UNIVERSIDAD DE LEÓN

Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad

ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA
DE RESIDUOS GANADEROS CON OTROS
SUBSTRATOS AGROINDUSTRIALES**

**STUDY OF THE ANAEROBIC CO-DIGESTION OF LIVESTOCK
WASTES WITH AGROINDUSTRIAL SUBSTRATES**

Álvaro Lobato Fuertes

León, 2012

UNIVERSIDAD DE LEÓN

Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad

ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA DE
RESIDUOS GANADEROS CON OTROS SUBSTRATOS
AGROINDUSTRIALES**

**STUDY OF THE ANAEROBIC CO-DIGESTION OF LIVESTOCK
WASTES WITH AGROINDUSTRIAL SUBSTRATES**

Tesis presentada por

Álvaro Lobato Fuertes

Para optar al grado de Doctor

Directores:

Xiomar Arleth Gómez Barrios

Daniel Blanco Cobián

Agradecimientos:

Antes de avanzar en este trabajo quisiera expresar mi agradecimiento a los directores de Tesis, a Dña. Xiomar Gómez Barrios por la continua disposición de su experiencia y conocimiento y a D. Daniel Blanco Cobián, por su constante asesoramiento y su apoyo incondicional. Sin ellos no podría haber completado este trabajo. Igualmente debo expresar mi sincero agradecimiento a D. Antonio Morán Palao por haberme brindado la oportunidad de colaborar en este equipo de investigación y de manera muy especial por su cercanía y confianza demostradas en estos años.

Quiero remarcar mi profundo agradecimiento a todos los compañeros de laboratorio con quien he tenido la oportunidad de compartir tantos momentos en este trayecto investigador. Quisiera comenzar mencionando a Marta Elena por la experiencia compartida en la línea de termofusibilidad de cenizas. Seguidamente debo agradecer a Adrián, a Diego y a Laura por tantos momentos de trabajo y compañerismo en el mundo de la electrolisis biocatalítica. Es aquí donde se me ofertó la oportunidad de compartir experiencias con D. Boris Tartakovski, con Guido Santoyo y con Silvia Prado en Montreal. Finalmente en el campo de la digestión anaerobia debo expresar mi agradecimiento por todos los consejos y apoyo recibidos a M^a José, José Israel, Vanesa, Camino, Judith, David, Julio, Rubén G., Rubén M. y Begoña pero especialmente debo remarcar este agradecimiento a Nuria Martínez por tantas horas y horas de trabajo compartido y por tu cercanía en momentos buenos y malos.

Quisiera extender también este agradecimiento al personal del departamento que en estos años he tenido la oportunidad de conocer: Luisfer, Olegario, Carlos, Ana y especialmente a Juan y Fernando C. por su simpatía y continuo apoyo logístico.

Por último quisiera agradecer a Teresa, Vicky, Elías, Dani M., Lorena, Rebeca, Marcia, Iris, Luis, Susana y Roberto, Fernando G., Carla, Vanesa, Domingo, Natalia y Guillermo el tiempo que hemos pasado juntos.

Índice General

Índice General.....	I
Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas.....	XI
Resumen	XIII
Abstract	XV

CAPÍTULO 1: ENERGÍA Y RESIDUOS: HACIA UNA GESTIÓN RESPONSABLE

.....	1
1.1. Introducción	3
1.2. Las energías renovables	4
1.3. Los residuos agroindustriales: la industria ganadera, agroalimentaria y bioenergética.....	8
1.3.1. Los residuos ganaderos y su problemática	9
1.3.1.1. Purín porcino	10
1.3.1.2. Estiércol ovino	11
1.3.1.3. Estiércol bovino	12
1.3.2. Los residuos agroalimentarios	13
1.3.3. Los residuos de los biocombustibles: el biodiesel y la glicerina	13
1.4. El biogás.....	16
1.4.1. Caracterización del biogás	16
1.4.2. Evolución histórica y situación actual del biogás.....	17
1.4.3. Potencial de los residuos agroindustriales para la producción de biogás	19
1.5. Bibliografía	22

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes	29
2.1.1. Historia de la digestión anaerobia.....	30
2.1.2. Etapas de la digestión anaerobia.....	31

2.1.3.	Factores que afectan al proceso de digestión anaerobia.....	35
2.1.3.1.	<i>Temperatura</i>	36
2.1.3.2.	<i>Características del substrato y del inóculo</i>	36
2.1.3.3.	<i>Agitación</i>	37
2.1.3.4.	<i>Ph</i>	38
2.1.3.5.	<i>Nutrientes</i>	38
2.1.3.6.	<i>Tóxicos e inhibidores</i>	38
2.1.4.	Co-digestión de biorresiduos	42
2.1.5.	Estabilización, maduración y humificación de los residuos orgánicos	43
2.1.6.	Legislación aplicable al sector del biogás de residuos agroindustriales. Breve revisión	44
2.2.	Objetivos.....	49
2.2.1.	Objetivo general.	49
2.2.2.	Objetivos específicos.....	49
2.2.3.	Planificación del trabajo.....	51
2.3.	Bibliografía	52

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS.....61

3.1.	Substratos empleados.....	63
3.1.1.	Residuos ganaderos	63
3.1.2.	Otros residuos agroindustriales	63
3.1.3.	Inóculo.....	64
3.2.	Ensayos de digestión anaerobia en discontinuo.....	65
3.2.1.	Ensayos de biodegradabilidad. Producción máxima y teórica de metano	65
3.3.	Ensayos de digestión anaerobia en semicontinuo	66
3.3.1.	Banco de ensayos con reactores de 5 litros	67
3.3.2.	Banco de ensayos con reactores de 3 litros	68
3.4.	Técnicas analíticas	69
3.4.1.	Análisis rutinarios.....	69
3.4.2.	Técnicas de análisis de estabilidad.....	70
3.4.2.1.	<i>DBO</i>	70
3.4.2.2.	<i>Análisis Termogravimétrico</i>	72

3.4.2.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	73
3.5. Bibliografía	76

CAPÍTULO 4: ENSAYOS DE DIGESTIÓN DE ESTIÉRCOL OVINO CON RESIUDOS DE UNA INDUSTRIA DE PROCESADO DE PATATAS

4.1. Introducción	81
4.2. Objetivos	83
4.3. Material y método	83
4.3.1. Substratos utilizados	83
4.3.2. Rendimiento teórico de producción bioquímica de metano. Fórmula de Buswell	85
4.3.3. Ensayos de biodegradabilidad	85
4.3.4. Ensayos en semicontinuo.....	86
4.3.5. Técnicas analíticas	89
4.4. Resultados y discusión	89
4.4.1. Rendimiento teórico de producción de metano	89
4.4.2. Ensayos de biodegradabilidad	90
4.4.3. Ensayos en semicontinuo.....	92
4.5. Conclusiones	104
4.6. Bibliografía	105

CAPÍTULO 5: DIGESTION OF CATTLE MANURE UNDER MESOPHILIC AND THERMOPHILIC CONDITIONS: CHARACTERIZATION OF ORGANIC MATTER APPLYING THERMAL ANALYSIS AND ¹HNMR

Abstract	113
Resumen	113
5.1. Introduction	114
5.2. Material and methods	115
5.2.1. Substrates and digestion characteristics.....	115

5.2.2.	Kinetic analysis	116
5.2.3.	Analytical techniques	116
5.3.	Results and discussion	118
5.3.1.	Anaerobic digestion.....	118
5.3.2.	Thermal Analysis	121
5.3.3.	¹ H NMR spectroscopy	125
5.4.	Conclusions.....	132
	<i>Acknowledgements</i>	132
5.5.	References.....	133

CAPÍTULO 6: IMPROVEMENT OF BIOGAS PRODUCTION BY CO-DIGESTION OF SWINE MANURE AND RESIDUAL GLYCERINE139

	Abstract	143
	Resumen.....	143
6.1.	Introduction.....	144
6.2.	Materials and methods	146
6.2.1.	Substrates and batch digestion	146
6.2.2.	Anaerobic digestion.....	148
6.2.3.	Analytical techniques	149
6.3.	Results	150
6.3.1.	Batch digestion tests of swine manure	150
6.3.2.	Co-digestion of swine manure and residual glycerine	151
6.4.	Conclusions.....	160
6.5.	Executive summary.....	161
6.6.	Future perspective	161
6.7.	References.....	162

CAPÍTULO 7: ENSAYOS DE ESTABILIZACIÓN DEL EFLUENTE DE DIGESTIÓN DE PURÍN - GLICERINA 165

7.1. Introducción	167
7.2. Objetivos	168
7.3. Material y método	169
7.3.1. Procedimiento experimental	169
7.3.2. Substratos utilizados	170
7.3.3. Técnicas analíticas	171
7.4. Resultados y discusión	171
7.4.1. Parámetros físico - químicos	171
7.4.2. Espectrometría ¹ H RMN.....	175
7.4.2.1. Evolución del proceso de estabilización en régimen mesofílico	175
7.4.2.2. Evolución del proceso de estabilización en régimen térmico ambiental...	183
7.5. Conclusiones	187
Agradecimientos.....	187
7.6. Bibliografía	188
 ANEXO 7.1.	 191

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES 193

8.1. Respecto a los ensayos de digestión en discontinuo y los co-substratos empleados	195
8.2. Respecto a los ensayos de digestión y co-digestión en semicontinuo de estiércol ovino - residuo de patata.	196
8.3. Respecto a los ensayos de digestión y co-digestión en semicontinuo de purín porcino - glicerina.	196
8.4. Respecto a los ensayos de estabilización de efluentes de digestión anaerobia	197

CAPÍTULO 1

<i>Figura 1.1.</i>	<i>Consumo final bruto de energía en 2010.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 1.2.</i>	<i>Estructura de producción eléctrica en 2010.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 1.3.</i>	<i>Consumo final bruto de electricidad renovable (desglose)</i>	<i>6</i>
<i>Figura 1.4.</i>	<i>Consumo final bruto de energías renovables para calefacción / refrigeración</i>	<i>6</i>
<i>Figura 1.5.</i>	<i>Consumo final de energías renovables en el transporte.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 1.6.</i>	<i>Capacidad energética de biogás instalada en países de la OCDE en MW. 18</i>	
<i>Figura 1.7.</i>	<i>Evolución de la potencia instalada y la generación bruta de electricidad perseguida por el PANER 2011 – 2020 en el área de biogás</i>	<i>21</i>
<i>Figura 1.8.</i>	<i>Objetivo de generación para usos térmicos basada en biogás.....</i>	<i>21</i>

CAPÍTULO 2

<i>Figura 2.1.</i>	<i>Esquema del proceso de digestión descrito en dos etapas.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 2.2.</i>	<i>Esquema de reacciones de la digestión anaerobia de materia orgánica compleja.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 2.3.</i>	<i>Esquema general de trabajo.....</i>	<i>51</i>

CAPÍTULO 3

<i>Figura 3.1.</i>	<i>Imagen del banco de ensayos con reactores de 5 litros</i>	<i>67</i>
<i>Figura 3.2.</i>	<i>Esquema del banco de ensayos con reactores de 3 litros y detalle de uno de sus reactores</i>	<i>68</i>
<i>Figura 3.3.</i>	<i>Ejemplo de una curva de crecimiento de la población bacteriana instalada sobre un substrato y evolución del oxígeno consumido</i>	<i>71</i>

<i>Figura 3.4. a) Esquema de la termobalanza utilizada. b) Esquema del horno de la termobalanza.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 3.5. Estado inicial de los núcleos (a) y alineamiento según la orientación del campo magnético (H_0), pasando al estado de alta energía (b).....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 3.6. Esquema de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear</i>	<i>75</i>

