, pues en ellos no se dispone de sistemas de calor externos que permitan temperaturas mesofílicas o termofílicas.

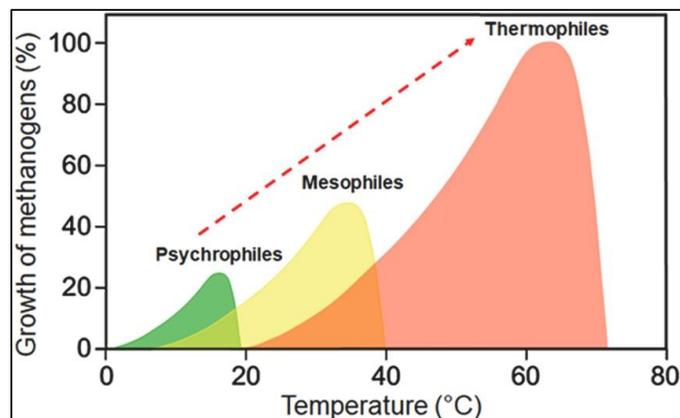


Figura 4-2: Porcentaje de crecimiento de metanógenos en función de T°

Sumado a lo anterior, mantener el sistema a temperaturas sobre 40 grados representa costos de mantención importantes. Esto representa un problema para su masificación, sobre todo en zonas frías como el sur de Chile, en donde tener un biorreactor funcionando a temperaturas sobre 30 grados se hace inviable.

Por otra parte, el metano en la naturaleza se produce en diversas zonas en temperatura ambiente, y estudios han mostrado que a medida que disminuye la temperatura, la proporción de metano producido por metanogénesis acetoclástica aumenta. Hay que recordar que en los desechos comunes el 70% de la producción de metano es por esta vía, pero al disminuir la temperatura de operación a 10°C esta producción aumenta hasta un 85% (Dhaked, Singh, & Singh, 2010).

En el mismo estudio citado, se ve que esto se debe a que la composición de bacterias metanogénicas cambia con la temperatura, lo cual muestra una capacidad de adaptación por parte del sistema para funcionar a temperaturas bajas, pese a que su óptimo siempre se presenta en el rango mesofílico. Se ve también que en el rango entre 10 y 28 grados

Celsius, se tiene que la hidrólisis es la etapa limitante del sistema, lo que indica que la biodegradabilidad del sustrato influye en la duración del proceso en general.

Otra consideración importante es que en el rango entre 30 y 15 grados la comunidad bacteriana de metanógenos no presenta cambios significativos. Sin embargo, también hay estudios que muestran que hay un aumento de productos intermedios como  $H_2$ , y la cantidad total de metano producido es menor. También es necesario considerar que mayor cantidad de  $CH_4$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$  y  $H_2S$  en solución, lo que puede aumentar la inhibición de las bacterias metanógenas, sobre todo si el sustrato tiene una cantidad importante de azufre.

Por último, es necesario tener en consideración que el sistema va a tener un tiempo de retención mayor, debido al crecimiento más lento de las bacterias (Dev, y otros, 2019).

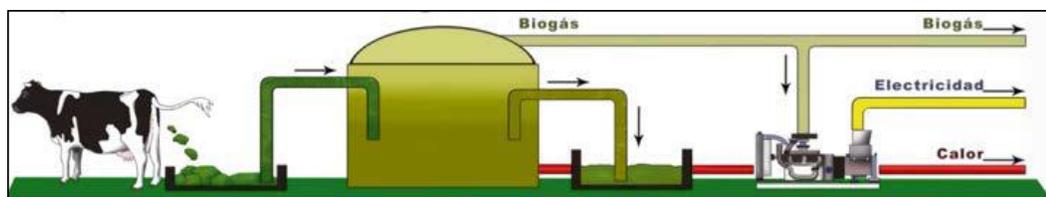
Así, se ve que el uso de sistemas a temperaturas bajo 25 grados puede lograrse siempre y cuando se tengan en consideración las limitaciones y las diferencias que existen con el proceso en rango mesofílico.

#### **4.5. Viabilidad del uso de biogás en el sur de Chile**

En Chile, solo el año 2009 se emitieron 16,9 millones de toneladas, de las cuales 6,5 millones son residuos municipales (no industriales) con una composición de 53% de materia orgánica, que equivale a 3,44 millones de toneladas de materia orgánica desperdiciada (CONAMA, 2010).

Por otra parte, en 2018 existían en el país 74 biodigestores, los cuales trabajan principalmente con los desechos orgánicos de animales domésticos, como vacas y cerdos, entre otros, aunque también abarcan desechos lácteos y tratamiento de aguas servidas. En la Figura 4-3 se muestra un esquema de un biorreactor que utiliza purín como sustrato.

Parte importante de los biorreactores que existen actualmente son de gran escala, y en algunas localidades se usan para producir energía eléctrica. No obstante, el alto costo inicial de instalación y el costo de mantención no se ha expandido mucho más allá de plantas grandes (INDAP, 2018).



**Figura 4-3: Producción de biogás usando purín como sustrato. Fuente: (INDAP, 2018)**

Los biorreactores instalados en Chile siguen protocolos estándar y trabajan en temperaturas mesofílicas y termofílicas, y se están creando nuevas tecnologías en ciertas áreas – como lecherías y queserías – para poder aprovechar de mejor forma los sueros provenientes de éstas áreas, tales como el lactosuero. Todo esto muestra que existe una política gubernamental que busca fomentar el uso de energías renovables que permitan utilizar los residuos que se dan en diferentes partes del país, y aunque también se están explorando biorreactores a una menor escala, todavía falta para desarrollar digestores que cumplan con las necesidades energéticas de los pobladores rurales.

El primer paso para poder tener un sistema que funcione correctamente en condiciones de invierno y verano en climas como los de la zona sur de Chile, es trabajar con biorreactores que puedan operar en una temperatura de rango mesofílico y también entre el rango mesofílico y psicofílico (20-25°C). Esto permitirá estudiar la capacidad de adaptación de

las bacterias a una disminución de temperatura, permitiendo que el biorreactor de biogás tenga una producción durante todo el año.

Para lograr esto, se plantea como hipótesis que la producción de metano se mantiene con una disminución de la temperatura de forma gradual, que permite una adaptación del espectro bacteriano y logra un consumo sostenido en el tiempo.

#### **4.6.Lactosuero**

Dentro del área de productos lácteos, las empresas de leche y queso son las que han implementado en mayor escala este tipo de tecnología. En 2016 instalaron una planta de biogás con una capacidad de 400 KW de producción de energía eléctrica, sobre todo en la región de Los Lagos (INDAP, 2018).

La razón por la que estas áreas están buscando opciones de manejo de residuos, es porque el proceso de fabricación del queso, por ejemplo, es altamente ineficiente en cuanto a residuos. Estudios muestran que el 90% de la leche utilizada en esa industria es eliminada como lactosuero, lo que se traduce en que para producir un 1 kg de queso se tengan 9 kg de residuos (Araujo G., Monsalve C., & Quintero T., 2013).

Si bien hoy en día existen aplicaciones alternativas para evitar que el residuo contamine el medioambiente, tales como destilados y añadidos en la industria del pan, la composición del lactosuero contiene en promedio entre un 47 y un 49% de lactosa, la cual tiene una capacidad importante para el uso en biorreactores de biogás.

Con lo expuesto anteriormente, se ve que existen aplicaciones actuales de la producción de biogás en la industria, pero esto aún puede mejorar y abarcar un rango más amplio de

opciones de descontaminación, de modo que su uso se masifique en pequeña escala. Sin embargo, dado el alcance que tiene este trabajo, y considerando lo visto en la literatura, se hará un enfoque principal en sustratos que sirvan como ejemplo de elementos de materia orgánica y elementos del área láctea. Los tipos de sustratos a evaluar y sus consideraciones se detallan a continuación.

#### **4.7.Consideraciones respecto al tipo de sustrato**

##### **4.7.1. Glucosa**

La glucosa es un monosacárido, que se encuentra comúnmente en elementos asociados a un sabor dulce o contenido de azúcar, tales como frutas y miel, entre otros. También se conoce por ser la molécula estándar de generación de energía por glucólisis o glicólisis, utilizando oxígeno (Kumari, 2018). No obstante, también es posible obtener energía en procesos anaeróbicos vía glicólisis anaeróbica (Harris & Johnson, 2013).

Debido a lo anterior, la glucosa se ocupa directamente como sustrato, o aparece producto de la hidrólisis de moléculas más complejas, como celulosa. También, puede utilizarse como co-sustrato en conjunto con otras moléculas, como ácidos grasos, debido a que se metaboliza fácilmente en el proceso de digestión en un proceso de glicólisis anaeróbica (Sawasdee, Haosagul, & Pisutpaisal, 2019).

##### **4.7.2. Celulosa**

La celulosa, de composición química  $C_6H_{10}O_5$  es un carbohidrato comúnmente asociado a la madera y a elementos vegetales. En su hidrólisis se produce glucosa, pero dada su

composición de una cadena polimérica, su digestión es más difícil que la de otros monómeros de azúcar (Buffiere, Loisel, Bernet, & Delgenes, 2006).

Pese a lo anterior, el uso de celulosa es amplio, y esto se debe principalmente a que se toma la celulosa como representación de cultivos, desechos agrícolas y municipales (Angelidaki, Alves, Bolzonella, Borzacconi, & Campos, 2009).

Para poder incluir un sustrato que abarque a las áreas mencionadas en el párrafo anterior, en este experimento se incluirá la celulosa como sustrato.

#### **4.7.3. Lactosa**

La lactosa es un carbohidrato de fórmula química  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , el cual se encuentra presente en diversos productos alimenticios, principalmente dentro de la industria láctea. Está presente en también en residuos lácteos y se usa en la generación de biogás, debido a que es un carbohidrato soluble que puede ser digerido casi totalmente en digestión anaerobia (Vidal, Carvalho, Méndez, & Lema, 2000), que además se puede degradar en todas las etapas del proceso y es digerido rápidamente por las bacterias (Demirel, Yenigun, & Onay, 2005).

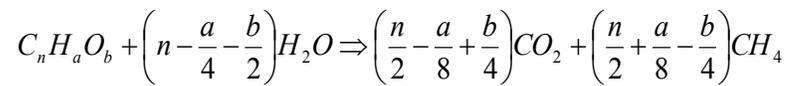
Considerando lo anterior, se elige como uno de los sustratos que serán utilizados en el experimento, en conjunto con la celulosa.

### **4.8. Producción teórica de biogás**

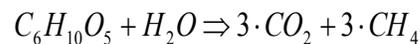
#### **4.8.1. Producción considerando ecuación de sustrato**

Para poder interpretar correctamente los resultados obtenidos es necesario tener una estimación de cuánto es la cantidad que se producirá de biogás. Esto está sujeto a diversos

factores como composición de sustrato, temperatura y otros (Angelidaki, Alves, Bolzonella, Borzacconi, & Campos, 2009), sin embargo, existen aproximaciones aceptadas como válidas que se ocupan recurrentemente. Tal es el caso de la ecuación de McCarty (McCarty, 1964), donde la producción de metano y CO<sub>2</sub> se calcula en función de la composición del carbohidrato base, como se ve en la siguiente ecuación de la Figura:



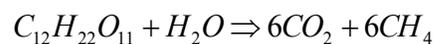
Así, reemplazando los valores para la Celulosa (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), se tiene:



Lo anterior muestra que con un mol de celulosa se pueden producir 3 moles de dióxido de carbono y 3 moles de metano. Considerando que el sustrato que se añadirá a los biorreactores tiene un valor de 0,4 gramos, y que el peso molecular de la celulosa es de 162,1 g/mol, se tiene que en la reacción actual hay 0,0025 moles de celulosa, lo que implica que son 0,0075 moles de CO<sub>2</sub> y 0,0075 moles de CH<sub>4</sub>. Luego, considerando que el peso molecular del metano es de 16 g/mol y del dióxido de carbono es 44 g/mol, se obtiene que la producción será de 0,118 g de CH<sub>4</sub> y 0,326 g de CO<sub>2</sub>.

De forma equivalente para el volumen, se obtiene que para el CH<sub>4</sub> su volumen teórico de producción será de 82,5 ml, mientras que el de CO<sub>2</sub> es el mismo valor.

Por otra parte, considerando ahora el caso de la Lactosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) se obtiene:



En este caso la producción de biogás por mol de lactosa es más alta. El peso molecular de la lactosa es de 342,3 g/mol, y considerando que por cada biorreactor se van a añadir 0,4

g, se tiene que hay 0,0012 moles de lactosa. Así, se producen 0,0072 moles de metano y de dióxido de carbono, lo que implica que hay en la producción final 0,3168 gramos de CO<sub>2</sub> y 0,1152 gramos de CH<sub>4</sub>.

Aplicando también en el caso de la lactosa las ecuaciones de densidad, se obtiene un volumen teórico de metano de 78,4 ml y de dióxido de carbono de 78,5 ml.

#### **4.8.2. Producción considerando Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

Otra forma de calcular la producción de metano es utilizando la demanda química de oxígeno o DQO.

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) o Chemical Oxygen Demand (COD), consiste en la cantidad de un oxidante que reacciona con una muestra, bajo condiciones controladas (Association, American Public Health, 2017). De acuerdo a la literatura (Pearse, Hettiaratchi, & Kumar, 2018) se tiene que en condiciones estándar de temperatura y presión, se producen 350 ml de CH<sub>4</sub> por cada gramo de DQO.

#### **4.8.3. Cálculo de producción teórica en el tiempo, por día**

De acuerdo a la literatura (Angelidaki, 2009), tomando como base un modelo de primer orden para la hidrólisis, es posible obtener la producción de metano para un tiempo dado  $t$ , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{B_{\infty} - B}{B_{\infty}} = -k_h t$$

Donde  $B_{\infty}$  corresponde a la producción última de metano y  $B$  a la producción, en ml, para tiempo dado  $t$ . Esto permitirá obtener el valor de la constante de hidrólisis  $k_h$  y con ello trazar la curva de producción acumulada de biogás.

En caso de que no se posea el valor de la producción última de metano, se hará una aproximación de su valor y se contrastará con los datos para poder obtener una curva, que es de la forma de una exponencial como la que sigue:

$$B = B_{\infty} \cdot (1 - e^{-k_h \cdot t})$$

#### **4.9. Consideraciones adicionales**

La siguiente sección se basa en información obtenida en la Guía de Producción de Biogás (GIZ, 2010).

Como datos adicionales a tener en consideración para la realización del experimento, es ideal que el sustrato tenga una baja cantidad de componentes con azufre para evitar la generación de  $H_2S$  en el sistema, pues concentraciones sobre 50 mg/l provocan inhibición de la producción de metano. También hay que recordar que las bacterias metanogénicas son estrictamente anaerobias, y si bien el espectro bacteriano de las otras etapas, como la acetogénica, es capaz de tener un consumo de oxígeno y permitir que exista en el ambiente, se ha estudiado que una composición por sobre 0,1 mg/l de  $O_2$  provoca una inhibición de las bacterias mencionadas.

Otros elementos a considerar son los ácidos grasos volátiles, que comienzan a provocar problemas en el sistema cuando sobrepasan los 2000 mg/l, el amoníaco al tener cantidades

mayores a 2500 mg/l, y por último metales como el cobre, zinc y circonio, con concentraciones inhibitorias de 50 mg, 150 y 100 mg, respectivamente.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

El proceso de montaje y producción del experimento está basado en protocolos de ensayos BMP que permiten comparar los resultados obtenidos con otras investigaciones. El primer protocolo considerado es de Angelidaki (2009), el cual consiste en un protocolo para definir el potencial de biometano en ensayos Batch (Angelidaki, Alves, Bolzonella, Borzacconi, & Campos, 2009) y una adaptación del protocolos anteriores (Labatut, 2011). Hay que notar que esto se utilizará en el principio del proceso, y que luego se adaptarán a las condiciones planteadas en esta tesis.

Se utilizaron 6 biorreactores de 100 ml empleando una solución *stock* basada en digestato obtenido de la planta de Farellones de Aguas Andinas, caracterizado en la sección 5.1.1. Se empleó lactosa (3 biorreactores) y celulosa (3 biorreactores) como fuentes de carbono. Los biorreactores fueron incubados inicialmente a 30°C y desde el 28 de febrero, y se operaron a esa temperatura en modo Batch por 25 días. Luego de ese periodo, se redujo la temperatura de incubación hasta 22°C por 10 días más. Previo a los experimentos se realizó la aclimatación del inóculo empleado durante 2 meses.

Cada dos días se cuantificará el volumen de gas generado y su composición en metano y dióxido de carbono.

### **5.1.Descripción del funcionamiento de los biorreactores y nutrientes**

#### **5.1.1. Inóculo**

Las bacterias a utilizar corresponden a las bacterias del digestato del biorreactor disponible en Aguas Andinas, en el sector de Farellones. La muestra utilizada en la solución stock

fue un inóculo proveniente de 1 L de digestato, el cual fue caracterizado, donde se obtuvieron los datos de la Tabla 5-1:

**Tabla 5-1: Caracterización del inóculo utilizado.**

Nombre muestra	ST g/L	ST %	SV g/L	SV %	SF g/L	SF %
<b>Lodos de digestor (Planta La Farfana)</b>	28,91	2,89	18,52	1,85	10,39	1,04
	30,08	3,01	19,37	1,94	10,71	1,07

Además de lo anterior, se obtuvieron mediciones para la Demanda Química de Oxígeno (DQO o COD, por sus siglas en inglés), en donde se obtiene que la media es 5,645 mgO<sub>2</sub>/gSustrato.

### 5.1.2. Solución Stock

Para la preparación de la solución stock se tuvo en consideración la lista el documento Preparación de un Medio (Labatut, 2011). Los únicos reactivos que no se agregaron debido a falta de disponibilidad fueron Na<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> y Resazurina, mientras que el resto se muestra en la Tabla 5-2. Hay que considerar también que el bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) se agregó de forma sólida en cada biorreactor, por lo que es la única cantidad que está medida en mg.

**Tabla 5-2: Contenido del medio basal para biorreactores de biogás. Adaptado de “Preparation of defined media” (Labatut, 2011).**

Medio Basal	Concentración (mg/L)
NH <sub>4</sub> Cl	200
KCl	100

MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	600
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	138
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	176
<b>Vitaminas</b>	
Levadura	100
<b>Trazas</b>	
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	200
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	4
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10
ZnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,5
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	100
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,5
KI	10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5
<b>Otros</b>	
Na <sub>2</sub> S 9H <sub>2</sub> O	100
NaHCO <sub>3</sub>	48 mg (sólido)

Para la preparación del medio, se utilizó una solución 5X concentrada, que consiste en tener 5 veces la concentración estándar definida en el protocolo. Esto se hace para que al agregar la solución stock al biorreactor, diluirla con agua y mezclarla con el inóculo, la concentración final sea la correcta.

Antes de crear la solución final, se crearon 2 soluciones previas: la primera (A), cuya composición se muestra en la Tabla 5-3, consiste en una solución que incluye todos los elementos con una concentración original mayor a 1 mg/L. Esta solución fue hecha en una concentración 5X directamente, para lo cual se agregó la cantidad necesaria para tener esa concentración en un recipiente de 1 litro, el cual fue llenado con 500,97 ml de agua destilada, donde luego se agregaron los reactivos.

Tabla 5-3: Medio basal utilizado en Solución A.

Medio Basal	Concentración (mg/L)	5X (mg en 1L)	5X exp. (mg)
NH <sub>4</sub> Cl	200	1000	1006,1
KCl	100	500	516,9
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	600	3000	3018
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	138	690	699
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	176	880	887
<b>Vitaminas</b>		0	
Levadura	100	500	507
<b>Trazas</b>		0	
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	200	1000	1002
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	4	20	21,6
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10	50	50,6
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10	50	50,8
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	100	500	50,7
KI	10	50	51,1
<b>Otros</b>			
Na <sub>2</sub> S 9H <sub>2</sub> O	100	500	509,7

Posteriormente se realizó una segunda solución *stock* (B), mostrada en la Tabla 5-4, con los elementos con una concentración menor a 1 mg/L. Esta solución se realizó con una concentración 100X, en un nuevo recipiente de 1 litro, debido a que por temas de operación era muy difícil obtener cantidades exactas de los reactivos en cantidades más pequeñas.

Se comenzó con 500 ml de agua destilada y luego de agregar los reactivos se llenó el frasco hasta los 1003 ml, con lo que se logró la concentración de 100X, quedando lista para poder determinar la cantidad necesaria para agregar a la otra solución.

Tabla 5-4: Medio basal utilizado en Solución B.

Medio Basal	Concentración (mg/L)	100X (mg en 1L)	100X exp. (mg)
ZnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,5	50	49,7

Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,1	10	10,5
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,5	50	50,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5	50	51,3

Así, se añadieron 50 ml (con un error de 0,05 ml) de la solución B a la solución A, para que los elementos se diluyeran 20 veces con respecto a la solución 100X, quedando en 5X igual que el resto, al terminar el proceso. Finalmente la solución A se completó con agua destilada hasta alcanzar 1000 ml de solución.

### 5.1.3. Bicarbonato de sodio

El bicarbonato de sodio se agregó de forma sólida en cada biorreactor, por lo cual fue necesario medir 48 mg para cada biorreactor. Los valores se muestran en la Tabla 5-5.

**Tabla 5-5: Valores medidos de bicarbonato de sodio, para cada biorreactor.**

Bicarbonato	Estándar (mg)	Experimental (mg)
R <sub>1</sub>	48	48,1
R <sub>2</sub>	48	49,4
R <sub>3</sub>	48	49,7
R <sub>4</sub>	48	50,9
R <sub>5</sub>	48	48,2
R <sub>6</sub>	48	48,7

### 5.2. Descripción de condiciones de operación fijas y variables

Se mantendrán las condiciones fijas en cada biorreactor. Se trabajará en biorreactores Batch y solo se agitarán una vez al día, para evitar la aglomeración de ácidos y compuestos en gradientes dentro del biorreactor.

Se harán 2 mediciones a 30 grados y 3 mediciones a 22°C. Así, para 6 de los biorreactores se tendrá una temperatura de operación de 30 grados, que posteriormente se disminuirá a 22° C. Para asegurar la temperatura constante en cada caso, se utilizará una estufa donde se puede fijar la temperatura, y cuando se transporten los biorreactores para sus mediciones se utilizará un cooler con un elemento cálido para mantener las condiciones en el tiempo de movimiento.

### 5.3.Preparación de sustrato

Para el caso de la celulosa, se utilizará el reactivo proveniente de Sigma Aldrich, convencional. Lo mismo con la Lactosa, que se utilizará como sustrato para ejemplificar a un lactosuero. Cada uno de los biorreactores contará con 0,4 g de sustrato, el cual consistirá en lactosa si corresponde a uno de los primeros 3 biorreactores (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>), mientras que los 3 restantes poseerán celulosa.

Durante el montaje experimental se obtuvieron las siguientes medidas de sustrato, por cada biorreactor:

**Tabla 5-6: Mediciones de Lactosa y Celulosa, por cada biorreactor.**

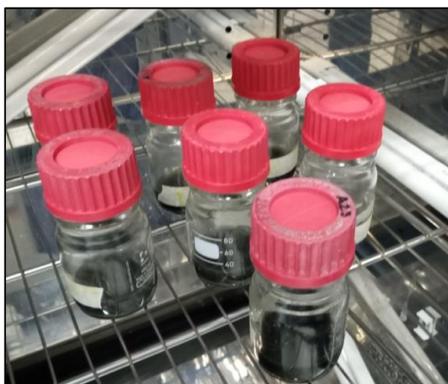
Reactor	Lactosa (g)	Celulosa (g)
Estándar	0,4	0,4
R <sub>1</sub>	0,4049	-
R <sub>2</sub>	0,4027	-
R <sub>3</sub>	0,4027	-
R <sub>4</sub>	-	0,4032
R <sub>5</sub>	-	0,4030
R <sub>6</sub>	-	0,4013

#### 5.4.Montaje

Una vez que se tiene el inóculo, la solución stock, el bicarbonato de sodio y el sustrato, se puede realizar el montaje de los biorreactores. Cada uno de ellos se monta en un frasco de 100 ml, en el cual se llenará el 20% del espacio total con reactivos y mezclas sólidas y líquidas, lo que da un volumen total de llenado de 20 ml.

Así, es necesario agregar 4,4 ml de inóculo, 4 ml de solución stock y 11,6 ml de agua. Esto genera el volumen deseado y además permite que los elementos de la solución stock queden en su concentración normal. Luego de agregar las 3 partes líquidas se añaden el sustrato y el bicarbonato de sodio en las cantidades definidas.

Una vez terminado el proceso, es necesario inyectar gas  $N_2$  en cada frasco, con el fin de desplazar el aire que hay dentro y crear condiciones anaerobias. Se somete el frasco semi-tapado a un flujo de  $N_2$  durante 10 minutos, para luego ser sellado definitivamente con una tapa de goma y una tapa normal. Finalmente, se dejan en una estufa a  $30^\circ C$ .



**Figura 5-1: Montaje biorreactores de biogás. El séptimo biorreactor, que aparece adelante en la foto, fue descartado.**

Las fotos del montaje se muestran en la Figura 5-1, mientras que en la Figura 5-2 se ve uno de los biorreactores de celulosa. Al inicio del experimento, todos los biorreactores tenían la mezcla del mismo color.



**Figura 5-2: Biorreactor R<sub>5</sub>, con celulosa como sustrato.**

### **5.5. Sistema de medición y toma de muestras**

Las tapas de goma de los biorreactores, permiten que se puedan tomar mediciones en éste utilizando una jeringa cromatográfica. Sin embargo, puede haber flujo de gas por los orificios que quedan después de cada medición, lo que debe considerarse sobre todo al pensar en los elementos más pequeños.

Por otra parte, es necesario hacer mediciones correctas que permitan validar los datos, por lo que se tendrán las siguientes consideraciones:

- Los biorreactores consisten en triplicados. Aunque son 6 biorreactores, en el fondo son 2 experimentos llevados a cabo en triplicado, para que los resultados tengan validez.
- Se realizarán al menos 3 mediciones por cada biorreactor, para así poder establecer una tendencia, dependiendo del caso.
- Se realizarán mediciones con distintos métodos, para complementar la información.

En particular, para este experimento se utilizará Cromatografía de Gases (GC, por sus siglas en inglés) donde utilizando una jeringa cromatográfica, se tomará una muestra de 100 micro litros de gas, se obtendrán porcentajes de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y aire, y se medirá el volumen de Biogás utilizando una trampa de NaOH, para aproximar la cantidad de metano que hay en ml.

## 6. RESULTADOS

Se emplearon 6 biorreactores, tres de ellos operados con Lactosa como sustrato orgánico (concentración inicial de 0,4 gr) (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>) y tres con Celulosa (concentración inicial de 0,4 gr) (R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>), ambos de polvo seco. En la Figura 6-1 se muestra la diferencia visual entre los biorreactores con lactosa, de un color más claro, de aquellos con celulosa de un color más oscuro. En la sección Anexos se muestran imágenes adicionales.