CAPÍTULO 4

<i>Figura 4.1. Fotografías de reactores (a) y detalle del montaje del baño utilizado (b)</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4.2. Diseño experimental por comparativas secuenciales</i>	<i>87</i>
<i>Figura 4.3. Cronograma de los ensayos</i>	<i>89</i>
<i>Figura 4.4. Producción diaria acumulada de gas de los residuos ensayados.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 4.5. Tasa de producción específica de metano.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 4.6. Correlación entre la destrucción de biodegradabilidad y el rendimiento máximo teórico.....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 4.7. Correlación entre la destrucción de biodegradabilidad y la eficiencia de producción de metano</i>	<i>104</i>

CAPÍTULO 5

<i>Figure 5.1. Methane production for thermophilic and mesophilic systems.....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 5.2. Thermal profiles of the fresh cattle manure</i>	<i>122</i>
<i>Figure 5.3. TG, DTG and DTA profiles for digestates curves obtained from mesophilic (a, b, c) and thermophilic (d, e, f) digestion processes</i>	<i>123</i>
<i>Figure 5.4. (a) 1D ^1H NMR spectrum obtained from the fresh cattle manure. (b) ^1H, ^{13}C HSQC spectra of the fresh cattle manure.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 5.5. Spectra obtained from samples at 16 and 77 d for mesophilic and thermophilic digestates. (a) Mesophilic, 16d. (b) Mesophilic, 77d. (c) Thermophilic, 16d. (d) Thermophilic, 77d</i>	<i>128</i>
<i>Figure 5.6. HSQC spectra obtained in the final stage of digestion for mesophilic (a) and thermophilic (b) samples.....</i>	<i>131</i>

CAPÍTULO 6

Figure 6.1.	Cumulative CH_4 produced under batch tests digestion of SM_A and SM_M..	151
Figure 6.2.	Daily biogas production of co-digestion system SM_A2	152
Figure 6.3.	VFA evolution for co-digestion system SM_A2	155
Figure 6.4.	Daily biogas production of co-digestion systems with SM_M and residual glycerine: (A) SM_M2, (B) SM_M5, (C) SM_M8.....	156
Figure 6.5.	VFA concentrations of co-digestion systems with SM_M and residual glycerine: (A) SM_M2, (B) SM_M5, (C) SM_M8.....	157

CAPÍTULO 7

Figura 7.1.	Evolución de los SV en los reactores SM_M5 y SM_M8.	172
Figura 7.2.	Evolución de la relación SV/ST en los reactores SM_M5 y SM_M8.	172
Figura 7.3.	Evolución del contenido en N-amoniaco en los reactores SM_M5 y SM_M8..	173
Figura 7.4.	Evolución de la DQO en los reactores SM_M5 y SM_M8.....	174
Figura 7.5.	Producción de biogás residual en los reactores SM_M5 y SM_M8. Detalle del final del proceso	175
Figura 7.6.	Espectro 1H RMN de la alimentación introducida en el reactor (SM_M5_Alim).	176
Figura 7.7.	Espectro 1H RMN de la muestra de digerido (SM_M5_0).....	176
Figura 7.8.	Espectro 1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 3 meses (SM_M5_1).....	176
Figura 7.9.	Espectro 1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 10 meses (SM_M5_2).....	177
Figura 7.10.	Espectro 1H RMN de la alimentación introducida en el reactor (SM_M8_Alim).	183
Figura 7.11.	Espectro 1H RMN de la muestra de digerido (SM_M8_0).....	184
Figura 7.12.	Espectro 1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 3 meses (SM_M8_1).....	184

<i>Figura 7.13. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 10 meses</i> <i>(SM_M8_2).....</i>	<i>184</i>
---	------------

CAPÍTULO 1

<i>Tabla 1.1. Composición orientativa del Biogás</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 1.2. Potencial de generación de biogás.</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 1.3. Potencial de biogás procedente de residuos agroindustriales.....</i>	<i>20</i>

CAPÍTULO 3

<i>Tabla 3.1. Características químicas del lodo primario utilizado en el estudio.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 3.2. Composición promedio y potencial de producción bioquímica de CH₄ de las principales moléculas de interés.</i>	<i>66</i>

CAPÍTULO 4

<i>Tabla 4.1. Caracterización físico química de los substratos empleados.....</i>	<i>84</i>
<i>Tabla 4.2. Contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos fácilmente degradables y AGVs de los substratos</i>	<i>85</i>
<i>Tabla 4.3. Tiempos de retención hidráulica aplicados a cada sistema.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 4.4. Caracterización de las alimentaciones utilizadas</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 4.5. Rendimiento de producción de metano</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 4.6. Rendimiento máximo teórico según Buswell y el obtenido experimentalmente.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 4.7. Contenido en metano</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 4.8. Contenido en ST y SV</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 4.9. Concentración de AGV registrada en el digerido</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 4.10. Contenido en N-NH₃ y pH</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 4.11. Análisis de DQO</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 4.12. Resultados de los ensayos DBO₅.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 4.13. Resultados de la fracción DQO refractaria</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 4.14. Índice de biodegradabilidad de los influentes y efluentes de los sistemas...</i>	<i>103</i>

CAPÍTULO 5

<i>Table 5.1. Chemical composition of the substrate.</i>	<i>119</i>
<i>Table 5.2. Characteristics of batch digestion systems.</i>	<i>120</i>
<i>Table 5.3. Signal identification of ^1H NMR spectrum of samples taken in the present study</i>	<i>125</i>

CAPÍTULO 6

<i>Table 6.1. Physicochemical characterization, metals and phosphorus content of residual glycerine used as co-substrate</i>	<i>148</i>
<i>Table 6.2. Physicochemical characteristics of the co-digestion mixtures.</i>	<i>151</i>
<i>Table 6.3. Performance parameters of digester treating different mixtures of SM and glycerine</i>	<i>153</i>

CAPÍTULO 7

<i>Tabla 7.1 Caracterización básica de las mezclas de alimentación y contenido de los reactores SM_M5 y SM_M8 al comenzar la estabilización.....</i>	<i>170</i>
<i>Tabla 7.2 Identificación de señales del espectro de resonancia ^1H RMN.</i>	<i>178</i>

La obtención de energía es un factor clave para el desarrollo de la actividad humana. En las últimas décadas, su demanda se ha cubierto mayoritariamente con fuentes de carácter fósil y no renovable, cuestionando la sostenibilidad del sistema económico global. Por otro lado, el aumento de consumo de todo tipo de materias por la sociedad actual ha incrementado la producción y complejidad de los residuos. Esta problemática ambiental ha de afrontarse para lograr un bienestar social compatible con la capacidad del medio de absorber los impactos producidos.

La digestión anaerobia aplicada a residuos orgánicos es una opción adecuada de gestión y valorización económica gracias al aprovechamiento del biogás producido y a la estabilización del residuo. Sin embargo, este proceso fermentativo suele estar dificultado por diversos factores relativos a la naturaleza del sustrato, como pueden ser el balance de nutrientes, el pH o la presencia de tóxicos e inhibidores. La inclusión de un co-sustrato puede ser una opción válida para conseguir un sustrato-mezcla adecuado al proceso.

Entre los residuos orgánicos, destacan los del sector agroindustrial por su volumen y complejidad, ofreciendo múltiples posibilidades de valorización conjunta. Este trabajo está enfocado a la gestión de los residuos ganaderos (ovino, vacuno y porcino), considerando residuos de la industria alimentaria (peladura de patata y patata frita) y bioenergética (glicerina) como posibles co-sustratos.

En concreto, se llevaron a cabo ensayos de digestión mesofílica en régimen discontinuo de los residuos ganaderos y de procesado de patata. Dentro de los residuos ganaderos, el mayor potencial de biometanización se detectó en el purín porcino. Asimismo, la patata frita residual demostró un potencial de producción de biogás elevado, coherente con su contenido lipídico. En el caso del estiércol vacuno se realizó una comparativa del proceso en régimen mesofílico y termofílico. La cinética del proceso resultó más elevada en el ensayo termofílico, sin embargo el proceso degradativo fue más eficiente en el sistema mesofílico.

En cuanto a la co-digestión, se realizó un estudio de digestión de estiércol ovino con patata residual en continuo, comprobándose la mejora significativa en la producción de gas, en el control de los parámetros de proceso y en la degradación de la materia orgánica con la adición de los co-substratos. También se evaluó la co-digestión de purín porcino suplementado con glicerina a tres relaciones de mezcla, observándose un incremento en la metanización conforme aumenta el contenido en glicerina. Sin embargo, pese a la mejor relación C/N conseguida con el aporte de co-substrato, el contenido de amoníaco superó los niveles considerados como inhibitorios. La concentración de AGVs del lecho de digestión se elevó conforme al contenido en glicerina, contribuyendo a la incapacidad de los sistemas para alcanzar condiciones estables.

Finalmente, se llevó a cabo el seguimiento del proceso de estabilización de los efluentes de digestión mediante análisis térmico y espectrometría de RMN. Con ello se persiguió evaluar el grado de estabilización del efluente y determinar la aplicabilidad de las técnicas mencionadas. El análisis térmico y la espectrometría de RMN aplicada a los digestatos de estiércol vacuno y purín-glicerina permitieron comprobar la densificación de componentes termoestables, complejos nitrogenados y estructuras aromáticas conforme avanzaba el proceso de estabilización. Dada la sencillez de la termogravimetría, es una opción aplicable al seguimiento y control del proceso de estabilización. Por el contrario, el elevado coste de la espectrometría de RMN únicamente permite su aplicación en el ámbito del estudio e investigación del proceso. La evolución del conjunto de parámetros físico-químicos posibilitaron estimar cualitativamente el grado de estabilización alcanzado.

Obtaining energy is a key factor for the development of human activity. In recent decades, demand has been met mostly with no renewable, fossil nature sources, questioning the sustainability of the global economic system. On the other hand, increased consumption of all types of materials for today's society has increased the production and its complexity of wastes. This environmental problem has to be faced to achieve social welfare compatible with environmental capacity to absorb the impacts.

Applying anaerobic digestion to organic waste is an appropriate choice of management and economic recovery through the use of biogas produced and the stabilization of the waste. However, this fermentative process is generally hampered by various factors relating to the nature of the substrate, such as nutrient balance, pH or the presence of toxics and inhibitors. The inclusion of a co-substrate may be an option to get a substrate-mixture appropriate to the process.

Among the organic wastes, agribusiness residues are distinguished by their size and complexity. So, many possibilities for economic recovery are offered managing them together. This work focuses on the management of livestock waste (sheep, cattle and pigs), considering food industry waste (peel potato and potato chip) and bioenergetics (glycerin) as potential co-substrates.

Specifically, batch mesophilic digestion of livestock and processing potato wastes tests were performed. Among livestock wastes, the largest biomethanation potential was localized in pig manure. Also the residual chip demonstrated high potential for biogas production consistent with their lipid content. In the case of cattle manure a comparative process was carried out in mesophilic and thermophilic regime. The kinetics of the process was higher in the thermophilic test, however the degradative process was more efficient in the mesophilic system.

Sheep manure digestion and its co-digestion with residual potato in continuous was studied proving the significant improvement in the gas production, control of the process

parameters and in the degradation of organic matter with the addition of co-substrates. Also the co-digestion of pig manure supplemented with glycerol at three mixing ratios was evaluated, observing an increase in the methanation with increasing glycerin content. However, despite the better C/N ratio achieved by the provision of co-substrate, the ammonia content exceeded the levels of inhibition. The concentration of VFAs on digestion bed was increased according to glycerine content, contributing to the failure of the systems to achieve stable conditions.