**Figura 6-1: Biorreactor R<sub>1</sub> (lactosa) al lado del biorreactor R<sub>4</sub> (celulosa).**

El experimento comenzó el 28 de febrero y los muestreos fueron realizados cada 2 o 3 días, a partir del día 25 de marzo. El experimento se extendió durante 37 días corridos. Los muestreos consistieron en medición de volumen de biogás para cada biorreactor, en mililitros, determinación cromatográfica de los gases constitutivos (metano, dióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno). Los resultados se muestran en las secciones a

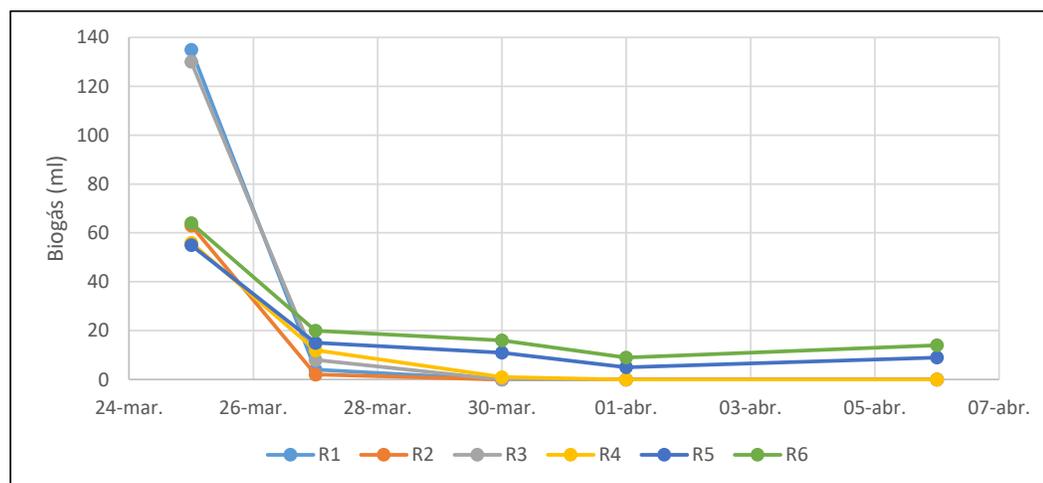
continuación. Se realizaron 2 mediciones a una temperatura de 30°C (25 y 27 de marzo), y 3 mediciones a 22 °C (30 de marzo, 01 y 06 de abril), cuidando que el sistema no limitase por sustratos ni nutrientes.

### 6.1. Producción de biogás

A continuación se muestran los datos obtenidos para las mediciones de biogás en cada biorreactor, en ml.

**Tabla 6-1: Mediciones de biogás (ml) en cada biorreactor, por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25-mar	135	63	130	56	55	64
27-mar	4	2	8	12	15	20
30-mar	0	0	0	1	11	16
01-abr	0	0	0	0	5	9
06-abr	0	0	0	0	9	14

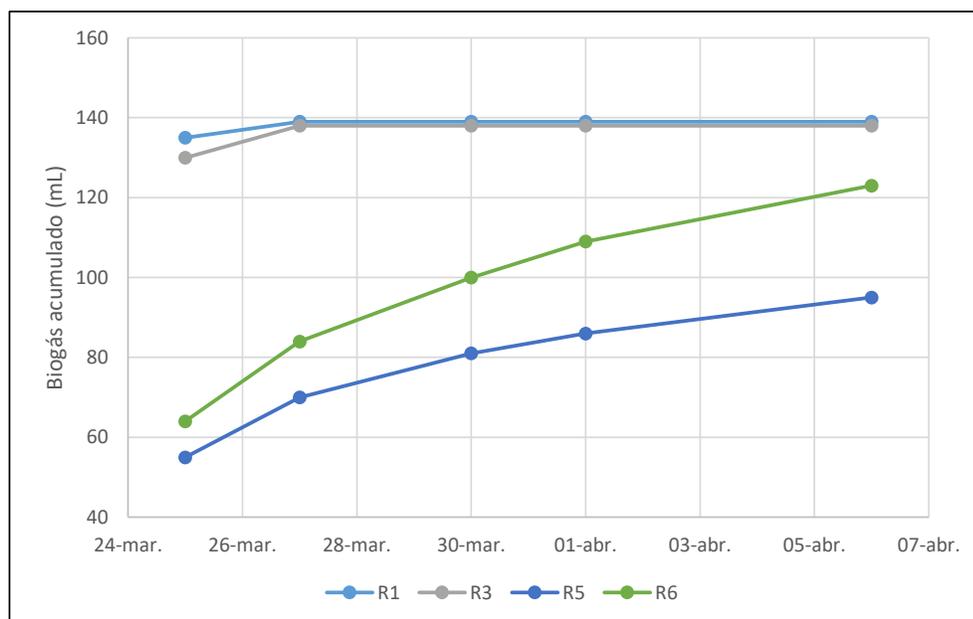


**Figura 6-2: Biogás obtenido (ml) por día de medición.**

En el gráfico siguiente de la Figura 6-3, se muestran los resultados acumulados de las mediciones de biogás. Esto permite una visión más clara de la producción total, y también observar lo que ocurrió en los distintos días de medición, aunque debido a que los biorreactores R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> presentaron una producción mucho menor que los demás, se omitieron intencionalmente en este gráfico. Los valores totales se muestran en la Tabla 6-2.

**Tabla 6-2: Mediciones de biogás acumulado (ml), por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25-mar	135	63	130	56	55	64
27-mar	139	65	138	68	70	84
30-mar	139	65	138	69	81	100
01-abr	139	65	138	69	86	109
06-abr	139	65	138	69	95	123



**Figura 6-3: Biogás acumulado (ml) por día de medición.**

## 6.2. Cromatografía de gases

A continuación se muestran los resultados de las mediciones hechas en cromatografía de gases (GC) en donde se midió la concentración de “aire” ( $N_2$  ya que el sistema fue sellado en condiciones anaerobias), metano ( $CH_4$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Los porcentajes en conjunto dan una suma cercana a 100, y lo restante corresponde a elementos trazas. En la Figura 6-4, se muestra un gráfico con todos los valores de la cromatografía de gases.



**Figura 6-4: Resultado GC medido en porcentajes de  $N_2$ ,  $CH_4$  y  $CO_2$ . La diferencia porcentual se completó con elementos trazas.**

### 6.2.1. Nitrógeno

El experimento debe llevarse a cabo en condiciones anaerobias para obtener las condiciones idóneas de producción. Para esto, se realizó una inyección de gas N<sub>2</sub> durante el montaje de los biorreactores para reducir el porcentaje de oxígeno la cual duró 10 minutos para obtener condiciones anaeróbicas. Se asume que esto se cumple y por lo tanto los datos de aire corresponden a datos de N<sub>2</sub>, ya que si el sistema tuviera esa cantidad de aire (oxígeno) no se hubiera conseguido producción de metano debido a la naturaleza de las bacterias metanogénicas.

Por otra parte, la concentración de oxígeno inhibitoria es sobre 0,1 mg/l (GIZ, 2010), por lo que debe ser considerado en la discusión de los resultados.

A continuación, se muestra la Tabla 6-3 con los valores obtenidos de porcentajes de aire para cada biorreactor.

**Tabla 6-3: Porcentajes de N<sub>2</sub> presentes en cada biorreactor (%), por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25-mar	35,341	44,547	45,039	62,704	63,943	52,607
27-mar	45,597	47,205	44,457	57,005	55,014	50,222
30-mar	44,500	44,051	43,716	58,107	40,107	42,654
01-abr	45,860	40,045	48,538	46,119	45,515	38,685
06-abr	44,067	45,224	43,553	40,722	36,681	33,142

### 6.2.2. Metano

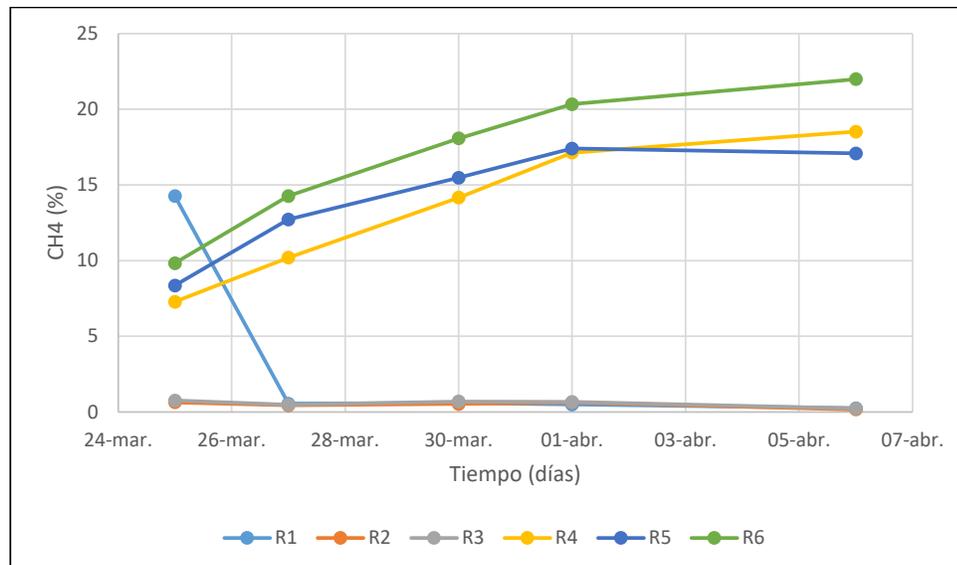
El Metano es el componente fundamental de las mediciones, y su cantidad producida permite obtener una idea de hasta cuándo se produjo biogás. Este dato debe ser

complementado también con la cantidad de CO<sub>2</sub> producida, que se verá en la Sección 6.2.3.

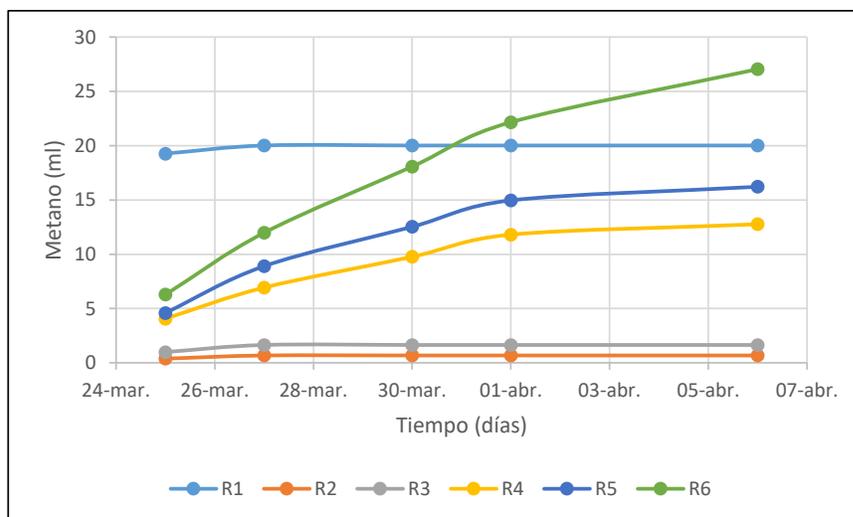
A continuación se muestran los valores de metano obtenidos: primero se muestran los porcentajes de metano obtenidos de la cromatografía de gases por cada día de medición, donde se ve también la temperatura a la cual se encontraba cada sistema. Luego, se muestra un gráfico que muestra los datos y, posteriormente se muestra un gráfico con el volumen en ml de metano acumulado por día de medición. Para éste cálculo se consideró el porcentaje de CH<sub>4</sub> experimental de la cromatografía de gases y se complementó con los datos obtenidos de volumen de biogás.

**Tabla 6-4: Porcentajes de metano presentes en cada biorreactor (%), por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	T(°C)
25-mar	14,266	0,635	0,756	7,272	8,355	9,826	30
27-mar	0,546	0,433	0,475	10,195	12,720	14,267	30
30-mar	0,595	0,532	0,689	14,159	15,473	18,076	22
01-abr	0,496	0,635	0,663	17,124	17,407	20,332	22
06-abr	0,245	0,162	0,226	18,514	17,079	21,987	22



**Figura 6-5: Porcentaje de metano (%) en cada biorreactor, por día de medición.**



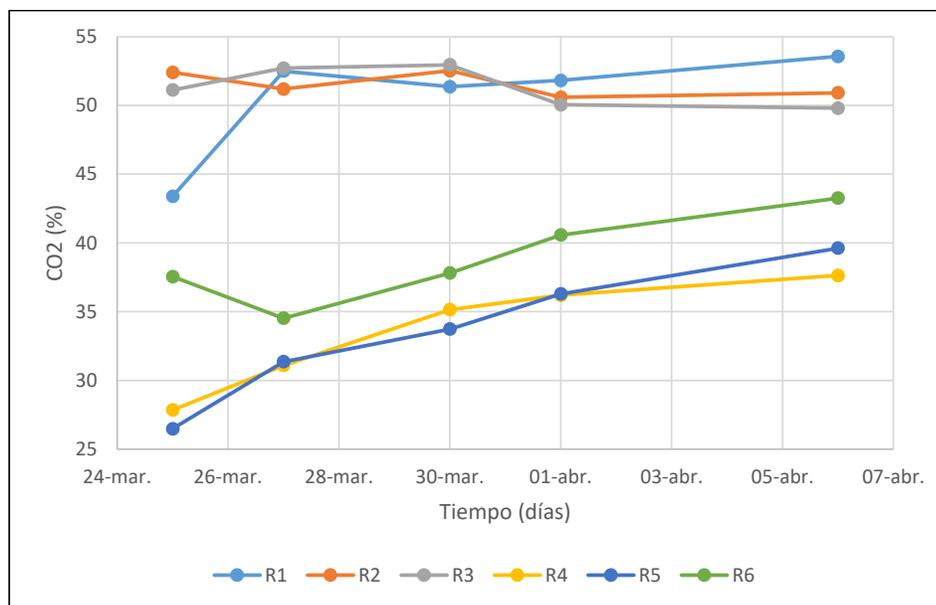
**Figura 6-6: Volumen de CH<sub>4</sub> acumulado, por día de medición.**

### 6.2.3. Dióxido de Carbono

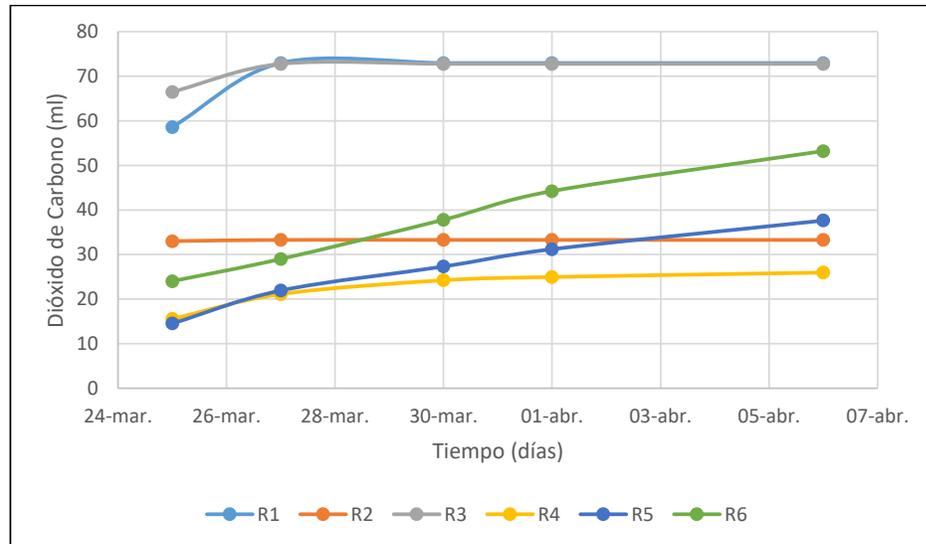
El Dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ) es el segundo con mayor presencia en el biogás, debido a que es un compuesto que aparece como producto en varias etapas del proceso de digestión anaeróbica. La Tabla 6-5 y el gráfico en la Figura 6-7 muestran los valores obtenidos para cada medición, mientras que la Figura 6-8 muestra el volumen en ml por día de medición.

**Tabla 6-5: Porcentajes de  $\text{CO}_2$  presentes en cada biorreactor (%), por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25-mar	43,385	52,393	51,122	27,853	26,483	37,548
27-mar	52,485	51,186	52,703	31,094	31,360	34,523
30-mar	51,358	52,518	52,952	35,150	33,733	37,805
01-abr	51,810	50,592	50,042	36,197	36,288	40,571
06-abr	53,556	50,912	49,796	37,637	39,614	43,256



**Figura 6-7: Porcentaje de  $\text{CO}_2$  (%) en cada biorreactor, por día de medición.**



**Figura 6-8: Volumen de CO<sub>2</sub>, por día de medición.**

## 7. DISCUSIÓN

A continuación se analizarán los resultados obtenidos en la Sección 6, y se agregarán algunas relaciones entre ellos que permitan interpretarlos de forma correcta.

### 7.1. Análisis de producción de biogás

Para poder hacer un correcto análisis de los resultados, es necesario hacer una división entre los biorreactores de lactosa y los biorreactores de celulosa como sustrato, por lo que los gráficos siguientes estarán separados. Primero se hará un análisis con respecto al biogás obtenido y sus porcentajes relativos, y luego un análisis en base al volumen de metano y dióxido de carbono en específico.

#### 7.1.1. Biorreactores con sustrato Lactosa

Los valores de los biorreactores de Lactosa se muestran en la Tabla 7-1, en donde se muestra el valor en ml medido por día y al final el total acumulado.

**Tabla 7-1: Producción de biogás (ml) en biorreactores con Lactosa.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Temperatura (°C)
25-mar	135	63	130	30
27-mar	4	2	8	30
30-mar	0	0	0	22
01-abr	0	0	0	22
06-abr	0	0	0	22
TOTAL	139	65	138	

De los resultados se puede ver que los biorreactores R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> presentaron valores similares de producción, la cual se acercó a un total de 140 ml de biogás. También se ve que el biorreactor R<sub>2</sub> presentó una producción considerablemente más baja, la cual fue

aproximadamente de la mitad de los casos anteriores. Esto se debe a factores de error que pueden existir en el montaje del proceso, pero dado que el experimento fue hecho en triplicado, se asume que los biorreactores 1 y 3 representan el crecimiento normal de producción.

Por otra parte, se puede ver que en los tres casos la producción de biogás casi no aumentó durante los últimos días, llegando incluso a 0 en las últimas mediciones. Esto ocurre porque las mediciones comenzaron en el día 26, por lo que el sistema alcanzó el máximo volumen con CO<sub>2</sub> y solo se observaron aumentos marginales de biogás, en comparación con la producción de días anteriores que llegó a tener un promedio de 5,19 ml de biogás producidos por día, hasta el día 26. El promedio, sin embargo, disminuye a 3,65 ml diarios, considerando los 38 días de medición. Lo anterior muestra que hubo una inhibición casi total de la metanogénesis antes de realizar la variación de temperatura.

Un dato importante a considerar es que aunque no se ve producción de metano, estudios muestran que sigue existiendo presencia de bacterias metanógenas en el sistema. Esto se ve en el documento: *“Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments”* en el que también se realizó una medición con lactosa (Wagner, Lins, Malin, Reitschuler, & Illmer, 2013). Esto refuerza la idea de que la lactosa funcionó en el sistema correctamente, pero que en las últimas mediciones hubo inhibición de biogás. Finalmente, para poder corroborar que las bacterias pueden adaptarse en sistemas donde el sustrato es lactosa, se necesitan estudios adicionales, aunque dado que el espectro bacteriano y el inóculo es el

mismo en el caso de los biorreactores con lactosa y celulosa, es razonable pensar que el sistema funcionará correctamente si la cantidad de sustrato es mayor.

### 7.1.2. Celulosa

La Celulosa es un sustrato usado comúnmente, y sus resultados se muestran en la Tabla 7-2. Los valores de los 3 biorreactores se encontraban en valores de producción total de  $60 \pm 5$  ml, y su producción seguía en alza en el día 27 de marzo (segunda medición). Sin embargo, cuando se disminuyó la temperatura a 22 grados Celsius, el sistema pudo adaptarse a la nueva temperatura y mantener una producción creciente, aunque con una pendiente más baja que en el segmento anterior.

**Tabla 7-2: Producción de biogás (ml) en biorreactores con Celulosa.**

Días medición	R4	R5	R6	Temperatura (°C)
25-mar	56	55	64	30
27-mar	12	15	20	30
30-mar	1	11	16	22
01-abr	0	5	9	22
06-abr	0	9	14	22
TOTAL	69	95	123	

La adaptación del sistema a la temperatura se ve en la última semana de medición, ya que se bien la producción comenzaba a crecer a una tasa menor, el sistema pudo mantener una producción pese a que la temperatura había disminuido y el experimento ya llevaba más de 30 días. Esto ocurre principalmente por 2 factores: primero la composición química de la Celulosa, que hace que sea una molécula que tome más tiempo en degradarse, lo que hizo que el proceso de producción en mayor escala comenzara más tarde y por ende se mantendrá más tiempo. En segundo lugar, como el sistema todavía tenía carga orgánica

suficiente, el sistema siguió en una operación regular (pese a la disminución de temperatura) solo que más lenta.

### **7.1.3. Comparación entre ambos tipos de biorreactor**

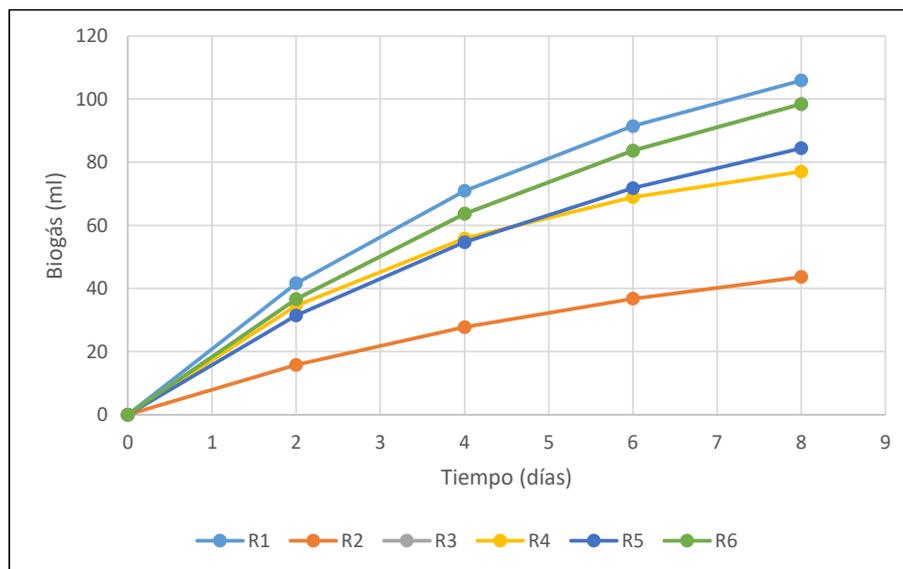
Aunque los 2 procesos de digestión anaeróbica (lactosa y celulosa) fueron realizados de forma independiente entre sí, comenzaron el mismo día y tuvieron la misma solución stock, cantidad de inóculo y de sustrato (lactosa o celulosa, dependiendo del caso), por ello, es posible comparar su comportamiento en el tiempo y al ser sometidos a variación de la temperatura ambiente en donde se encontraban los biorreactores.

Sin embargo, como la celulosa y la lactosa tienen distintos tiempos de digestión, y considerando la tasa de producción que hay en los biorreactores con lactosa es más alta al comienzo de las mediciones, es necesario hacer una extrapolación de lo que ocurrió en los primeros días, considerando que todos los biorreactores se comportan como sistemas de primer orden. Así, tomando la ecuación mencionada en el ítem 4.8.3, se toman como valores de  $B_{\infty}$  140, 65 y 140 ml, para  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ , respectivamente. Esto sumado al valor del día de las mediciones del 27 de marzo (día 28 de medición) permite obtener los valores de  $k_h$ , que corresponden a 0,128, 0,139 y 0,1517 para los biorreactores de lactosa y modelar la curva de producción, en cuyo final se asemeja a los datos obtenidos en las mediciones que se hicieron a 30 °C.

El caso de los biorreactores con celulosa se trata de forma distinta. Como no se tiene certeza de su valor final de producción de metano, es necesario estimarlo. Para ello, se consideran también los datos de medición posteriores a la disminución de temperatura y se asume que su producción llegará a un promedio de 20 ml más que el último valor

medido. Esto permite obtener valores de  $B_{\infty}$  de 90, 120 y 140 para los biorreactores  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$ , respectivamente.