Finally monitoring of the stabilization process of the digestion effluent was carried out by thermal analysis and NMR spectrometry. This was pursued evaluate their own stabilization degree of the effluent and determine the applicability of the mentioned techniques. Thermal analysis and NMR spectrometry applied to cattle manure and slurry-glycerine digestates, allowed to show the densification of thermostable components, nitrogen complexes and aromatic structures as stabilization process progressed. Given the simplicity of thermogravimetry, it is an option applicable to the monitoring and control of the stabilization process. In contrast the high cost of NMR spectrometry allows only its application in the field of study and research of the process. The evolution of the set of physicochemical parameters enabled qualitatively estimate the degree of stabilization achieved.

***1. Energía y Residuos:
Hacia una gestión responsable.***

1.1. INTRODUCCIÓN

La **energía** es necesaria para el desarrollo de la actividad humana, bien en forma mecánica, eléctrica o térmica. En las últimas décadas su demanda se ha cubierto mayoritariamente con fuentes de carácter fósil, como el carbón, el gas natural y el petróleo. La sobreexplotación de estos recursos no renovables está cuestionando la sostenibilidad del sistema económico global. Si a este factor unimos que los combustibles fósiles constituyen el aporte de carbono externo al ciclo de la biosfera, y por tanto contribuyen al calentamiento global, se comprende el interés hacia los programas de desarrollo de fuentes de energías renovables que permitan cubrir parte de la demanda futura en condiciones económicas viables.

Por otro lado, el aumento de consumo de todo tipo de materias por la sociedad actual ha generado un notable incremento de la producción y complejidad de los **residuos**. Este hecho constituye en sí mismo el centro de una problemática ambiental que ha de considerarse para lograr un bienestar social coherente con la capacidad del medio de absorber los impactos producidos.

La valorización energética es una forma de gestión de residuos mediante la cual se aprovecha el potencial energético almacenado en los mismos y se reduce la cantidad de

materia a ser desechada finalmente. Tal es el caso de la digestión anaerobia aplicada a residuos orgánicos, que permite generar una corriente de biogás (biocombustible) reduciendo el contenido orgánico. Se trata por tanto de una técnica que aúna esfuerzos para una gestión energética y de residuos racional.

1.2. LAS ENERGÍAS RENOVABLES

Los sistemas económicos occidentales han incrementado en los últimos años el abastecimiento energético mediante **energías alternativas**. Esta tendencia presenta un doble origen: por un lado está la voluntad de minimizar los impactos sobre el medio ambiente y por otro la necesidad de incrementar el autoabastecimiento energético reduciendo la dependencia exterior. En la Unión Europea, la **Directiva 2009/28/CE** marca los objetivos a cumplir en introducción de energías renovales hasta 2020. El seguimiento en el cumplimiento de los objetivos se establece por bienios, siendo la cuota de energía renovable para España en el año 2020 del 20%.

Las Figuras 1.1 y 1.2 resumen la situación de partida de España, en cuanto a consumo final bruto de energía y estructura de la producción eléctrica, para conseguir los objetivos perseguidos en la Directiva 2009/28/CE.

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.1. Consumo final bruto de energía en 2010.

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.2. Estructura de producción eléctrica en 2010.

La aportación de las energías renovables al consumo final bruto en España se fija para el año 2020 en un 20%, mientras que el aporte de las renovables a la producción de energía eléctrica debe alcanzar el 40%. Además el seguimiento para el cumplimiento de la directiva establece que el consumo final bruto de energía renovable será del 10,96% en 2012, 12,09% en 2014, 13,79% en 2016 y 16,05% en 2018.

En base a esto y según se expone en la Figura 1.1, el resultado de 2010 sobrepasa el objetivo marcado por la Directiva 2009/28/CE para el bienio 2013 – 2014. De hecho, el Informe de Previsión del Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE) estima que el avance en el cumplimiento del actual Plan de Acción Nacional de Energías Renovables permitirá en 2020 contar con una participación de las energías renovables en el consumo final bruto del 22,7% y un 42,3% de participación de las energías renovables en la producción eléctrica (MITyC, 2010a).

La planificación de la estructura de producción eléctrica recogida en el Plan de Acción Nacional de Energías Renovables 2011 – 2020 es la expuesta en las Figuras 1.3, 1.4 y 1.5. De todos modos la actual crisis económica puede alterar la evolución de estas previsiones.

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.3. Consumo final bruto de electricidad renovable (desglose).

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.4. Consumo final bruto de energías renovables para calefacción / refrigeración.

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.5. Consumo final de energías renovables en el transporte.

Según estas previsiones, el consumo final bruto de electricidad renovable experimentará un crecimiento del 70%, pasando de 85.149 GWh en 2010 a 144.825 GWh en 2020. Destaca la aparición en escena de la solar termoeléctrica y del grupo compuesto por la eólica marina, la geotérmica, la energía del mar y el biogás. En términos absolutos la energía renovable que mayor incremento en consumo final bruto experimente será la eólica terrestre.

En el sector calefacción – refrigeración se prevé un aumento del aporte de las energías renovables del 36%, destacando el incremento del 350% en el caso de la energía solar térmica. En términos absolutos, el mayor incremento lo experimentará el sector de la biomasa.

Por último, según se indica en la Figura 1.5, el incremento de las energías alternativas en el sector del transporte será del 209%, correspondiendo al uso del biodiesel el mayor avance en términos absolutos.

1.3. LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES: LA INDUSTRIA GANADERA, AGROALIMENTARIA Y BIOENERGÉTICA

La agroindustria se define como el conjunto de actividades de manufacturación mediante las cuales se elaboran materias primas y productos derivados del sector agrícola. Por tanto la agroindustria se refiere a la transformación de productos procedentes de la agricultura, la ganadería, la actividad forestal y la pesca (FAO, 1997).

Es evidente que las actividades acogidas a esta definición forman un grupo muy variado: desde la extracción de las materias primas hasta la producción de artículos manufacturados como textiles, transformados alimentarios o papel.

Una primera clasificación de la agroindustria distingue entre industrias alimentarias e industrias no alimentarias (FAO, 1997). El primer grupo engloba tareas más o menos homogéneas relacionadas con la conservación de las cosechas o cría de animales y la elaboración de la amplia gama de productos alimenticios. En contraposición, la agroindustria no alimentaria cumple cometidos muy dispares, requiriendo generalmente un alto grado de elaboración.

Pese a su importante contribución al desarrollo de una sociedad, la agroindustria puede tener también efectos colaterales perjudiciales para el medio ambiente. Como cualquier actividad productiva, sin un adecuado control y gestión, la agroindustria puede entrañar riesgos ecológicos o generar impactos ambientales de todo tipo: vertidos perjudiciales en los medios hídricos o edáficos, emisiones tóxicas o degradativas de la calidad del aire, producción de importantes volúmenes de residuos o generación de ambientes de trabajo peligrosos para la seguridad y salud de los operarios.

En España las estimaciones de producción de residuos vegetales, residuos de la transformación de productos agrícolas y ganaderos y los residuos generados por la industria de biocarburantes superaron los 4,5 millones de toneladas en el año 2008. En el caso del sector ganadero se superaron los 74,2 millones de toneladas de estiércoles y purines, lo que da idea de la problemática en su gestión (MARM, 2010b).

1.3.1. Los residuos ganaderos y su problemática

La gestión de los subproductos animales desde el momento en que se generan hasta su uso final, valorización o destrucción está regulada para garantizar que durante la misma no se generan riesgos para la salud humana, la sanidad animal o el medio ambiente y especialmente para garantizar la seguridad de la cadena alimentaria humana y animal. Así pues, el Reglamento (CE) N° 1069/2009 que regula el manejo de los SANDACH¹ y sus derivados, los clasifica en tres categorías atendiendo a su grado de peligrosidad.

En este estudio se va a considerar como residuos ganaderos aquellos restos orgánicos procedentes de las explotaciones ganaderas intensivas y que podrían ser susceptibles de valorización energética conforme al mencionado Reglamento (CE) n° 1069/2009. Se trataría de SANDACH tales como estiércoles, lisieres, purines, gallinaza y similares, además de las aguas residuales de limpieza que se unen a ellos, y en algunos casos las aguas de lluvia por su vertido en balsas. Por tanto se identifican los siguientes tipos (JCyL, 2010):

- **Purín o purines:** Deyecciones fluidas de los alojamientos del ganado y aguas de limpieza. El purín se suele identificar con las deyecciones porcinas. El purín es quizá el más conocido por su problemática en las explotaciones intensivas que no disponen de terreno suficiente para su valorización agronómica.
- **Estiércol y lisieres:** Deyecciones líquidas, sólidas y la mezcla de las camas y aguas de lavado. Se suelen identificar con la producida por el ganado vacuno.
- **Gallinaza:** Deyecciones sólidas y líquidas, restos de alimentos, plumas y huevos rotos de las granjas.

Los sistemas de producción ganadera tienden a la intensificación de las explotaciones, produciéndose enormes cantidades de residuos. A esta circunstancia debe añadirse la heterogénea distribución geográfica, que en determinadas regiones llega a colapsar la capacidad del medio agrícola para integrar los residuos ganaderos como fertilizantes.

¹ Subproductos Animales No Destinados al Consumo Humano.

Las deyecciones ganaderas deben ser gestionadas bajo apropiadas técnicas que minimicen los riesgos sanitarios y los impactos ambientales tales como emisiones atmosféricas, dispersión de olor o daños en aguas y suelos (Burton y Turner, 2003). Entre las emisiones atmosféricas hay que destacar los gases de efecto invernadero típicos de residuos ganaderos como son el metano y el óxido nitroso. A su vez los impactos de estiércoles y purines sobre aguas y suelos se concentran principalmente en la dispersión de amoníaco y nitratos, por su potencial efecto de acidificación del medio o eutrofización de aguas (Vervoort *et al.*, 1998).

Dada la dimensión de esta problemática ambiental se hace cada vez más necesario el tratamiento intensivo de los residuos ganaderos, planteándose su valoración energética como la mejor solución para su gestión.

A continuación se exponen los distintos tipos de residuos ganaderos que se van a utilizar en este estudio.

1.3.1.1. Purín porcino

Este residuo ganadero se genera a partir de las deyecciones animales, restos de alimentos, agua en proporción variable y en su caso, restos de materiales de lecho. Todos estos componentes proceden del sistema productivo aplicado en cada explotación porcina, resultando un residuo de consistencia fluida con un contenido en materia seca normalmente inferior al 5%.

La intensificación de la industria porcina europea ha concentrado las explotaciones en áreas limitadas para reducir costes de producción. España produce unos 40 millones de cerdos al año, centrándose dicha producción en las provincias de Zaragoza, Huesca, Lérida, Murcia, Barcelona, Segovia y Teruel (MARM, 2010c). Dicha producción generó 4.452 millones de euros en 2010, lo que supuso el 35,2% de la producción final ganadera (PFG) (MARM, 2011). El Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino cifra la producción de purín porcino en 46 millones de toneladas anuales, lo que supone el 35,2% del total de residuos ganaderos, y el 61,9% si se considera únicamente los purines y estiércoles generados en ganadería intensiva (MARM, 2010b).

Una gran parte de los purines se gestiona como fertilizante orgánico vertido directamente sobre la superficie agrícola. Y es que aplicado en su justa medida constituyen una adecuada enmienda orgánica, incrementando el rendimiento de los cultivos. No obstante, el contenido en nutrientes del purín es muy heterogéneo (Scotford *et al.*, 1999; Moral *et al.*, 2005). Su contenido en nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) varía en función del régimen de estabulación, el tipo de alimentación, la raza, la configuración de las instalaciones, el tiempo de permanencia en la balsa o la época de aplicación.

De todos modos, la mencionada tendencia de las instalaciones a intensificar la producción, supone una ventaja para aplicar tecnologías específicas de tratamiento de residuos, en aquellos casos en que no se dispone de superficie agrícola suficiente en las inmediaciones de la granja (Tregaro y Lossouarn, 2004; Bernet y Béline, 2009).

1.3.1.2. Estiércol ovino

La mayor parte del censo ovino mundial es explotado en base a la utilización de zonas de pastoreo, es decir en régimen extensivo, lo que supone la integración de recursos vegetales no utilizables directamente por el hombre en el ciclo económico (Morley, 1981). España, con 37,4 millones de hectáreas susceptibles de algún tipo de aprovechamiento pascícola (Montoya, 1983), es uno de los países donde la ganadería ovina es fundamentalmente extensiva (MARM, 2010b), por lo que gran parte de la producción de deyecciones se integra en el medio al dispersarse por los pastizales (San Miguel, 2002). De todas formas existen ganaderías ovinas intensivas, tanto de ordeño como cárnicas, donde la producción de estiércoles requiere su gestión.

El sector ovino español representa el 8% de la producción final del sector ganadero, con una cabaña ganadera de 18,5 millones de cabezas (MARM, 2009a). Se calcula que la producción diaria de deyecciones líquidas y sólidas por unidad de ganado ovino se sitúa entre 1,5 y 2,5 kg (MAPA, 1994). Esta cifra debe incrementarse al menos un 20% si se considera el material de encamado (Buxadé, 1996), situándose la producción unitaria de estiércol máxima en 4,8 kg diarios (García Lara, 1986).

De forma global, según datos del MARM (2009a), la producción de estiércol ovino total durante el año 2008 se estima en 11,5 millones de toneladas (8,9% de los residuos

ganaderos totales). Y es que la producción y las características de este residuo dependen del tipo y calidad de ración ingerida, el material de cama aportado, la proporción de orina y líquidos, el régimen de estabulación, las características de las instalaciones, el tiempo de almacenamiento o el grado de fermentación (Buxadé, 1996).

1.3.1.3. Estiércol bovino

El sector bovino en España ha experimentado la tendencia propia de los países industrializados en que el sector productivo, empujado por la globalización de los mercados agrícolas y el aumento de la competencia, han experimentado un cambio hacia la especialización e incremento del tamaño de las explotaciones (Sorensen *et al.*, 2006). Este es el origen de la marcada diferenciación de los sistemas productivos cárnico y lechero de los últimos años. El sector lechero, pese a estar bajo producción limitada por la Política Agraria Común, generó en 2009 en torno a 3.000 millones de euros, lo que supuso el 23,7% de la PFG. A su vez, el sector cárnico de vacuno generó 1,930 millones de euros, que suponen el 15,2% de la PFG en dicho año (MARM, 2010a).

Según el censo de ganado bovino en noviembre de 2010, la cabaña ganadera de vacuno española se situaba en 6,075 millones de animales, destinándose a la producción de leche un 30%, y a la producción cárnica el 70% restante (MARM, 2009b y MARM, 2010e). La producción unitaria de estiércol es diferente en ambos sistemas productivos. Según cálculos realizados a partir de estudios de Krich (2005), las vacas lecheras generan una media de 2.120 kg de estiércol seco por animal y año. Considerando un contenido medio en sólidos del 15%, se tiene una producción aproximada de 14.133 Kg por animal y año o 38,7 kg por animal y día. Este valor es similar al recogido por otras fuentes, de 40 l por animal y día (Brown *et al.*, 2007; USDA, 1992). A su vez Row y Neabel (2005) fijan en 1.200 kg la producción de estiércol seco por animal y año en el caso específico de ganado vacuno de carne.

Según datos del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino la producción de estiércol estimada para la cabaña vacuna española en 2008 fue de 64,6 millones de toneladas y año, lo que supone el 49,5% de la producción total de estiércoles y purines. Puesto que el verdadero problema de gestión lo plantea el residuo generado por la ganadería intensiva, la producción de estiércol se reduce entonces a 26,5 millones de

toneladas anuales: 18,5 millones de toneladas anuales provenientes de las explotaciones lecheras y 8,0 millones de toneladas anuales de las instalaciones cárnicas intensivas, lo que supone respectivamente el 24,9 y 10,8% del total de estiércol y purín generados por la industria ganadera intensiva (MARM, 2010b; MARM, 2010c).

1.3.2. Los residuos agroalimentarios

La industria agroalimentaria es la principal actividad de la industria manufacturera europea, representando el 13% de su facturación total y un valor superior a 965.000 millones de euros (CIAA, 2009).

Igualmente en España la Industria de productos alimentarios y de bebidas es la primera rama industrial según la Encuesta Industrial de Empresas del INE (2009). Desempeña un papel clave como principal consumidor del sector agrario, aportando valor añadido a la producción primaria. Representa el 20,1% de las ventas netas de producto y el 16,6% del empleo industrial. En datos absolutos el importe total de la industria agroalimentaria en 2009 deparó 80.177 millones de euros empleando a 445.475 personas.

En Castilla y León la producción de residuos por la industria agroalimentaria se estima en 2,09 millones de toneladas para el año 2011, de las que 0,22 millones de toneladas podrían ser valorizables energéticamente (JCyL, 2010).

En este estudio se va a trabajar con fracciones residuales de patata, procedente de una industria de elaboración de aperitivos.

1.3.3. Los residuos de los biocombustibles: el biodiesel y la glicerina

Biocombustibles son aquellos combustibles obtenidos directa o indirectamente a partir de biomasa, fabricados con el interés de optimizar la planificación energética. Una primera clasificación establece los siguientes tres grupos atendiendo al estado de su materia (JCyL, 2010):

- **Biocombustibles sólidos:** Se utilizan básicamente para producir energía térmica, destacando el carbón vegetal resultado de una combustión parcial de la misma y el pellet obtenido mediante triturado, secado, molido y granulado de biomasa.

- **Biocarburantes líquidos:** se pueden integrar junto a los combustibles líquidos convencionales, siendo su orientación principal la automoción. El biodiesel procede de semillas oleaginosas o directamente de aceite vegetal y el bioetanol de materia vegetal azucarada, amilácea o lignocelulósica.
- Biocombustibles gaseosos, el **biogás:** con múltiples orígenes y composiciones, se obtiene de tratamientos bioquímicos y su utilización es posible en cualquiera de las tres aplicaciones energéticas, destacando la generación eléctrica.

El tipo de biocombustible, su disponibilidad en cantidad, calidad y precio, la tecnología aplicable y las necesidades energéticas del usuario final, son los factores determinantes a la hora de derivar cada material de partida hacia un uso energético determinado.

De acuerdo con los datos de la Agencia Internacional de la Energía (AIE), los biocarburantes cubrieron en 2010 el 2,08% de la oferta mundial de petróleo. Los principales mercados de bioetanol son el norteamericano y el brasileño, mientras que el mayor consumo de biodiesel se produce en la Unión Europea (MITyC, 2010b).

En el marco de la Unión Europea la Directiva 2009/28/CE establece las bases para el fomento de biocarburantes y combustibles renovables, persiguiendo el objetivo del 10% al finalizar el año 2020.

En España, la capacidad de producción instalada a finales de 2010 superó los 4 millones de tep, repartidos en 464.000 toneladas de bioetanol (4 plantas) y 4.318.400 toneladas de biodiésel producidas en 47 plantas (MITyC, 2010a). Sin embargo, el sector ha atravesado durante los últimos años una difícil situación, que ha llevado a grandes importaciones y a una producción nacional de algo más de 1,4 millones de tep.

Puesto que en este estudio se va a trabajar con glicerina excedentaria de una fábrica de producción de biodiesel, se procede a describir brevemente el contexto de este biocarburante.

Se denomina **biodiesel** al combustible renovable obtenido por transesterificación de ácidos grasos procedentes de aceites vegetales y/o grasas animales. En España sus especificaciones técnicas se recogen en las normas UNE-EN 14213 (referida a biodiésel para uso en calderas) y en UNE-EN 14214 (referida a vehículos de motor).

Haciendo alusión a su síntesis se distingue entre biodiesel de transesterificación etílica, denominado FAEE (Fatty Acid Ethyl Ester), y el más habitual, biodiesel de transesterificación metílica, denominado FAME (Fatty Acid Methyl Ester).

En la reacción 1.1 se muestra un ejemplo de transesterificación para obtención de biodiesel.

De esta reacción se deriva que la fabricación de biodiesel genera glicerina en proporción de 11 partes en peso por cada 100 de biocarburante. Dada la aplicación del glicerol en la industria de cosméticos, la producción simultánea de este subproducto comenzó siendo un aliciente económico para la fabricación del biocombustible, produciéndose biodiesel como producto principal y generándose una segunda línea de ingresos con la venta de la glicerina. Sin embargo, considerando que en el año 2010 la capacidad de producción de biodiesel instalada en España fue de 4.318.400 toneladas, la capacidad de producción de glicerina es de 475.024 toneladas. Pese a que esta producción no esté a pleno rendimiento se ha colapsado el mercado de la glicerina, provocando el hundimiento de su precio y convirtiéndose en un nuevo residuo a gestionar.

1.4. EL BIOGÁS

Por biogás se entiende el biocombustible generado a partir de la degradación biológica de sustratos orgánicos. Según esta definición, la producción de biogás constituye en sí un apoyo a la solución de la problemática energética y de gestión de residuos expuesta en este capítulo.

Así pues, el biogás obtenido a partir de residuos ricos en materia orgánica, como son los residuos ganaderos, agrícolas o derivados, es una fuente de energía renovable que utiliza la energía contenida en la biomasa, proveniente de la fotosíntesis y por tanto del sol. La combustión del metano para generación térmica o eléctrica, libera CO₂ procedente de formas de carbono biosférico, por lo que el aprovechamiento de biogás tendrá idealmente una emisión nula de este gas. Y aunque en la práctica dicha emisión no sea nula, el balance es menor que en la generación energética mediante combustibles fósiles. De forma paralela a las emisiones evitadas de CO₂, debe situarse el beneficio económico por reducción de los costes de la compra de derechos de emisión para el cumplimiento de los compromisos de España en relación con el Protocolo de Kyoto. Y es que el biogás es un recurso energético que, convenientemente impulsado, puede contribuir a un desarrollo económico, agrícola y rural sostenible y a la protección del medio ambiente, como así reconoce el Parlamento Europeo (2008) en el Informe sobre la agricultura sostenible y el biogás.

1.4.1. Caracterización del biogás

El término biogás engloba la mezcla de gases producidos en las etapas del proceso de digestión de la materia orgánica y en las que intervienen una población heterogénea de microorganismos. Fundamentalmente el biogás está compuesto por metano y dióxido de carbono, mezclado en menor proporción con distintos gases, como se refleja en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Composición orientativa del Biogás.

Metano (CH ₄)	50 – 75%
Dióxido de carbono (CO ₂)	25 – 45%
Vapor de agua (H ₂ O)	1 – 2%
Monóxido de carbono (CO)	0 – 0,3%
Nitrógeno (N ₂)	1 – 5%
Hidrógeno (H ₂)	0 – 3%
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	0,1 – 0,5%
Oxígeno (O ₂)	0,1 – 1,0%

Fuente: MARM, 2010b.

Se puede establecer una clasificación del biogás dependiendo en primer lugar de las instalaciones de generación – captación y en segundo lugar del sustrato orgánico del que proceda (MITyC, 2010b).