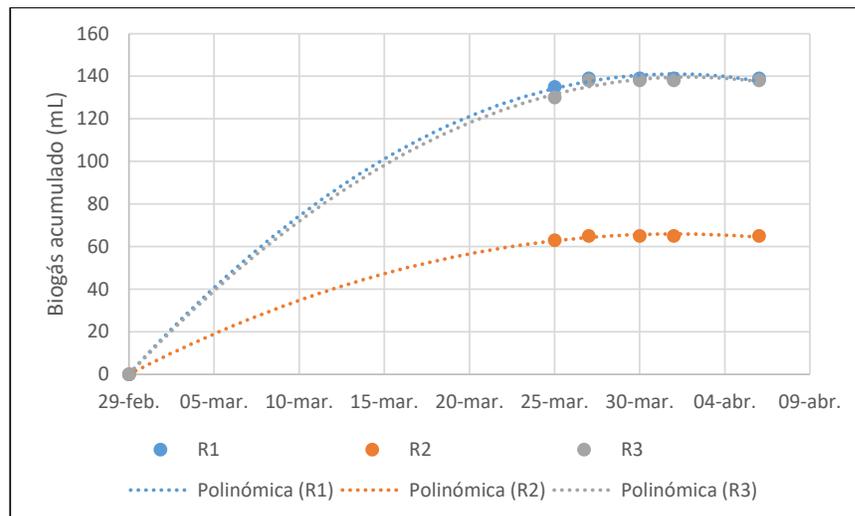
Finalmente, para poder hacer una comparación del comportamiento de ambos tipos de biorreactor se desplazan las curvas de celulosa en 20 días y se consideran los 8 primeros días de medición, lo que se ve en la Figura 7-1 (el biorreactor 3 se comporta similar al biorreactor 5, por lo que no se ve su curva):



**Figura 7-1: Extrapolación lineal producción de biogás (ml), cada 2 días desde el día 1, considerando producción acorde a función de primer orden.**

Como forma de corroborar lo anterior, se utiliza la herramienta de Microsoft Excel, en donde con la lista de datos se pueden generar curvas lineales, y polinomios, entre otras. Primero se intentó ajustar los datos experimentales de la producción de lactosa, pero debido a que su variación es muy pequeña durante 5 mediciones, fue necesario agregar un

punto inicial de valor 0, en el primer día de medición (29 de febrero). Se muestra en el gráfico de la Figura 7-2 el caso de las curvas ajustadas a un polinomio de grado 2, donde los puntos representan los datos, y las curvas las proyecciones:



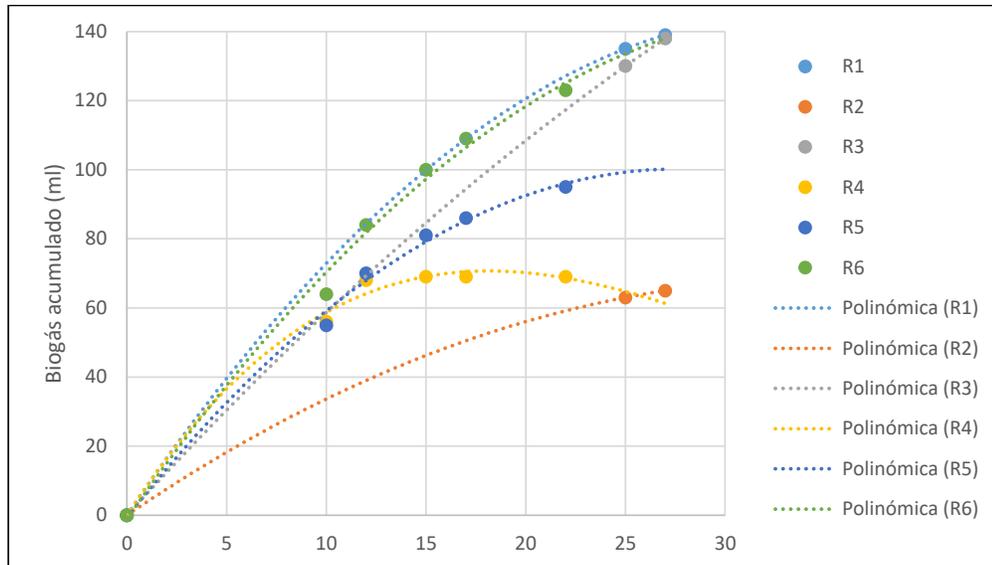
**Figura 7-2: Extrapolación de polinomios de grado 2 a la curva de producción acumulada de biogás, en biorreactores de Lactosa.**

Las curvas de celulosa, por su parte, también requirieron de una adición del valor de biogás producido en el primer día como punto de origen. En este caso, se tomaron como referencia los valores de las 2 primeras mediciones, para poder graficar la curva mientras el sistema estaba a 30 grados. Como se puede ver en la Figura 7-3, para que haya un correcto ajuste de la curva, se tiene que fijar el origen desde el día 18, con lo que desde el día 20 se tiene un ajuste deseado para los datos, lo cual muestra que antes del día 20 de marzo la producción de biogás en estos biorreactores fue muy poca, posiblemente menor a 20 ml.

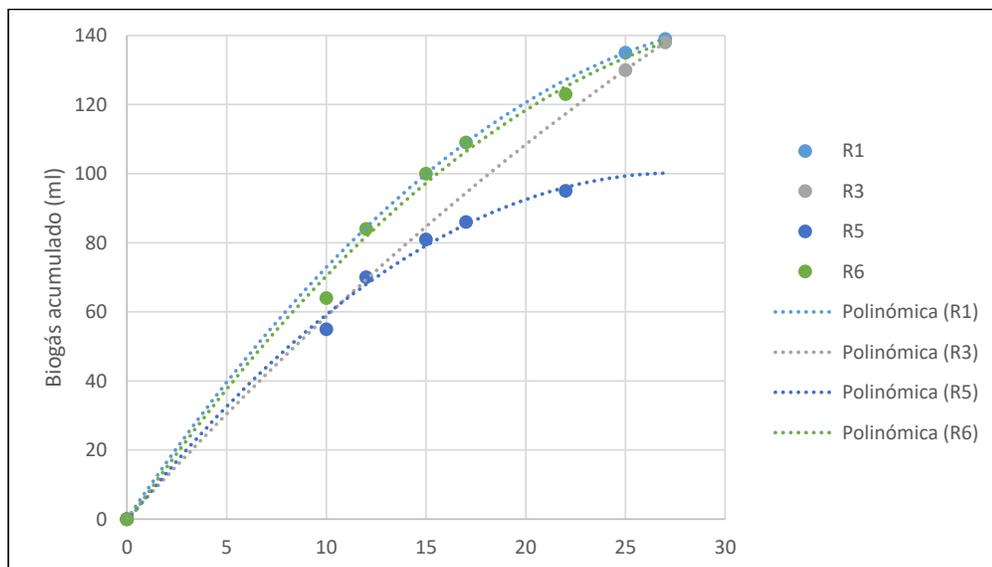


**Figura 7-3: Extrapolación de polinomios de grado 2 a la curva de producción acumulada de biogás, en biorreactores de Celulosa.**

Tomando los 2 gráficos anteriores, agregando los datos adicionales de las mediciones de celulosa y desplazando la curva de éstos en 15 días, se puede hacer una comparación entre los 2 tipos de experimento de forma global, donde se ve un comportamiento similar al observado teóricamente, lo que se muestra primero en la Figura 7-4. Luego, en la Figura 7-5 se muestra sin los biorreactores  $R_2$  y  $R_4$ , donde se puede observar un crecimiento similar en los biorreactores que no decayeron en el tiempo.

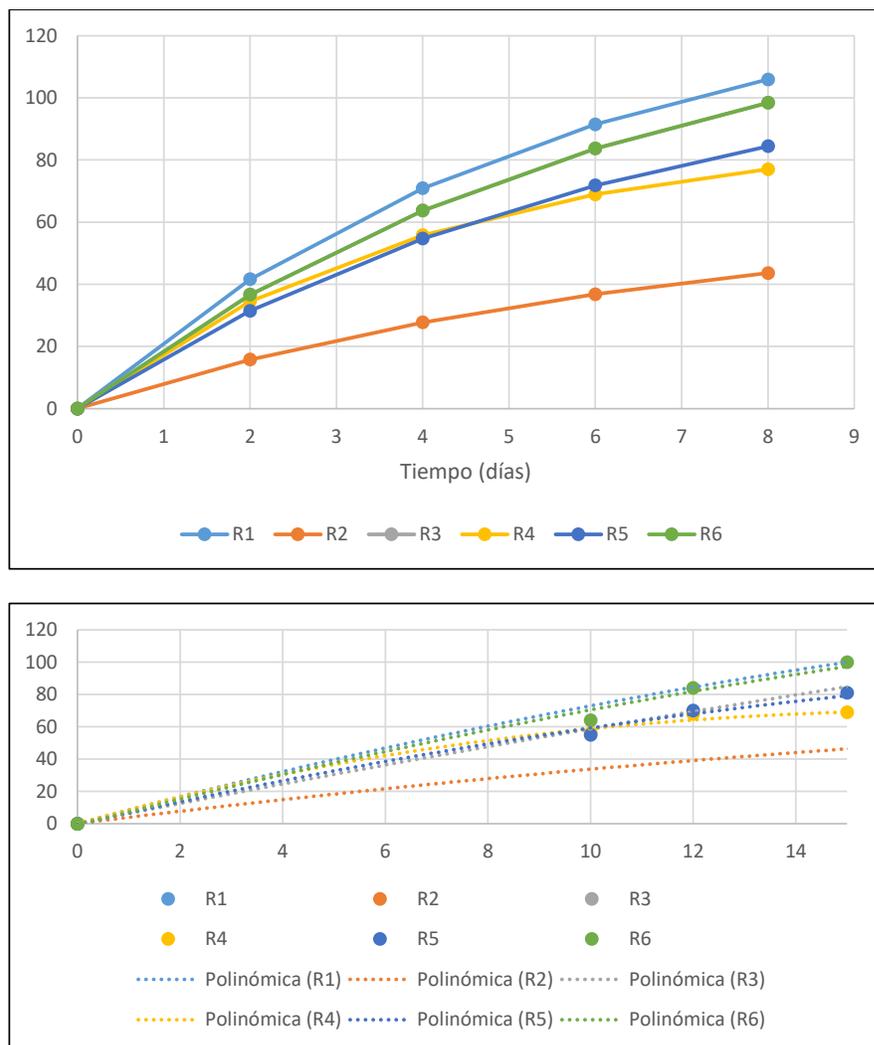


**Figura 7-4: Extrapolación de datos desde el inicio estimado de producción.**



**Figura 7-5: Extrapolación de datos desde el inicio estimado de producción de cada tipo de biorreactor, sin considerar a R2 y R4.**

Para ver en detalle el comportamiento inicial teórico y experimental de los primeros días, se muestran en la Figura 7-6 (a) y (b), respectivamente. En ellas se ve que los 2 tipos de sustratos pueden alcanzar una producción de biogás sostenida en el tiempo, lo que muestra que tanto la lactosa como la celulosa son sustratos útiles para generación de biogás.



**Figura 7-6: (a) Comportamiento inicial con extrapolación teórica, (b) comportamiento inicial con extrapolación basada en datos experimentales.**

De la producción anterior se ven también otros 2 fenómenos: en el primer caso, se vio que los biorreactores de lactosa habían mantenido una producción sostenida durante los primeros 25 días de medición. Sin embargo, los biorreactores fueron hechos en un recipiente de 100 ml, así que existe una barrera física de volumen que impide que el biorreactor se llene más. De esta forma es posible que los 140 ml sean el volumen máximo disponible en el frasco, lo cual influyó también en el casi nulo aumento de biogás de las últimas 3 mediciones. Tomando en cuenta esto, no es posible evaluar correctamente el efecto de la temperatura en los biorreactores con lactosa.

Por otra parte, en los biorreactores con celulosa se observa un aumento importante después de los últimos 20 días, donde se ve un aumento de 5 ml/día promedio en la última semana, y un aumento promedio de 11,6 ml/día entre los 3 biorreactores. Además, el biorreactor 6 aumentó la producción a una tasa de 10 ml/día entre las mediciones del día 25 y el 27 de marzo, tasa que disminuyó al bajar la temperatura, pero que se mantuvo creciente hasta el fin de las mediciones. Esto se entiende al ver la biodegradabilidad de la celulosa, pero también permite mostrar que la producción puede llegar a la capacidad máxima del sistema, como fue en el caso de la lactosa, pues el biorreactor 6 se estaba acercando a esa magnitud. Además, permite comprobar que el sistema puede adaptarse a una disminución de 8 grados en su temperatura y seguir produciendo biogás de forma sostenida.

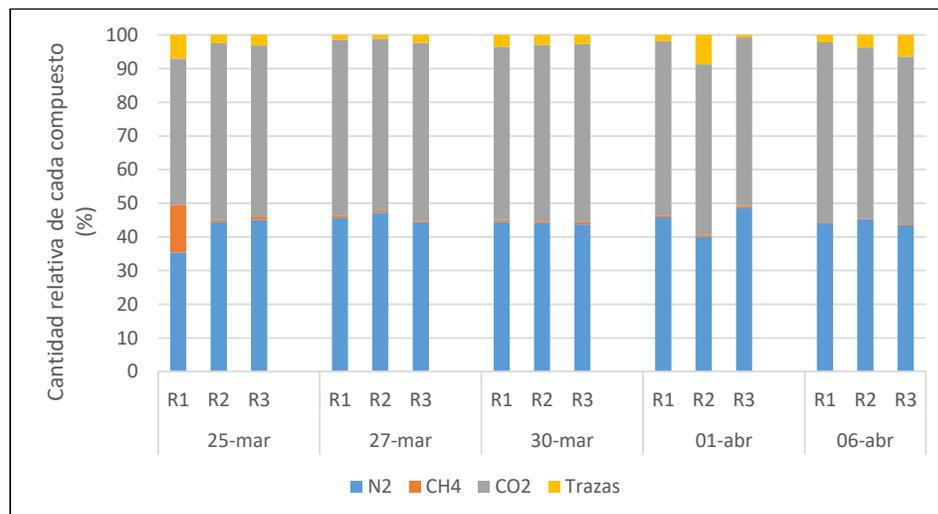
Un último factor que se debe considerar, es que en este experimento no se utilizó ningún biorreactor como blanco, por lo que no es posible saber si existía en el inicio una producción de biogás leve asociada al inóculo por sí mismo.

## 7.2. Análisis de contenido de metano con respecto al de dióxido de carbono

Para visualizar correctamente los datos, se calculó la proporción de metano y CO<sub>2</sub> con respecto a la suma de ambos, de modo que se creó una nueva Figura con los datos normalizados sin considerar el aire. Esto permite un mejor análisis de la calidad del biogás producido.

### 7.2.1. Lactosa

Se toma primero el caso de los biorreactores con lactosa. Se puede ver en la Figura 7-7, que desde el inicio de las mediciones, la cantidad de metano es 2 órdenes de magnitud menor que la de CO<sub>2</sub> (se excluye el caso de la medición del biorreactor 1 en el día 25 de marzo, puesto que fue más alta). Esto muestra que en la mayoría de los biorreactores de lactosa no se consiguió ni la proporción teórica ni la cantidad esperada de metano.

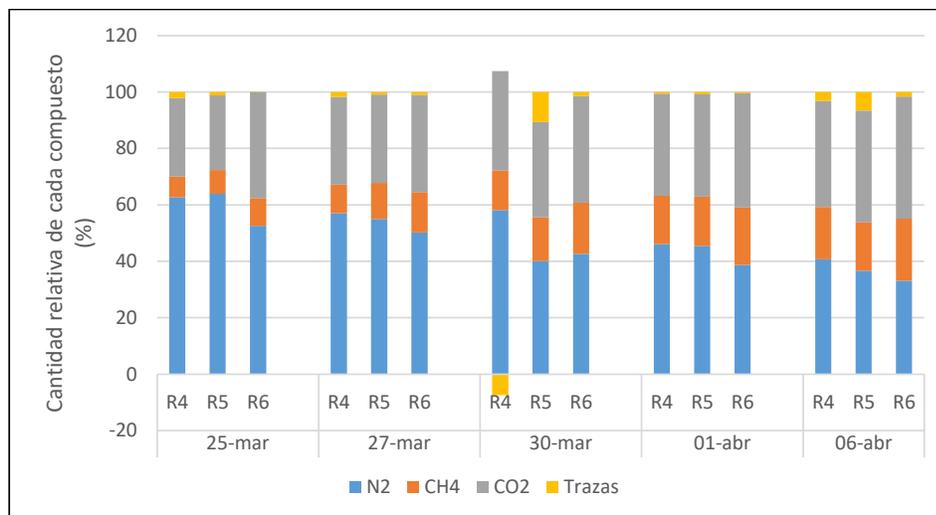


**Figura 7-7: Cromatografía de gases en biorreactores de Lactosa.**

En el gráfico también se ve que hay biorreactores donde la cantidad relativa de metano es menor a un 2% mientras que la de CO<sub>2</sub> es sobre 30%, lo que puede significar que hubo alguna inhibición de las bacterias. Sin embargo, con los datos obtenidos no es posible determinar si esto ocurrió efectivamente por inhibición, y basados en los otros datos obtenidos de la cromatografía de gases, se concluye que el metano que se podía producir en estos reactores ya había sido producido antes de comenzar las mediciones (excepto en el caso del biorreactor R<sub>1</sub>, que mostró una producción similar a lo esperado teóricamente, al menos al inicio de las mediciones).

### **7.2.2. Celulosa**

Distinto es el caso de los biorreactores con celulosa, donde si bien en un inicio se observa una cantidad porcentual de nitrógeno por sobre un 50%, ésta comienza a disminuir porcentualmente conforme aumenta la cantidad de biogás producido, lo que corrobora lo planteado acerca de que el porcentaje obtenido es de N<sub>2</sub>. También el efecto de aumento porcentual de biogás se puede ver al comparar el CH<sub>4</sub> con el CO<sub>2</sub> en la Figura 7-8, puesto que se ve en un aumento de metano en un promedio de 11%, con respecto al dióxido de carbono, lo que indica que el biogás producido mejoró su calidad. Aun así, su porcentaje de metano sigue siendo más bajo de lo esperado (ya que en un biorreactor en condiciones óptimas se espera entre un 50 a un 75% de metano, con un 50 a 25% de CO<sub>2</sub>, respectivamente).

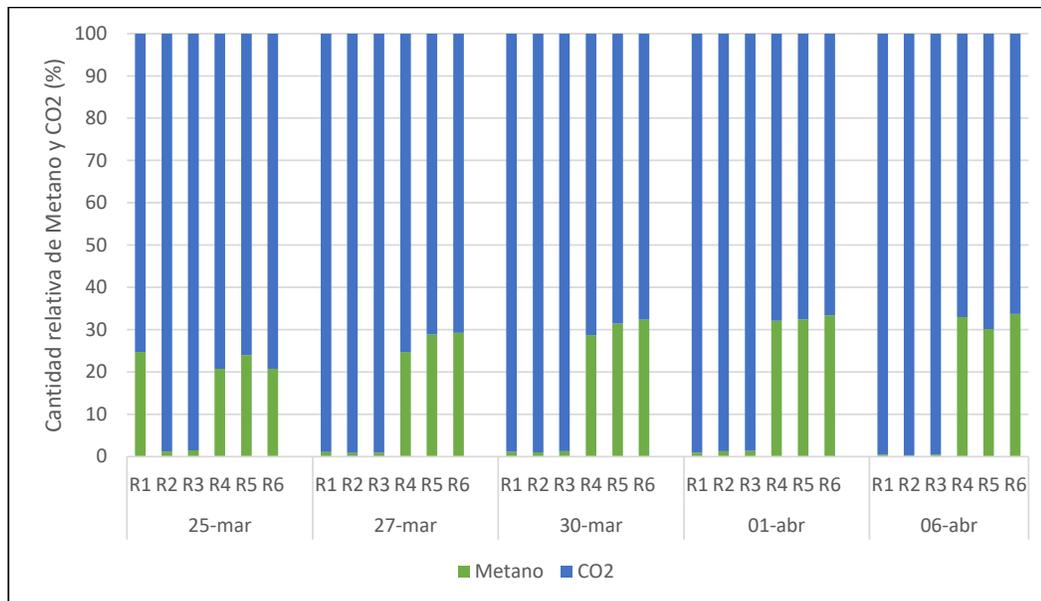


**Figura 7-8: Cromatografía de gases en biorreactores de Celulosa.**

Por otra parte, en las mediciones de elementos trazas se ve que hay un valor negativo. Esto es debido a que la suma de los porcentajes dio un valor mayor que 100 (aproximadamente 107), lo que se debe a un error de medición, posiblemente en el valor del aire, que es 10% más alto en ese biorreactor en comparación con los demás. Lo más probable es que el valor del aire haya sido de un 48% y no de un 58%, lo que daría una cantidad de elementos trazas de un 3%, similar a la del biorreactor 5.

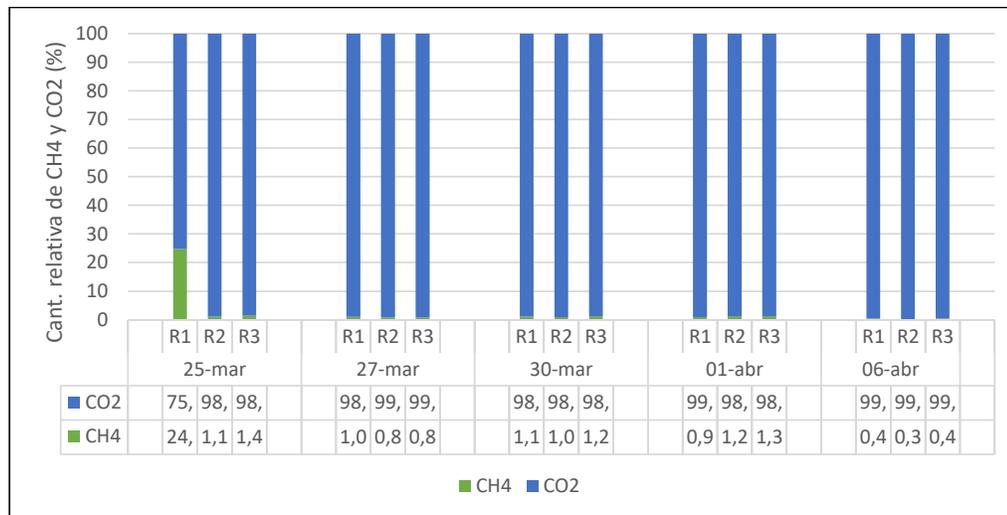
### 7.2.3. Razón entre contenido de metano y contenido de CO<sub>2</sub>

A continuación, en la Figura 7-9, se presentan los resultados de la razón entre metano y CO<sub>2</sub> durante el período de medición. Esto permite determinar si el proceso se encuentra en una etapa estacionaria o de producción.



**Figura 7-9: Porcentaje de CH<sub>4</sub> vs porcentaje de CO<sub>2</sub>, normalizando suma de ambos.**

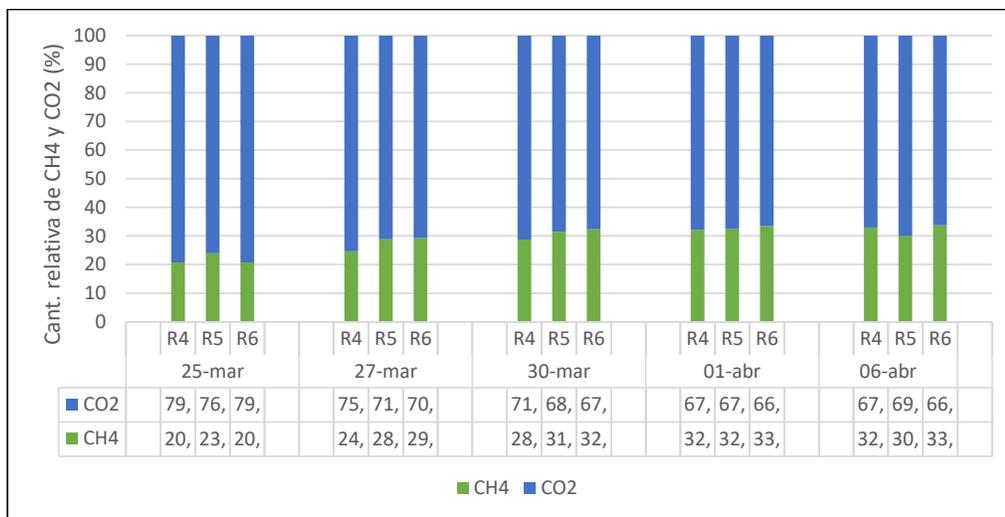
Primero que todo, se ve una diferencia de más de 20% entre el metano que hay entre los biorreactores de celulosa y de lactosa. Para poder distinguirlos mejor se dividirán los gráficos por sustratos, partiendo por el de lactosa en la Figura 7-10.



**Figura 7-10: Porcentaje de CH<sub>4</sub> vs porcentaje de CO<sub>2</sub> en biorreactores de lactosa, normalizando la suma de ambos.**

En este caso, se puede ver que la razón de metano con respecto al dióxido de carbono es muy baja (aproximadamente 0,01 de CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub>), y esto se mantiene durante todas las mediciones. Así, se puede observar que el sistema inhibió su producción y las variables se estabilizaron en los valores finales.

Por otra parte, los biorreactores de celulosa (Figura 7-11) muestran una razón de metano creciente, que inicialmente es de un promedio de 1:4 y finalmente llega a 1:2. En particular, el biorreactor 6 alcanzó la mejor producción de metano con una razón de 2:5, que se condice con el valor de mayor producción neta de biogás.



**Figura 7-11: Porcentaje de CH<sub>4</sub> vs porcentaje de CO<sub>2</sub> en biorreactores de celulosa, normalizando la suma de ambos.**

El hecho de que la razón entre metano y CO<sub>2</sub> aumente, muestra que el sistema sigue en un proceso de producción constante. Además, el porcentaje de elementos trazas en el sistema va en aumento, lo que visualiza que existe una producción ascendente de elementos intermedios, permitiendo que la producción se mantenga en el tiempo.

### 7.3. Análisis de volumen de metano y dióxido de carbono

#### 7.3.1. Volumen de Metano

En los resultados se ve que el volumen máximo de metano obtenido en los biorreactores de lactosa es de 20 ml. Este valor se en el caso del biorreactor R<sub>1</sub> pero sigue siendo alejado del valor teórico de 78 ml. Sin embargo, considerando que teóricamente se produce un valor 3 veces mayor de CO<sub>2</sub>, y tomando en cuenta la proporción del volumen basados en la capacidad máxima disponible de 140 ml en los biorreactores, se obtiene una producción

máxima teórica de 35 ml, lo que muestra que todavía no se produce todo el CH<sub>4</sub> posible de forma teórica y reafirma la conclusión de que hubo inhibición de metanogénesis.

También hay que considerar que los sistemas con lactosa como sustrato no se adaptaron al cambio de temperatura, por lo que no es posible evaluar cómo hubiera continuado la producción en el tiempo ni tampoco si se podría llegar al máximo teórico. Los datos se muestran en la Tabla 7.3.

**Tabla 7-3: Volumen de Metano (ml), por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25-mar	19,259	0,400	0,983	4,072	4,595	6,289
27-mar	20,018	0,682	1,638	6,933	8,904	11,984
30-mar	20,018	0,682	1,638	9,770	12,533	18,076
01-abr	20,018	0,682	1,638	11,816	14,970	22,162
06-abr	20,018	0,682	1,638	12,775	16,225	27,044

Por otra parte, los biorreactores de celulosa mantuvieron una producción constante y el valor máximo obtenido de forma experimental fue de 27 ml. Esto se relaciona con lo planteado en el análisis porcentual, y se corrobora que el proceso de producción de metano en los biorreactores de celulosa es más lento. Sin embargo, el valor se mantiene todavía bajo en comparación al máximo teórico de 82 ml, el cual no podría obtenerse en este caso ya que el máximo volumen disponible es de 140 ml (dada la geometría de los biorreactores) y el CO<sub>2</sub> ocupa un volumen similar, pero sí podría llegarse a valores cercanos a los 70 ml. También hay que considerar que el aumento de producción de CH<sub>4</sub> disminuyó de una tasa de aumento de 1,6 ml por día promedio a 0,47 ml/día, basado en los datos mostrados en la Tabla 7.3, lo que representa una baja en un 72%.

### 7.3.2. Volumen de dióxido de carbono

Finalmente, en ambos tipos de biorreactor se observó un aumento del volumen de dióxido de carbono, que se muestra en la Tabla 7.4. Este aumento se relaciona directamente con el aumento de biogás producido, aunque en los biorreactores de celulosa se vio que porcentualmente su aumento fue menor con respecto al aumento de metano en los últimos días de medición, considerando los días donde se hicieron mediciones a 22°C (30 de marzo, 01 de abril y 06 de abril).