- **Biogás de vertedero:** Estas instalaciones permiten su aprovechamiento una vez establecido un adecuado sellado. En este apartado se consideran únicamente los vertederos de residuos sólidos urbanos (RSU).
- **Biogás de digestores:** Los digestores son instalaciones diseñadas exclusivamente para acometer la degradación del sustrato mediante digestión anaerobia. Dependiendo del origen de los sustratos a digerir se consideran tres tipologías principales:
 - Biogás de estaciones depuradoras aguas residuales urbanas, que se genera a partir de la digestión anaerobia de los fangos.
 - Biogás procedente de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU).
 - Biogás procedente de residuos agrícolas, ganaderos o de la industria de su transformación, que se puede agrupar como biogás agroindustrial.

1.4.2. Evolución histórica y situación actual del biogás

Hasta los años 90 el aprovechamiento del biogás tuvo su mayor referente en instalaciones para desgasificación de vertederos. A partir de entonces comenzó el desarrollo de instalaciones específicas para aprovechamiento y producción de biogás procedente de

residuos orgánicos. En países emergentes como China o India se está utilizando el biogás como herramienta de desarrollo rural que permite el acceso a la energía en zonas desfavorecidas, habiéndose desarrollado tanto plantas industriales para tratamiento de deyecciones ganaderas como digestores de uso doméstico. A nivel supranacional la inclusión de los proyectos relacionados con este biocombustible en los mecanismos de desarrollo limpio del Protocolo de Kioto, puede facilitar el acceso al gran potencial existente (MITyC, 2010b).

En la Figura 1.6 se indica la capacidad instalada de generación eléctrica con biogás en países de la Organización para la cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE).

Fuente: MITyC, 2010b

Figura 1.6. Capacidad energética de biogás instalada en países de la OCDE en MW.

En Europa, la energía primaria procedente del biogás rozó en 2008 las 8 Mtep, superando en 2009 las 8,3 Mtep. El biogás de vertedero contribuyó con un 36,1% del total, seguido por las plantas depuradoras (tanto urbanas como industriales) con un 11,9%, quedando el 52,0% restante para plantas que tratan residuos ganaderos, agrícolas, la FORSU y similares. Alemania y Reino Unido copan más del 70% de la producción primaria, si bien con modelos completamente distintos, promovándose el desarrollo de plantas de tratamiento de residuos agroindustriales y cultivos energéticos en el primer caso, e implantando la desgasificación de vertederos en el caso de Reino Unido.

En cuanto a la generación eléctrica a partir de biogás en la UE se produjeron en 2009 25.170,6 GWh, siendo de nuevo Alemania y Reino Unido los mayores productores con el 49,9 y el 22,2% del total respectivamente (EurObserv'ER, 2010).

Considerando las actuales estrategias comunitarias en materia de gestión de residuos, se prevé el descenso de los residuos biodegradables destinados a vertedero, por lo que la tendencia actual es promover donde haya potencial, que el biogás agroindustrial pase a ser el principal protagonista.

En España, la generación eléctrica mediante biogás en 2010 fue de 186 Ktep y la generación para usos térmicos se situó en 34 Ktep. La potencia eléctrica instalada con biogás en dicho año ascendió a 177 MW, correspondiendo alrededor del 65% de la potencia instalada y del 70% de la generación a biogás de vertedero. Sin embargo estos porcentajes han mostrado una evolución descendente a favor del biogás producido en digestores desde la publicación del Real Decreto 661/2007, en el que se recogía un cambio significativo en el régimen tarifario de las instalaciones de digestión anaerobia.

1.4.3. Potencial de los residuos agroindustriales para la producción de biogás

Para evaluar la capacidad de producción de biogás hay que diferenciar entre potencial total, que considera la producción completa de materias primas susceptibles de ser degradadas, y potencial disponible, que no contabilizaría los materiales cuya recogida y transporte es inviable ni aquellos que presentan formas alternativas de gestión más adecuadas.

En la planificación de las estrategias para la valorización del biogás se hace preciso conocer las perspectivas reales de desarrollo del sector a fin de poder establecer objetivos. Así pues, para la redacción del Plan de Acción Nacional de Energías Renovables 2011 – 2020 (MITyC, 2010b), se ha realizado un estudio técnico del potencial de generación de biogás existente en el país, a fin de definir la estrategia y objetivos para el desarrollo de este recurso. En la Tabla 1.2 se expone a modo de resumen el resultado de esta evaluación.

Tabla 1.2. Potencial de generación de biogás.

	Potencial total (Ktep)	Potencial disponible (Ktep)
Biogás Agroindustrial	3.467,5	1.425,1
Biogás de FORSU	778,1	124,5
Biogás de lodos EDAR	164,4	123,3
Biogás de vertedero	957,9	145,6
Total	4.589,8	1.818,5

Fuente: Pascual et al., 2011

Para calcular la capacidad total de generación de biogás, hay que hacer notar que los potenciales totales del biogás procedente de la FORSU y de vertedero son excluyentes, por lo que no es correcto su sumatorio. Sin embargo sí es correcta la suma de los potenciales disponibles, ya que han sido calculados considerando usos competitivos.

Por lo tanto la capacidad actual de generación de biogás en España se sitúa en 1,8 Mtep, dentro del cual el biogás agroindustrial aporta el 78% de ese potencial. Dentro del conjunto de residuos agroindustriales susceptibles de valorización como biogás, se distinguen cuatro categorías: deyecciones ganaderas, residuos de la industria alimentaria (incluidos SANDACH), residuos de plantas de biocombustibles líquidos y residuos de distribución alimentaria y HORECA².

En la Tabla 1.3 se exponen los potenciales de generación de biogás a partir de substratos residuales de las industrias agroalimentarias.

Tabla 1.3. Potencial de biogás procedente de residuos agroindustriales.

	Potencial total (Ktep)	Potencial disponible (Ktep)
Deyecciones ganaderas	2.925,5	1.130,3
Residuos industria alimentaria	367,5	211,2
Plantas biocombustible	93,3	18,7
Gran distribución y HORECA	81,2	64,9
Total	3.467,5	1.425,1

Fuente: Pascual et al., 2011.

² Residuos de hoteles, restauración y catering

De estos resultados se deriva que sólo 41% del potencial total de los residuos agroindustriales en España son susceptibles de valorización por digestión, y dentro de estos, el 79,3% corresponde a residuos ganaderos.

Basándose en estos resultados el actual Plan de Acción Nacional de Energías Renovables, establece los objetivos de implantación del aprovechamiento de biogás para el periodo 2011 – 2020. En las Figuras 1.7 y 1.8 se detalla la evolución de la potencia instalada y la generación bruta perseguida tanto en el sector eléctrico como el sector calefacción – refrigeración para cumplir los objetivos propuestos.

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.7. Evolución de la potencia instalada y la generación bruta de electricidad perseguida por el PANER 2011 – 2020 en el área de biogás.

Fuente: MITyC, 2010b.

Figura 1.8. Objetivo de generación para usos térmicos basada en biogás.

La evolución prevista para las instalaciones de generación eléctrica a partir de biogás tiene en cuenta que el biogás agroindustrial jugará un papel predominante, y que su actual escasa implantación irá aumentando de forma sustancial a lo largo del periodo de vigencia del plan, hasta suponer más del 50% del total en el año 2020. Además se indica la necesidad de co-digestión de las deyecciones ganaderas con otro tipo de sustratos agroindustriales disponibles en sus proximidades para optimizar la valorización.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

AENOR, 2003. Combustibles para calefacción. Ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME). Requisitos y métodos de ensayo. UNE-EN 14213. Madrid: AENOR.

AENOR, 2010. Combustibles de automoción. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diésel. Requisitos y métodos de ensayo. UNE-EN 14214. Madrid: AENOR.

Bernet, N., Béline, F., 2009. Challenges and innovations on biological treatment of livestock effluents. *Bioresource Technology* 100 - 22, 5431 - 5436.

Brown, B.B., Yiridoe E.K., Gordon, R., 2007. Impact of single versus multiple policy options on the economic feasibility of biogas energy production: Swine and Dairy operations in Nova Scotia. *Energy Policy* 35, 4597 - 4610.

Burton, C.H., Turner, C., 2003. *Manure Management. Treatment strategies for sustainable agriculture*, 2nd edition. Lister & Durling Printers. Bedford (UK).

Buxadé, C., 1996. *Zootecnia, Bases de producción animal. Tomo III: Producción ovina*. Ed. Mundi-Prensa Libros S.A., Madrid.

Confédération des industries agro-alimentaires de l'UE, 2009. *Data & Trends of the European Food and Drink Industry*. Brussels: CIAA.

EurObserv'ER, 2010. *État des Énergies Renouvelables en Europe Édition 2010*. París: EurObserv'ER.

García, J., 1986. El estiércol, una producción subestimada, II Conferencia mundial del merino 3, 155 - 174.

Instituto Nacional de Estadística, 2009. *Encuesta Industrial de Empresas (2009)*. Madrid: INE.

- Junta de Castilla y León, 2010. Plan Regional de Ámbito Sectorial de la Bioenergía de Castilla y León. JCyL, 1 - 186.
- Krich, K., 2005. Biomethane from Dairy Waste: A Sourcebook for the Production and Use of Renewable Natural Gas in California [en línea]. Julio de 2005 [ref. 10 de mayo de 2009]. Disponible en web: <http://www.suscon.org>
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 1994. Pielés de Ovino y Caprino. Secretaría de Producciones y Mercados Ganaderos. Madrid: MAPA.
- Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2007. Real Decreto 661/2007, de 25 de mayo, por el que se regula la actividad de producción de energía eléctrica en régimen especial. Boletín Oficial del Estado, 26 de mayo de 2007, núm 126, 22846 - 22886.
- Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2010a. Informe en relación con la cumplimentación del Artículo 4.3 de la Directiva 2009/28/CE, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. Secretaría de Estado de Energía. Subdirección General de Relaciones Energéticas Internacionales. Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE). Madrid: MITyC.
- Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2010b. Plan de Acción Nacional de Energías Renovables 2011-2020. Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE). Madrid: MITyC.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009a. Caracterización del sector ovino y Caprino en España Año 2009. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. Subdirección General de Productos Ganaderos. Madrid: MARM.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009b. Sector de leche y productos lácteos año 2008. Subdirección General de Productos Ganaderos. Madrid: MARM.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010a. Caracterización del sector vacuno de carne en España año 2009. Subdirección General de Productos Ganaderos. Madrid: MARM.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010b. El Sector del Biogás Agroindustrial en España. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. Madrid: MARM.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010c. Encuestas de sacrificio de ganado. Secretaría General Técnica. Subdirección General de Estadística. Madrid: MARM.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010d. Industria alimentaria 2009 - 2010. Dirección general de industria y mercados alimentarios. Subdirección general de fomento industrial e innovación. Madrid: MARM.

- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010e. Resultados de las encuestas de ganado bovino de noviembre 2010. Secretaría General Técnica. Subdirección General de Estadística. Madrid: MARM.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2011. El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos en 2010. Subdirección General de Productos Ganaderos. Madrid: MARM.
- Montoya, O.J.M., 1983. Pastoralismo Mediterráneo. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Monografías Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza nº 25. Ed. EGRAF. Madrid.
- Moral, R., Pérez-Murcia, M.D., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Paredes, C., 2005. Estimation of nutrient values of pig slurries in Southeast Spain using easily determined properties, *Waste Management* 25, 719 - 725.
- Morley, F.H.W., 1981. Management of grazing systems. In: *Grazing Animal*. Ed. F.H.W. Morley. Elsevier. Netherlands. 379 - 398.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1997. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 1997. *Agricultura* 30, Roma: FAO
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2009. Directiva 2009/28/CE, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 5 de Junio de 2009, L140, 0016 - 0062.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2009. Reglamento (CE) Nº 1069/2009, de 21 de octubre de 2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) Nº 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales). *Diario Oficial de la Unión Europea*, 14 de noviembre de 2009, L300, 1 - 33.
- Parlamento Europeo, 2008. Informe sobre la agricultura sostenible y el biogás: necesidad de revisión de la legislación de la UE [2007/2107(INI)]. Comisión de Agricultura y Desarrollo Rural. Bruselas.
- Pascual, A., Ruiz, B., Gómez, P., Flotats, X., Fernández, B., 2011. Situación y potencial de generación de biogás. Estudio Técnico PER 2011 – 2020. Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE). Madrid: MITyC.
- Row, J., Neabel, D., 2005. Integrated manure utilization system life-cycle value assesment IMUS LCVA Final Report [en línea]. The Pembina Institute, Alberta, octubre de 2005 [ref. 10 de mayo de 2009]. Disponible en web: <http://www.arc.ab.ca/>.

- San Miguel, A., 2002. Pastos naturales españoles. Madrid, Ed. Mundi-Prensa Libros S.A.
- Scotford, I.M., Cumby, T.R., Richards, P.A., Keppel, D., Lenehan, J.J., 1999. Development of an in-line nutrient sensing system for livestock slurries. *Journal of Agricultural Engineering Research* 74, 303 - 316.
- Sorensen, J.T, Edwards, S., Noordhuizen, J., Gunnarsson, S., 2006. Animal production systems in the industrialised world. *Revue Scientifique et Technique* 25, 493 - 503.
- Tregaro, Y., Lossouarn, J., 2004. Dynamique de la production porcine mondiale et européenne: enjeux de localisation et de relations au territoire. In: Séminaire Porcherie Verte, 7 – 8 décembre. La Rochelle, France.
- United States Department of Agriculture (USDA), 1992. Agriculture Waste Management Field Handbook (Part 651). Chapter 4: Agricultural Waste Characteristics. USDA-National Resource Conservation Service, Washington, DC, USA.
- Vervoort, R.W., Radcliffe, D.E., Cabrera, M.L., Latimore, M., 1998. Nutrient losses in surface and subsurface flow from pasture applied poultry litter and composted poultry litter. *Nutrient Cycling Agroecosystem* 50, 287 - 290.

2. Antecedentes y objetivos

2.1. ANTECEDENTES

Las dos técnicas biológicas utilizadas habitualmente para biodegradación de residuos orgánicos son el compostaje y la digestión anaerobia. Ambos están basados en procesos naturales de reciclado de materia-nutrientes, propios de ecosistemas edáficos o de ambientes anóxicos, como es el caso de los ecosistemas bentónicos de cursos de agua o lacustres (Megonigal *et al.*, 2003).

El **compostaje** está enfocado hacia la estabilización de la materia orgánica mediante humificación, es decir, persigue la conversión de la materia orgánica residual en sustancias húmicas complejas de gran estabilidad bioquímica. A su vez, en el proceso de **digestión anaerobia** las moléculas orgánicas complejas son descompuestas en condiciones anóxicas a biogás y otras moléculas sencillas por la acción microbiana, constituyéndose como un modo adecuado de reducir el contenido orgánico de los biorresiduos, generando energía si se dispone de sistemas de valorización de biogás. De esta forma, aunque la digestión anaerobia presenta mayor demanda energética media que el compostaje, el balance

energético final es positivo, constituyéndose como una fuente renovable de energía (Blanco, 2009).

Por otro lado, el compostaje y la biometanización no son alternativas excluyentes al tratamiento de residuos, sino que pueden ser complementarias. La aplicación del compostaje tras la metanización permite obtener secuencialmente biogás y compost, aunque la cantidad de éste último se reduciría en el orden de un 5%, disminuyendo así mismo la demanda de oxígeno, la emisión de calor y la cinética del proceso (Saña, 1999; Blanco, 2009)

2.1.1. Historia de la digestión anaerobia

El desarrollo de la tecnología de digestión anaerobia tiene lugar a principios del siglo XIX vinculándose a la escasez de combustibles. En Europa florece después de la Segunda Guerra Mundial, siendo los tratamientos biológicos y los tratamientos terciarios los principales potenciadores de los incipientes procesos de tratamiento de residuos. A causa de la crisis energética de los setenta, la digestión anaerobia creció significativamente, orientada hacia la producción de biogás como alternativa al petróleo. En la actualidad China e India son los mayores consumidores de biogás del mundo, alcanzando gran auge en las comunidades rurales, donde se producen grandes cantidades de combustible y fertilizante a partir de residuos agroganaderos y domésticos (MITyC, 2010).

A pesar de que se trata de un proceso complejo, que exige un proyecto y una explotación adecuada y profesional, su uso para el tratamiento de los residuos orgánicos y la estabilización de biorresiduos se ha incrementado notablemente (Hansen *et al.*, 1999; Bolzonella *et al.*, 2003). Actualmente, el interés de estas tecnologías está motivado, además de por el elevado precio de los combustibles fósiles, por el empobrecimiento de los suelos agrícolas en materia orgánica, por el encarecimiento de los fertilizantes minerales, y por la creciente sensibilización social hacia los problemas del medio ambiente.

Hay diferentes configuraciones de los procesos de digestión. La primera en ser estudiada fue la **digestión en una fase** o **sencilla**, es decir, aquella en la que todas las etapas de la digestión tienen lugar dentro del mismo medio común. Posteriormente comenzó el

desarrollo de la **digestión en dos fases**, dividiéndose las etapas del proceso en dos compartimentos independientes. Por otro lado atendiendo al contenido en humedad del sustrato a degradar se consideran dos grandes grupos: procesos húmedos o de baja concentración de sólidos y procesos secos o de alta concentración de sólidos.

En los **procesos anaeróbicos de baja concentración de sólidos o húmedos**, la concentración de sólidos suele estar en el intervalo alrededor del 4 al 15% de sólidos totales (ST). Es un proceso muy empleado para tratar la fracción orgánica de los residuos urbanos, residuos animales y residuos agrícolas. Esta alternativa es interesante cuando se dispone de fangos de depuración de aguas residuales que se quieren estabilizar. Los sistemas en húmedo y una sola fase han estado en uso durante décadas para la estabilización anaerobia de los biosólidos producidos en las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (Cuetos, 2007).

En los **procesos anaeróbicos de alta concentración de sólidos o secos**, la concentración de sólidos suele estar en el intervalo 20 – 40% de ST, así que sólo los sustratos muy secos (>50% ST) necesitan ser diluidos con agua del proceso. Esta mayor concentración de sólidos está ligada a una menor necesidad de agua. Por otra parte, la producción de gas por unidad de volumen de reactor es mayor. Esta tecnología partió de la empleada para la digestión de estiércol orgánico, demostrándose que la producción de biogás en sistemas donde los residuos eran mantenidos en su estado sólido original era similar a aquellos diluidos con agua (Cuetos, 2007).

2.1.2. Etapas de la digestión anaerobia

La degradación anaerobia es un proceso complejo en el que intervienen diferentes grupos microbianos, de manera coordinada y secuencial, para descomponer la materia orgánica en condiciones anóxicas. El principal producto obtenido es el **biogás**, cuya riqueza en metano va a depender del residuo degradado y del propio proceso (Coombs, 1990). Además, el producto líquido o sólido remanente (denominado **digerido** o digestato) contiene los componentes orgánicos difíciles de degradar junto con el nitrógeno, fósforo y otros elementos minerales presentes inicialmente en la biomasa (Mata-Álvarez, 2002).

La **interacción cooperativa** de varios grupos fisiológicos de procariotas permite la formación de metano a partir de sustancias de elevado peso molecular, tales como polisacáridos, proteínas y grasas. Los precursores inmediatos del metano son el hidrógeno, el dióxido de carbono (**metanogénesis hidrogenotrófica**) y el ácido acético (**metanogénesis acetoclástica**), los cuales se generan por las actividades de los fermentadores anaerobios (Cuetos, 2007).

El proceso bioquímico de la digestión anaerobia se puede representar mediante la reacción 2.1.

Donde $r + s = m$

Esta simple expresión de degradación de la materia orgánica, refleja en realidad un conjunto de etapas, en serie o serie/paralelo, en las que están implicadas un número considerable de especies bacterianas (Baraza *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, la degradación anaerobia ha sido considerada como un proceso en dos etapas, tal y como muestra el esquema representado en la Figura 2.1: en primer lugar se produce la hidrólisis y fermentación de la materia orgánica compleja, fraccionándose en ácidos orgánicos simples e hidrógeno. A continuación tiene lugar la conversión de ácidos orgánicos en metano (metanogénesis). En base a esto se determina la existencia de dos grandes grupos bacterianos, las bacterias formadoras de ácidos o acidogénicas y las bacterias formadoras de metano o metanogénicas (McCarty, 1981).

Fuente: Cuetos, 2007

Figura 2.1. Esquema del proceso de digestión descrito en dos etapas.

Sin embargo, una descripción más detallada del proceso obliga a considerar hasta cuatro etapas sucesivas (Breure, 1986; Romero, 2002):

- La *hidrólisis*

Las bacterias celulolíticas, bacterias hidrolíticas y bacterias acidógenas excretan exoenzimas, que provocan la **ruptura de los polímeros orgánicos** hasta subunidades más pequeñas, fácilmente transportadas al interior celular. De este modo, las proteínas son hidrolizadas fundamentalmente por las proteasas de las especies de *Clostridium* a proteosas, peptonas, péptidos y aminoácidos; las grasas por lipasas a través de la β -oxidación, a ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y moléculas de glicerol o galactasa; y los polícarbohidratos a azúcares y alcoholes. Después las bacterias fermentativas convierten a estos intermediarios en ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno y dióxido de carbono (Zinder, 1984; Koster, 1989; Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991; Salminen y Rintala, 2002a). La hidrólisis es una etapa indispensable, dado que los microorganismos de las etapas posteriores sólo son capaces de actuar sobre la materia orgánica disuelta, pudiendo considerarse que la velocidad de producción de biogás es proporcional a la velocidad de solubilización de materia orgánica (Fernández-Polanco, 2000); por lo que esta etapa siendo la primera, es generalmente el paso limitante de todos los procesos de digestión anaerobia si el substrato está en forma sólida (Vavilin *et al.*, 2001) o con altas concentraciones de materia orgánica particulada. Por otra parte, los residuos lignocelulósicos se caracterizan por ser un material refractario a la hidrólisis, ya que contienen complejas matrices de celulosa, hemicelulosa y lignina, que tienen efecto limitante en la actividad de los microorganismos o sus enzimas para degradar rápidamente estos materiales, en especial la lignina (Jiménez *et al.*, 1990; Fermor, 1993). Los polímeros de cadena larga de la celulosa y hemicelulosa se hidrolizan a mono o disacáridos por enzimas holocelulóticas extracelulares (Tong *et al.*, 1990).

- La *fase ácida o fermentación acidogénica*

Las bacterias acidificantes transforman la materia orgánica disuelta, originando una gran variedad de productos de fermentación. Los productos finales son principalmente AGV (acetato, propionato, butirato, succinato), así como pequeñas cantidades de ácido láctico y etanol, dióxido de carbono e hidrógeno. La cinética del proceso es relativamente rápida y el pH óptimo bajo. Estos procesos son la base energética de las poblaciones no metanogénicas (Cuetos, 2007).

- *La acetogénesis*

Los componentes más reducidos de la fermentación acidogénica son oxidados, bajo condiciones anaerobias, a ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, que sirven de sustrato a bacterias metanogénicas. Así los AGV (con tres o más carbonos) y los AGCL son oxidados a acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Esta conversión es sólo posible si la presión parcial de hidrógeno se mantiene en valores bajos, con presiones parciales menores de 10^{-3} atm (Zinder, 1984). Esta oxidación es llevada a cabo por bacterias facultativas que viven en estrecha colaboración con las bacterias metanogénicas. Son bacterias sintróficas denominadas “acetógenas” u “organismos protón-reductores obligados” (McCarty, 1981). Se produce también la respiración acetogénica de bicarbonato por bacterias homoacetogénicas. Estas bacterias catabolizan mezclas de dióxido de carbono e hidrógeno a compuestos de carbonos múltiples. Pueden producir ácido acético, pero las bacterias metanogénicas compiten con ellas por el hidrógeno.