**Tabla 7-4: Volumen de Dióxido de Carbono (ml), por día de medición.**

Días medición	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
25-mar	58,570	33,008	66,459	15,598	14,566	24,031
27-mar	72,954	33,271	72,730	21,144	21,952	28,999
30-mar	72,954	33,271	72,730	24,254	27,324	37,805
01-abr	72,954	33,271	72,730	24,976	31,208	44,222
06-abr	72,954	33,271	72,730	25,970	37,633	53,205

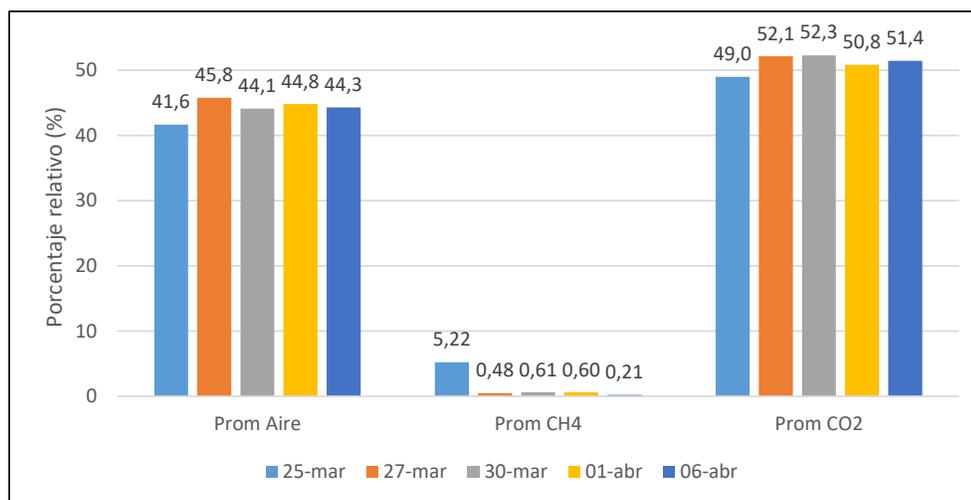
También hay que mencionar que el dióxido de carbono obtenido en los biorreactores de lactosa fue muy superior al esperado, por lo que se vuelve a suponer que hubo inhibición en la metanogénesis en algún momento de la producción (lo que implicaría que no se transformó todo el CO<sub>2</sub> disponible en metano), pero no hay datos suficientes para concluirlo.

### 7.4. Datos estadísticos

Para que los datos tengan validez, de acuerdo a los protocolos, es necesario que todos los biorreactores se hayan hecho en triplicado, pues así es posible comparar los datos de cada caso y evaluar si hay tendencias generales o no.

Ya se vio en las secciones anteriores la información respecto a los órdenes de magnitud, pero es necesario calcular otros valores como el promedio de aire, metano y dióxido de carbono por día, para corroborar la información.

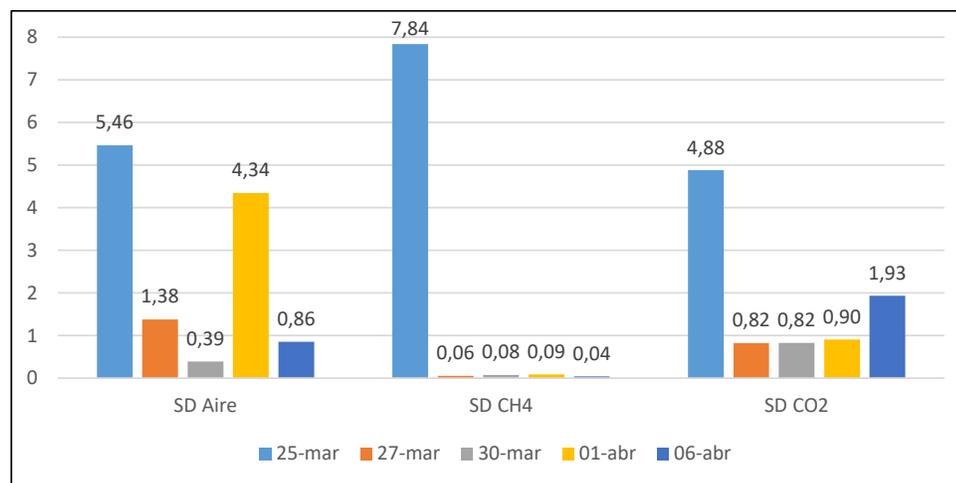
A continuación, se presenta en la Figura 7-12 el gráfico con el promedio diario del porcentaje de aire, metano y dióxido de carbono según lo medido en la cromatografía de gases (GC), para los biorreactores de lactosa. En este caso puede verse que el valor promedio de cada variable medida se mantuvo constante durante todas las mediciones, lo que valida lo planteado de que el sistema ya alcanzó su estado de producción final.



**Figura 7-12: Promedio de Aire, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de lactosa.**

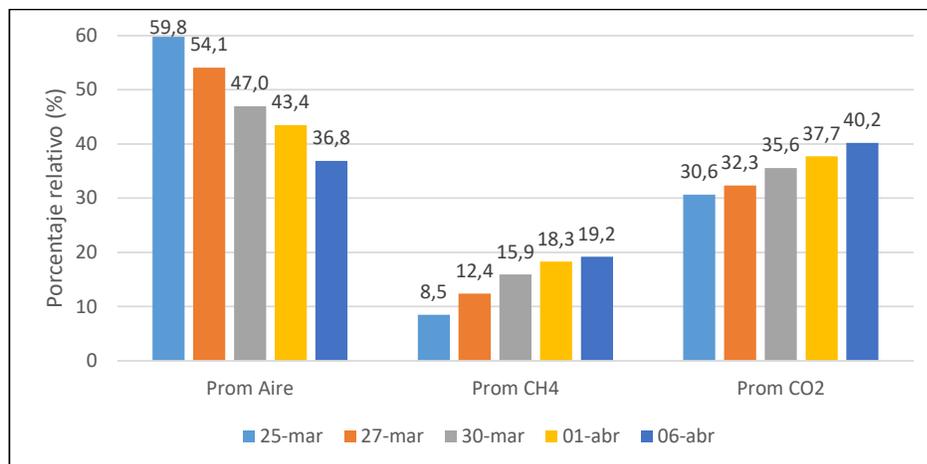
Por otra parte, la desviación estándar es más alta en el día de la primera medición, pues representaba un valor acumulativo de todos los días anteriores, particularmente en el caso del metano, donde un biorreactor presentó un contenido de un 14% de metano versus los

porcentajes menores a 1% del resto, lo que representa la desviación más alta de todas las mediciones. Esto se ve en la Figura 7-13.



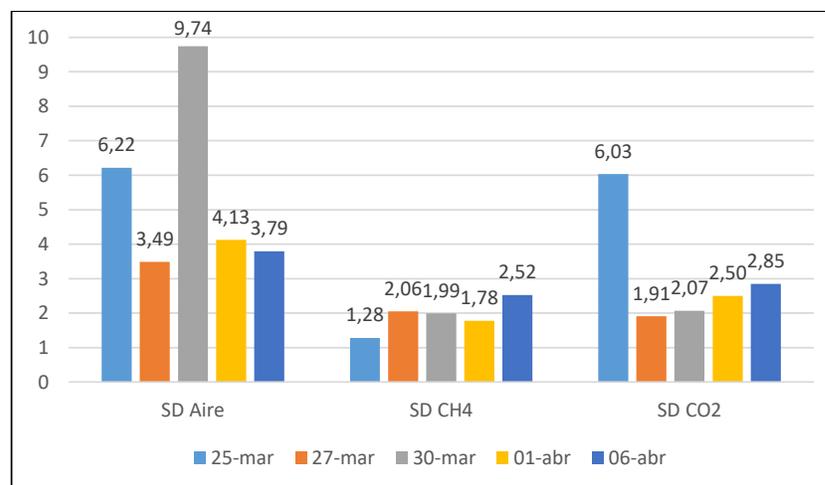
**Figura 7-13: Desviación estándar de Aire, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de lactosa.**

En el caso de la celulosa, en la Figura 7-14 se ve claramente la tendencia de aumento de concentración de metano y de dióxido de carbono, mientras que el aire disminuye casi un 20% desde su concentración inicial.



**Figura 7-14: Promedio de Aire, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de celulosa.**

Por último, en la Figura 7-15 la desviación estándar se mantiene en un rango del 10% con respecto a cada dato. Solo se cambia esta tendencia en la desviación del aire en el día 30 de marzo, lo cual refuerza la idea de que hubo un error en la anotación de uno de los datos durante ese día.



**Figura 7-15: Desviación estándar de Aire, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente, de los porcentajes obtenidos en cada día de medición de los biorreactores de lactosa.**

## 8. CONCLUSIONES

En base a los resultados y su correspondiente conclusión, se puede concluir que: el efecto de la temperatura en la operación de biorreactores de biogás es una disminución de la tasa de producción de metano en el tiempo, lo cual es válido para los biorreactores de celulosa (bajaron de una tasa de producción de metano de 1,6 ml/día a una tasa promedio de 0,47 ml/día). Para los biorreactores de lactosa no se puede concluir acerca del efecto de la temperatura, puesto que no se registró producción luego de pasar de una temperatura de 30°C a 22°C.

Respecto a la producción de biogás, es posible concluir que los sistemas de digestión a 22°C mantienen una producción de biogás sostenida, con una variación constante de un 60% -con respecto a la producción a 30°C- y un error de 6% entre los biorreactores de celulosa que funcionaron correctamente (R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>), mientras que realizar el experimento en triplicado permitió determinar los biorreactores que se alejaban de la media de los otros 2 para cada caso, siendo R<sub>2</sub> para el caso de lactosa y R<sub>4</sub> para el caso con celulosa.

Continuando con el caso de celulosa, a 30 grados se mantuvo una producción menor al 10% (del total producido al final de las mediciones) durante los primeros 15 días, la cual aumentó exponencialmente desde el día 20 hasta que se realizó la última medición a esa temperatura, llegando a un total promedio acumulado de 83 ml de biogás/biorreactor de celulosa. Una vez ahí la tasa de generación de biogás decayó, y llegó a un máximo promedio acumulado de 100 ml de biogás/biorreactor, lo que muestra que el sistema se mantiene en funcionamiento. Con estos datos se concluye que la degradabilidad de la

celulosa tarda un promedio de 2 semanas en iniciar un crecimiento sobre el 10% de su capacidad final.

En cambio, los biorreactores de lactosa mostraron una producción que comenzó antes en el tiempo, ya que como se vio en la sección de Discusión, se superaron los 10 ml acumulados de biogás/biorreactor dentro de los primeros 5 días de funcionamiento (5 de marzo). La producción se mantuvo creciendo de acuerdo a un comportamiento de primer orden, llegando a un promedio acumulado de 133 ml de biogás/biorreactor (sin considerar R<sub>2</sub>) el penúltimo día de medición a 30°C, y alcanzando un máximo promedio de 138,5 ml de biogás/biorreactor, el cual se alcanzó en el último día de medición a esa temperatura, sin mostrar variaciones al disminuir la temperatura. Esto permite concluir que la lactosa se hidroliza y facilita la producción de biogás desde el inicio.

Si bien estudios similares han mostrado que los metanógenos siguen presentes en el sistema sin producción, el valor máximo obtenido se condice con el máximo de volumen disponible en el biorreactor (140 ml), por lo que en los biorreactores alimentados con lactosa no se pudo obtener un correcto análisis de lo que ocurre al disminuir la temperatura.

Por otra parte, considerando que al día 15 del experimento los biorreactores de celulosa habían llegado a un 10% del máximo de la producción promedio acumulada de 100 ml, que en el mismo tiempo los biorreactores de lactosa ya llevaban una producción del 50% promedio, y que en ambos casos se logró un máximo promedio mayor o igual a 100 ml/biorreactor, se concluye que ambos sustratos tienen producción de biogás, y su uso en conjunto puede evaluarse en otras investigaciones para ver si son complementarios.

También se puede concluir que el uso de sustratos de alta biodisponibilidad, como son los carbohidratos, es factible para la creación de sistemas de producción de metano, puesto que todos los biorreactores tuvieron una producción sobre 60 ml, y además 2 de 3 triplicados de cada sustrato lograron producir más de 95 ml de biogás.

En base a los resultados y al cumplimiento parcial de la tesis, se sugiere explorar sistemas con sustratos mixtos en el futuro (mezcla de lactosa y de celulosa), lo que permitirá tener una producción constante de biogás durante el período del experimento, aunque debe considerarse utilizar lactosa en mayor cantidad, ya que la cantidad de metano producido en base a este sustrato es menor para una misma cantidad de sustrato inicial. También se plantea realizar mediciones por un tiempo mayor y considerando mayores variaciones de temperatura, por ejemplo 30, 25, 20 y 15°C, ya que esto permitirá tener una comprensión más detallada de los fenómenos observados en esta tesis, y un desarrollo mayor en el rango psicrófilico ( $< 20^{\circ}\text{C}$ ), puesto que el crecimiento de los metanógenos vuelve a aumentar en temperaturas cercanas a los 15°C. Se debe considerar también que el sistema gasta una menor energía al funcionar a 22 grados, lo que puede hacer viable el uso de una fuente de biogás con temperatura de operación variable en zonas donde la temperatura media es más baja, como en el sur del país. En este caso, el máximo promedio de energía producida en los biorreactores de lactosa fue de 0,24 kJ, mientras que para el caso de los biorreactores de celulosa fue de 0,72 kJ al final de su producción, considerando el poder calorífico del metano de 55 kJ/g, con lo que se puede concluir que en los biorreactores de celulosa se produce mayor energía (considerando que para ambos casos se utilizaron 0,4 g de sustrato), aunque el bajo porcentaje de metano en los biorreactores de lactosa.