- *La fase metanogénica*

Es la etapa final del tratamiento, que implica dos tipos de reacciones: aquellas en las que el dióxido de carbono e hidrógeno se combinan para producir metano y agua, y las que convierten el acetato en metano y dióxido de carbono. Los microorganismos responsables de la primera etapa suelen denominarse utilizadores de hidrógeno o “**hidrogenotróficos**”, mientras que los responsables de la segunda transformación se denominan “**acetoclásticos**”.

La Figura 2.2 representa el diagrama completo de la digestión anaerobia, incluyéndose los principales grupos de microorganismos que intervienen en los diferentes procesos.

Fuente: Massé y Droste, 2000.

Figura 2.2. Esquema de reacciones de la digestión anaerobia de materia orgánica compleja.

2.1.3. Factores que afectan al proceso de digestión anaerobia

Para el correcto funcionamiento del proceso de degradación anaerobia es necesario que las velocidades de transformación metabólica de los diferentes grupos bacterianos estén equilibradas, ya que los productos finales de una etapa son consumidos en la siguiente, dando lugar a una relación simbiótica que estabiliza el proceso. La tolerancia a determinados factores de los diferentes grupos bacterianos implicados es desigual, así las bacterias metanógenas son mucho más sensibles frente a cualquier modificación del medio, por lo que al producirse distorsiones sobre los parámetros de control del sistema sobreviene una acumulación de productos intermedios (en general AGV, AGCL e

hidrógeno) que provocan la acidificación del medio y en consecuencia se produce la paralización del proceso global (Romero *et al.*, 2002).

Aunque no existe unanimidad entre los investigadores sobre las condiciones óptimas y los rangos de oscilación de las variables que afectan a la digestión anaerobia, a continuación de describen brevemente algunos de los parámetros que afectan al proceso de digestión.

2.1.3.1. Temperatura

La estabilidad de la temperatura es de vital importancia para la adecuada interacción y equilibrio de diferentes poblaciones de microorganismos a lo largo del proceso. Una variación de 2-3 °C puede producir un cambio en el sistema, de hecho, los diferentes rangos de temperatura determinan poblaciones de bacterias totalmente diferentes, mayores que un cambio en la población bacteriana inicial. Muchos organismos pueden sobrevivir sólo en rangos estrictos de temperatura, de modo que ésta debería ser cuidadosamente medida. De modo general, los **procesos mesofílicos** operan en el rango de **30-40 °C**, mientras que los **procesos termofílicos** lo hacen en el rango de **45-60 °C**, siendo los óptimos cercanos a 37 y 55 °C respectivamente (Van Lier *et al.*, 2001; Cecchi *et al.*, 2002).

2.1.3.2. Características del substrato y del inóculo

Para el substrato se consideran clave las siguientes propiedades:

- **Solubilidad:** mejora la accesibilidad de los microorganismos.
- **Granulometría y humedad:** determinan las posibilidades de bombeo, tipo y tamaño del digestor.
- **Biodegradabilidad:** si el substrato es poco biodegradable precisará mayores tiempos de resistencia para su degradación, lo que repercutirá en los costes de operación.

- **Concentración de sustrato** en la corriente de entrada al digestor: la dilución del sustrato permitirá ajustar el contenido de sólidos y nutrientes óptimos en el alimento para el funcionamiento del proceso.
- **Estructura y composición química:** el conocimiento de la composición química permite adecuar el balance de nutrientes a las necesidades del proceso, ya que las poblaciones bacterianas involucradas en la digestión requieren un aporte de nutrientes suficiente para poder crecer.

En cuanto al inóculo, es necesario emplear un cultivo bacteriano viable que contenga un amplio espectro de microorganismos, ya que el inóculo se reproduce hasta alcanzar una población microbiana lo suficientemente importante como para poner en óptimo funcionamiento el proceso de arranque del reactor (Pérez *et al.*, 1997).

2.1.3.3. Agitación

Los objetivos que se pretenden alcanzar con la agitación son (Noone, 1990):

- Poner en contacto el influente con la masa bacteriana, y eliminar los metabolitos producidos por la metanogénesis, favoreciendo la salida de los gases.
- Prevenir la formación de espumas, así como la sedimentación en el reactor.
- Intentar evitar la formación de zonas muertas que reducirían el volumen efectivo del reactor, y la formación de caminos preferenciales en función de la hidráulica del sistema.
- Eliminar la estratificación térmica, manteniendo una temperatura uniforme en todo el digestor.

La velocidad de agitación es un factor que puede influir en el desarrollo del proceso, siendo necesario un equilibrio entre la buena homogeneización y la correcta formación de agregados bacterianos (Campos, 2001b). Una velocidad de agitación alta, por encima de

700 rpm puede disminuir ligeramente la producción de biogás (Stafford, 1982), por rotura de los agregados bacterianos o flóculos de bacterias.

2.1.3.4. pH

Para los sistemas anaerobios, el rango de pH en el que se considera que un proceso es estable está entre **6,6 y 7,6**. Sin embargo, los rangos de pH están determinados por la aclimatación de las poblaciones microbianas y puede conseguirse un proceso estable a valores mayores, aunque el valor óptimo de actividad para las bacterias metanogénicas se encuentra en torno a 6,8 (Lay *et al.*, 1997). El pH es uno de los parámetros de diagnóstico de los sistemas anaerobios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el caso de que existan desequilibrios en los sistemas anaerobios, la medida del pH no permite anteponerse o predecir futuros fallos, ya que nos informa de problemas en los digestores una vez que estos se hayan producido. Su papel es fundamental en el equilibrio amonio - amoniaco, por ser el amoniaco libre un importante inhibidor de la fase metanogénicas (Zeeman *et al.*, 1985).

2.1.3.5. Nutrientes

El proceso anaerobio se caracteriza por los bajos requerimientos de nutrientes, frente al aerobio, debido básicamente a los bajos índices de producción de biomasa que presenta. A pesar de ello, la biomasa requiere para su desarrollo del suministro de una serie de nutrientes minerales, además de una fuente de carbono y energía. Entre los nutrientes minerales del sistema anaerobio destacan nitrógeno, azufre, fósforo, hierro, cobalto, níquel, molibdeno, selenio, riboflavina y vitamina B12 (Speece, 1987). Estos nutrientes deben estar en forma directamente asimilable por los microorganismos. Los principales nutrientes son **nitrógeno** y **fósforo** (Fernández-Polanco y García, 2000), considerándose que la **relación C/N** debe oscilar entre 15-35/1 (Hawkes, 1980; Speece, 1987; Llabrés-Luengo y Mata-Álvarez, 1988).

2.1.3.6. Tóxicos e inhibidores

La magnitud de la toxicidad es función de diversos factores, destacando concentración, antagonismos y sinergismos, formación de complejos y aclimatación (Kugelman y Chin,

1971), por lo que una misma sustancia puede considerarse tóxica o sustrato. Frecuentemente la concentración es el único factor que usualmente se considera, lo que lleva a afirmaciones absolutistas, en ocasiones erróneas (Campos, 2001a).

A continuación se describe brevemente los compuestos que más comúnmente presentan problemas de inhibición en la digestión de los residuos utilizados.

- Hidrógeno

Muchos autores consideran que el seguimiento de la concentración de H_2 en el sistema permite predecir desequilibrios en las poblaciones microbianas. Sin embargo, Voolapalli y Stuckey (2001) afirman que se ha dado demasiado énfasis a la importancia del H_2 como parámetro de control. La acumulación de hidrógeno inhibe la β -oxidación (Novak y Carlson, 1970), ya que ésta sólo ocurre si la presión parcial de hidrógeno es baja. Se cree que una concentración de hidrógeno de más de $40 \cdot 10^{-9} M$ es crucial en la regulación del flujo de carbono durante la mineralización de la materia orgánica (Pauss *et al.*, 1990). Concentraciones de hidrógeno mayores dirigirán el flujo de electrones de la producción de metano a la producción de butirato, propionato, lactato o el etanol (Mosey, 1983; Schink, 1997).

- Lípidos

La acumulación de lípidos en el medio de degradación puede convertirse en un obstáculo para el proceso de digestión, siendo frecuentemente los AGCL y los AGV el origen del colapso. El efecto inhibitorio de los lípidos puede ser contrarrestado por la adaptación de los microorganismos oxidadores de los AGCL y AGV, los cuales degradan dichos compuestos a medida que se van produciendo (Angelidaki y Ahring, 1992).

Durante el proceso de hidrólisis, las lipasas extracelulares liberadas por bacterias acidogénicas comienzan la degradación de los lípidos (Masse *et al.*, 2003), pudiéndose generar altas concentraciones transitorias de AGCL. Una acumulación de estas moléculas puede causar la inhibición del proceso de digestión por su toxicidad para acetógenos y metanógenos, precisamente los dos grupos principales en la oxidación de los AGCL a AGV (Hanaki *et al.*, 1981; Hwu *et al.*, 1997; Salminen y Rintala, 2002a).

Por otro lado, la acumulación de AGCL también puede inhibir la digestión anaerobia como consecuencia de la adsorción de estos compuestos alrededor de las partículas de biomasa (Alves *et al.*, 2001; Masse *et al.*, 2002), afectando a los procesos de transporte por flotabilidad de la biomasa en el reactor (Cirne *et al.*, 2007; Hatamoto *et al.*, 2007) e incluso formación de espumas y estratificación del reactor (Broughton *et al.*, 1998; Salminen *et al.*, 2001).

Los AGV constituyen una herramienta importante en la monitorización y control de reactores anaerobios, mostrando rápidas respuestas ante variaciones en el sistema, como sobrecargas orgánicas o introducción de tóxicos (Ahring *et al.*, 1995). El aumento de su concentración está relacionado con la disminución en la producción de biogás (Hill *et al.*, 1987). Y es que diversas citas bibliográficas relacionan el acúmulo de ácidos grasos volátiles con inhibición de varios puntos del proceso de metanogénesis.

La acumulación de propiónico y de acético en el reactor puede provocar inhibición en la acetogénesis (Fukuzaki *et al.*, 1990). A su vez, Barredo y Evison (1991) vinculan la acumulación de propiónico con inhibición de la metanogénesis acetoclástica, mientras que Ahring y Westermann (1988), relacionan la acumulación de acético con inhibición de la acetogénesis a partir de butírico. Sin embargo son necesarias concentraciones de acético superiores a $4000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para afectar la producción de metano (Stafford, 1982; Ahring *et al.*, 1995).

- Nitrógeno

La inhibición de la digestión anaerobia de residuos de alta carga orgánica suele estar también causada por altas concentraciones de amonio (Gallert *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1998), producido en la degradación proteica de residuos ricos en nitrógeno (Wang y Banks, 2003). La dificultad para degradar residuos con gran contenido en nitrógeno se atribuye a su alto contenido de amoníaco total ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), que aunque es un nutriente necesario para las bacterias que intervienen en el proceso de digestión, cuando su concentración excede de un cierto límite puede inhibir la metanogénesis (Zeeman *et al.*, 1985; Angelidaki y Ahring, 1994). La concentración de amoníaco libre (NH_3) se ha propuesto como un componente activo causante de la inhibición por amonio. El nivel de la

concentración total de amonio recogido en la literatura depende de diferentes condiciones como el inóculo, el sustrato, el periodo de operación, el pH y la temperatura. A su vez, la relación entre amoniaco libre y total (reacción 2.2) depende del pH y la temperatura, de acuerdo con la expresión del equilibrio químico de la disolución (Angelidaki y Ahring, 1992, 1993, 1994; Hansen *et al.*, 1998; Calli *et al.*, 2005).

$$\frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_3\text{total}]} = \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{\left(0,09018 + \frac{2729,92}{T}\right)}} \right)^{-1} \quad (2.2)$$

Donde T es la temperatura en K.