Por último, en los biorreactores de celulosa se puede ver en la Figura 7-11 que el contenido relativo de metano con respecto al dióxido de carbono aumenta conforme pasan los días –ocurre el mismo efecto con respecto al aire-, pasando de un promedio de 21,8% en el primer día de medición (25 de marzo) hasta un promedio de 32% en las últimas 2 mediciones. En estas últimas se observa una variación promedio menor a un 1% de contenido de metano, por lo que se concluye que la variación de temperatura mantiene la relación estequiométrica de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Se observa también en todos los biorreactores un aumento relativo de los elementos trazas con respecto al aire, al metano y al dióxido de carbono, el cual en los triplicados de celulosa pasó de un porcentaje promedio de 1% a un promedio de 3,8%, por lo que puede concluirse que la disminución de temperatura mantiene la relación estequiométrica del metano con respecto a los demás elementos, mientras que aumenta la relación estequiométrica de los elementos trazas. Dentro de éstos existe  $\text{H}_2$ , pero no se pudo realizar una medición de este, por lo que no es posible determinar la estequiometría correspondiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., & Campos, J. L. (2009). *Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays*. doi:10.2166/wst.2009.040
- Araujo G., Á. V., Monsalve C., L., & Quintero T., A. L. (2013). Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*.
- Association, American Public Health. (2017). 5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD). En A. P. Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. doi:10.2105/SMWW.2882.103
- Bassani, I., Kougias, P. G., Treu, L., & Angelidaki, I. (2015). Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions. *Environmental Science & Technology*. doi:10.1021/acs.est.5b03451
- Bassani, I., Kougias, P., Treu, L., & Angelidaki, I. (2015). Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions. *Environmental Science & Technology*, 12585-12593. doi:10.1021/acs.est.5b03451
- Bolzonella, D., Battista, F., Cavinato, C., Gottardo, M., Micolucci, F., Lyberatos, G., & Pavan, P. (2018). Recent developments in biohythane production from household food wastes: A review. *Bioresource Technology*, 311-319.
- Buffiere, P., Loisel, D., Bernet, N., & Delgenes, J.-P. (2006). Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science & Technology*, 233-241.
- CONAMA. (2010). *PRIMER REPORTE DEL MANEJO DE RESIDUOS SÓLIDOS EN CHILE*.
- De la Rubia, M., Villamil, J., & Mohedano, A. (2020). Anaerobic digestion for methane. En M. De la Rubia, J. Villamil, & A. Mohedano, *Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels*. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816204-0.00004-7
- Demirel, B., Yenigun, O., & Onay, T. T. (2005). Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochemistry*, 2583-2595.

Dev, S., Saha, S., Kurade, M. B., Salama, E.-S., El-Dalatony, M. M., Ha, G.-S., . . . Jeon, B.-H. (2019). Perspective on anaerobic digestion for biomethanation in cold environments. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 103, 85-95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.12.034>

Dhaked, R. K., Singh, P., & Singh, L. (2010). Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waste Management*, 2490–2496.

Fernández Rodríguez, C., Martínez Torres, E. J., Morán Palao, A., & Gómez Barrios, X. (2016). Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. Revisión bibliográfica. *Revista ION, Investigación, Optimización y Nuevos procesos en Ingeniería*, 47-62. doi:<http://dx.doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016004>

GIZ. (2010). *Guía sobre el Biogás, desde su producción a su uso*. (D. G. Zusammenarbeit, Ed.) Eschborn: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR).

Hans, M., & Kumar, S. (2019). Biohythane production in two-stage anaerobic digestion system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 17363-17380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.022>

Harris, R. A., & Johnson, J. S. (2013). Glycolysis Overview. En R. A. Harris, & J. S. Johnson, *Encyclopedia of Biological Chemistry* (págs. 443-447). Indianapolis. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11342-X>

INDAP. (2018). *BIOGÁS DE RESIDUOS AGROPECUARIOS Biogás de residuos agropecuarios en la Región de Los Ríos*.

Jensen, M., Kofoed, M., Fischer, K., Voigt, N., Agneessens, L., Batstone, D., & Ottosen, L. (2018). Venturi-type injection system as a potential H<sub>2</sub> mass transfer technology for full-scale in situ biomethanation. *Applied Energy*, 840-846. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.04.034>

Kumari, A. (2018). Chapter 1 - Glycolysis. En A. Kumari, *Sweet Biochemistry*. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814453-4.00001-7>

Labatut, R. (2011). Preparation of defined media.

McCarty, P. (1964). *Anaerobic Waste Treatment Fundamentals*.

Ministerio de Energía. (2011). *Manual de Biogás*. Santiago. Obtenido de [https://www.energia.gob.cl/sites/default/files/documentos/manual\\_de\\_biogas.pdf](https://www.energia.gob.cl/sites/default/files/documentos/manual_de_biogas.pdf)

Ministerio del Medio Ambiente. (2020). *ODS Ministerio del Medio Ambiente*. Obtenido de Consejo Nacional para la Implementación Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible: <https://ods.mma.gob.cl/>

Nguyen, D., Nitayavardhana, S., Sawatdeenarunat, C., Surendra, K., & Kumar Khanal, S. (2019). Biogas Production by Anaerobic Digestion: Status and Perspectives. En D. Nguyen, S. Nitayavardhana, C. Sawatdeenarunat, K. Surendra, & S. Kumar Khanal, *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the*.

ONU. (2020). *Objetivos y metas de Desarrollo Sostenible*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>

Pearse, L. F., Hettiaratchi, J. P., & Kumar, S. (2018). Towards developing a representative biochemical methane potential (BMP). *Bioresource Technology*, 312-324. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.069>

Rachbauer, L., Voithl, G., Bochmann, G., & Fuchs, W. (2016). Biological biogas upgrading capacity of a hydrogenotrophic community in a trickle-bed reactor. *Applied Energy*, 483-490.

Sawasdee, V., Haosagul, S., & Pisutpaisal, N. (2019). Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29575-29582. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.144>

Scharer, J., & Moo-Young, M. (1979). Methane Generation by Anaerobic Digestion.

Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., & Lema, J. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, 231-239.

Wagner, A. O., Lins, P., Malin, C., Reitschuler, C., & Illmer, P. (2013). Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Science of the Total Environment*, 256-266.

Wei, S., & Guo, Y. (2018). Comparative study of reactor performance and microbial community in psychrophilic and mesophilic biogas digesters under solid state condition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 534-551. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.001>

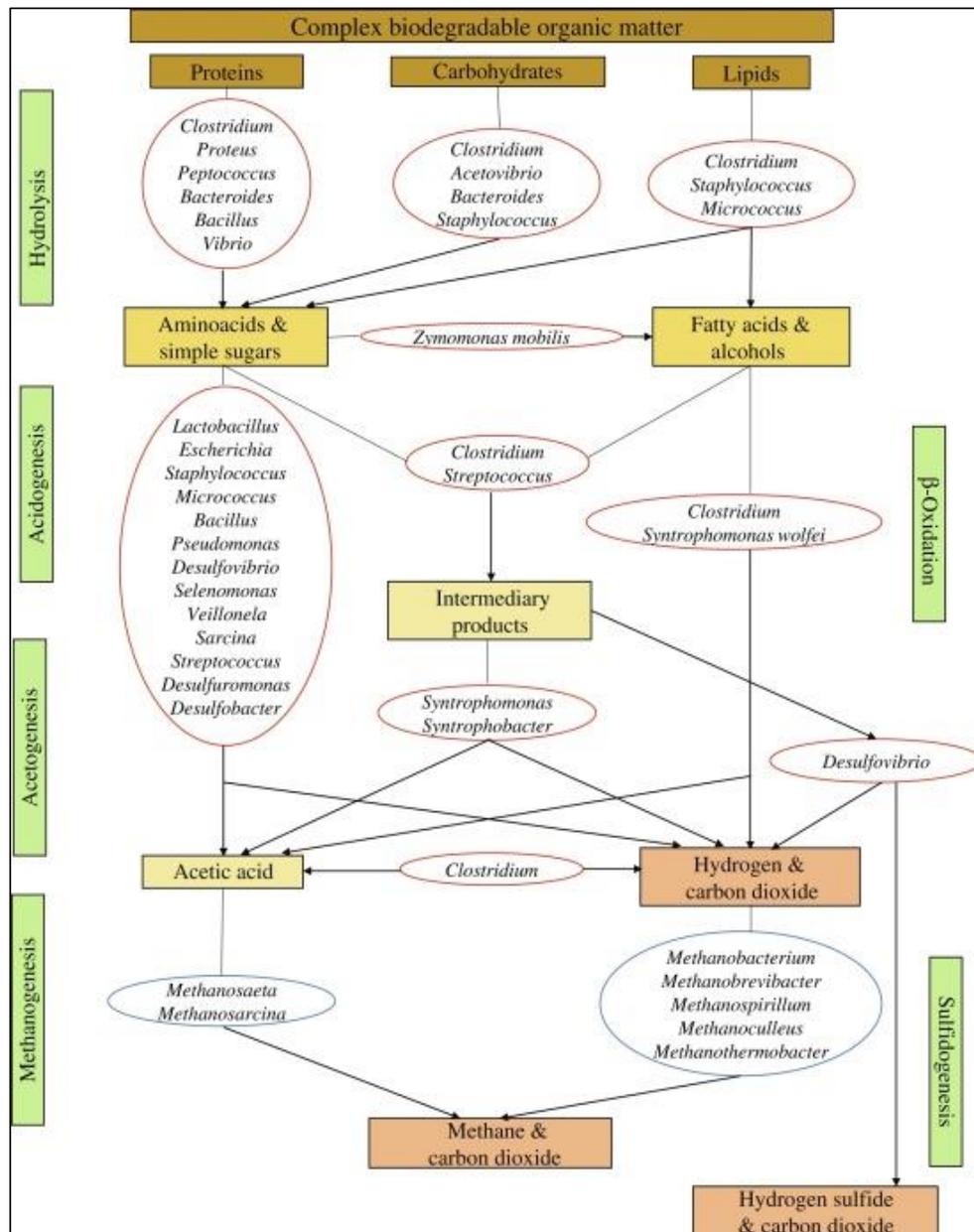
World Bank Group. (2018). *What a Waste 2.0 : A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. Washington DC. Obtenido de <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317>

Zabranska, J., & Pokorna, D. (2018). Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens. *Biotechnology Advances*, 36(3), 707-720. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.003>

**ANEXOS**

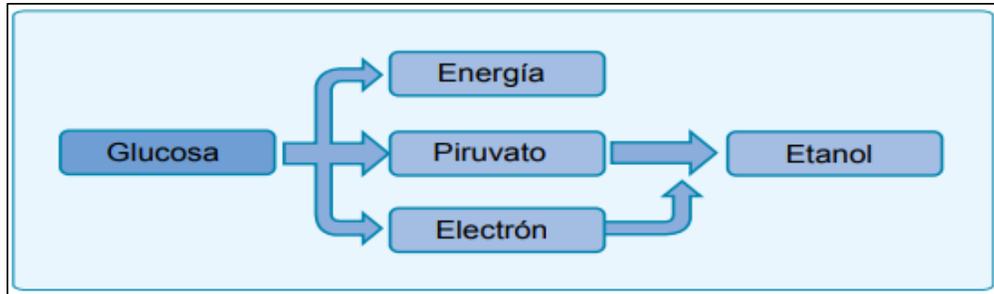
## ANEXO A: ESPECTRO BACTERIANO DIGESTIÓN ANAERÓBICA

Bacterias involucradas en digestión anaeróbica (De la Rubia, Villamil, & Mohedano, 2020).

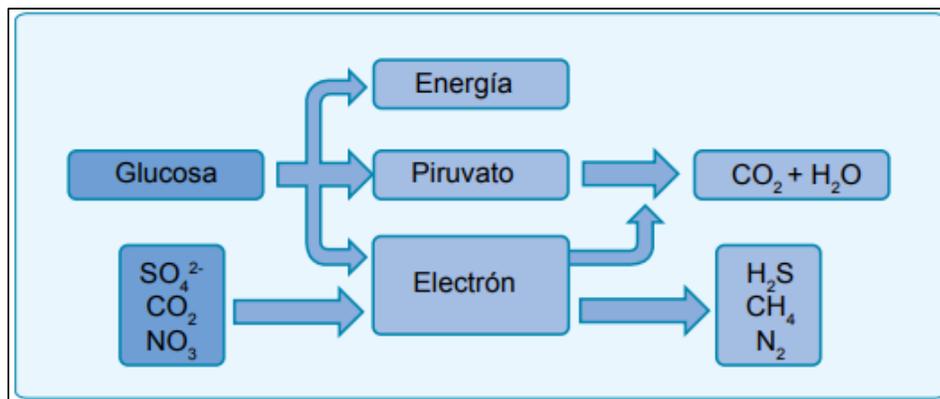


**ANEXO B: FERMENTACIÓN Y RESPIRACIÓN ANAERÓBICA**

Fermentación anaeróbica (Ministerio de Energía, 2011).



Respiración anaeróbica (Ministerio de Energía, 2011).



**ANEXO C: FOTOS BIORREACTORES DÍA 25 DE MARZO**