Se ha demostrado que poblaciones adaptadas permiten tolerancias de amoniaco de 4,0 g·l⁻¹ (Angelidaki y Ahring, 1993). Tchobanoglous y Burton (1995) y Siegrist *et al.* (2005) señalan que concentraciones de amonio de hasta 5,0 – 8,0 g·l⁻¹ pueden ser toleradas por los microorganismos si el pH es suficientemente bajo.

Sawayama *et al.* (2004), encontraron que la producción de metano decrece a concentraciones de amonio de 6,0 g·l⁻¹ en el seno del digestor, confirmando una mayor toxicidad para los metanógenos frente al resto de poblaciones bacterianas. Hashimoto (1986) sitúa el umbral de toxicidad en 2,5 g·l⁻¹ de amoniaco total en poblaciones no adaptadas. Por otra parte, Hansen *et al.* (1998) y Angelidaki y Ahring (1993) recogen que la metanogénesis es inhibida a concentraciones iniciales de amoniaco libre del rango de 0,1 a 1,1 g·l⁻¹, mientras que Braun *et al.* (1981) situaron como umbral de toxicidad por amoniaco libre 0,15 – 0,20 g·l⁻¹.

Dos mecanismos diferentes se atribuyen a la inhibición de los metanógenos por amonio. En primer lugar, el mecanismo de las enzimas sintetizadoras de metano está directamente inhibido por amoniaco libre, y en segundo lugar, el amoniaco libre difunde pasivamente al medio intracelular convirtiéndose en amonio dadas las condiciones de pH (Calli *et al.*, 2005). Para evitar posibles inhibiciones o colapsos por amonio, los residuos orgánicos generalmente se diluyen con agua, lo que se traduce en un aumento en el tamaño y costes del reactor (Cuetos, 2007). Asimismo, para mejorar la eficiencia del proceso conviene

evitar el aporte de materia con alto contenido de nitrógeno al lecho de digestión (Tada *et al.*, 2005).

- Desinfectantes y antibióticos

Proceden de las tareas de limpieza y desinfección, y su toxicidad depende básicamente, de su concentración, su biodegradabilidad y del tiempo transcurrido desde su uso hasta la puesta en marcha del sistema. Es conocido que los restos de penicilina y tetraciclina tienen un efecto inhibitor sobre el proceso anaerobio, aunque parece existir una buena aclimatación a su presencia (Massé y Droste, 2000).

2.1.4. Co-digestión de biorresiduos

La descompensación de los factores que afectan al proceso de digestión puede provocar su colapso. Frecuentemente la problemática reside en un inadecuado balance de nutrientes en el medio de biodegradación. Para solucionar este problema, muchos autores han propuesto la co-digestión de distintos sustratos para obtener mejores balances de nutrientes en la mezcla resultante.

Los beneficios de la co-digestión incluyen (Sosnowski *et al.*, 2003):

- **Dilución del potencial tóxico** de algunos compuestos.
- Mejora del **balance de nutrientes**.
- **Efectos sinérgicos** entre los microorganismos.
- Posibilidad de **modulación de la carga orgánica** biodegradable.
- Mejora del **rendimiento de producción de biogás**.

La co-digestión presenta un gran interés desde el punto de vista técnico, ya que permitiendo el uso de las instalaciones existentes, incrementa enormemente la producción de biogás, lo que se traduce en una mayor cantidad de energía producida en las unidades de cogeneración.

2.1.5. Estabilización, maduración y humificación de los residuos orgánicos

En el proceso de degradación de residuos mediante digestión se genera un efluente de digerido con una menor carga orgánica que la materia alimentada, derivada del propio tratamiento fermentativo. Uno de los posibles usos de este efluente es la aplicación como enmienda orgánica para suelos de cultivo (Del Borghi *et al.*, 1999; Poggi-Varaldo *et al.*, 1999). Sin embargo, la aplicación de un sustrato biológicamente inestable o inmaduro puede entrañar graves riesgos para los cultivos donde se aplica, como pueden ser el crecimiento de poblaciones fúngicas y bacterianas fitopatógenas que mermen la germinación de las semillas, reduzcan el crecimiento de las plantas, o dañen los cultivos por la competencia por oxígeno (Said-Pullicino y Gigliotti, 2007). Además, la estabilidad biológica también afecta al potencial de generación de olor y de recrecimiento de patógenos y a la producción residual de biogás (Adani *et al.*, 2006).

La estabilidad y madurez de los biorresiduos puede relacionarse con el nivel de actividad microbiana de la biomasa o incluso con el grado de humificación del material, ya que en el proceso de estabilización, la materia orgánica evoluciona hacia estructuras aromáticas complejas, relacionadas con los ácidos húmicos y fúlvicos.

Los términos estabilidad y madurez, a pesar de que con frecuencia se emplean indistintamente en la literatura, no son sinónimos: la **madurez** de un biosólido se refiere al grado de humificación del material, mientras que la **estabilidad** se refiere al nivel de actividad microbiana de la biomasa (Boulter-Bitzer *et al.*, 2006). Haug (1993) define la estabilidad como parámetro inverso a la velocidad de degradación microbiana de la materia orgánica en condiciones aerobias.

De todos modos, a día de hoy no existe un parámetro indicador de la estabilidad aceptado universalmente debido sobre todo a la gran variabilidad que presentan las características químicas de los diferentes biorresiduos. Por otro lado, la mayoría de los métodos aplicados en la evaluación de la madurez de los biosólidos, principalmente el compost, no son concluyentes dadas la complejidad del proceso y la falta de comprensión o apreciación de muchos de sus aspectos (Boulter-Bitzer *et al.*, 2006).

Lasaridi y Stentiford (1998) clasificaron y enumeraron los métodos para medir la estabilidad en compost, clasificación que puede ser extrapolada a los métodos para medir estabilidad en biorresiduos de forma genérica. Es la siguiente:

- Físicos: temperatura de la pila, demanda de aireación, olor y color, densidad óptica del extracto acuoso, etc.
- Químicos: sólidos volátiles, relación C/N, DQO, polisacáridos, sustancias húmicas, etc.
- Biológicos: medidas de respiración (consumo de O₂, producción de CO₂, generación de calor), actividad enzimática (contenido en ATP, germinación de semillas y crecimiento de plantas), etc.

2.1.6. Legislación aplicable al sector del biogás de residuos agroindustriales. Breve revisión

En este apartado se pretende dar una visión básica de los condicionantes normativos relativos al contexto de desarrollo del biogás en España y en Europa, la gestión de residuos valorizables mediante tratamientos biológicos y el aprovechamiento de los digeridos como enmiendas edáficas.

La **Directiva 2009/28/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, **relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables** y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE, establece un marco común de uso de energía procedente de fuentes renovables con el fin de limitar las emisiones de gases de efecto invernadero y fomentar un transporte más limpio.

De esta forma, cada Estado miembro tiene fijado un objetivo relativo a la cuota de energía obtenida de fuentes renovables en el consumo final bruto de energía para 2020, siendo el objetivo para el cómputo global de la unión un 20%. Por otra parte la cuota de energía procedente de fuentes renovables en el sector del transporte debe alcanzar al menos el 10% del consumo final de energía en la misma fecha.

A tal efecto, los estados miembros han debido establecer un plan de acción nacional para 2020 que determine la cuota de energía procedente de fuentes renovables consumida en el transporte, la electricidad y la producción de calor.

El **Plan de Acción Nacional de Energías Renovables de España 2011 - 2020** dirige la estrategia para la consecución de los objetivos marcados por la Directiva 2009/28/CE, que en el caso de España coinciden con los objetivos globales de la Unión: una participación de las fuentes renovables en el consumo final bruto del 20% y un 10% en el sector del transporte.

El **Real Decreto 661/2007**, de 25 de mayo, **por el que se regula la actividad de producción de energía eléctrica en régimen especial**, ha establecido un régimen jurídico y económico para la producción energética en instalaciones de aprovechamiento solar, eólico, geotérmico o marino, centrales hidroeléctricas de potencia inferior a 50 MW, instalaciones que utilicen como energía primaria la biomasa, biocombustibles o residuos susceptibles de valorización energética e instalaciones de cogeneración. Así los sistemas de biogás son incentivados por vía de la remuneración de la energía volcada a la red eléctrica.

En la clasificación de las fuentes de energía renovables considerada en este Real Decreto destacan por su vinculación a la temática de este trabajo la *Categoría b.7*, relativa a *centrales que utilicen como combustible principal biomasa procedente de estiércoles, biocombustibles o biogás procedente de la digestión anaerobia de residuos agrícolas y ganaderos, de residuos biodegradables de instalaciones industriales o de lodos de depuración de aguas residuales, así como el recuperado en los vertederos controlados*, y la *Categoría d)*, relativa a *instalaciones que utilizan la cogeneración para el tratamiento y reducción de residuos de los sectores agrícola, ganadero y de servicios, siempre que supongan un alto rendimiento energético*.

La aplicación de esta norma se ha visto truncada recientemente con la publicación del **Real Decreto-ley 1/2012**, de 27 de enero, donde se establece una moratoria a los procedimientos de preasignación de retribución y a los incentivos económicos para nuevas instalaciones de producción de energía eléctrica a partir de cogeneración, fuentes de energía renovables y residuos, con el objeto de corregir el desequilibrio entre los costes de

producción y el valor de las primas asignadas a la producción de energía en régimen especial.

Como normativa europea de interés en el mercado del biogás, debe citarse la Directiva 2009/73/CE, de 13 de julio, la cual tiene como objetivo establecer normas comunes en materia de transporte, distribución, suministro y almacenamiento de gas natural, gas natural licuado (GNL), biogás y gas obtenido a partir de la biomasa, en los estados miembros.

Por otro lado, la **Directiva 2008/98/CE** se establece con el fin de actualizar la política de gestión de residuos. Con esta herramienta legal la Unión Europea establece un marco jurídico para controlar todo el ciclo de los residuos, desde su producción a su eliminación, centrándose en la valorización y el reciclaje.

En España la **Ley 22/2011**, de 28 de julio, **de residuos y suelos contaminados** transpone la anterior normativa comunitaria al ámbito nacional.

Ambos códigos establecen la denominada “jerarquía de residuos” consistente en ordenar las posibilidades de gestión según el siguiente orden de prioridad:

1º) Prevención.

2º) Preparación para la reutilización.

3º) Reciclado.

4º) Otro tipo de valorización, incluida la valorización energética.

5º) Eliminación.

El ámbito de aplicación de ambas normas excluye:

- Las aguas residuales.
- Las materias fecales, paja y otro material natural, agrícola o silvícola, no peligroso, utilizado en explotaciones agrícolas y ganaderas, en la silvicultura o en la producción de energía a base de esta biomasa.
- Los subproductos animales cubiertos por el Reglamento (CE) N° 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados

no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) N° 1774/2002. No se incluyen en esta excepción, y por tanto se regularán por esta Ley, los subproductos animales y sus productos derivados, cuando se destinen a la incineración, a los vertederos o sean utilizados en una planta de biogás o de compostaje.

Por tanto, la nueva Directiva y Ley de Residuos únicamente son de aplicación a los subproductos de origen animal cuando van a ser procesados en una planta de biogás y también es de aplicación al digestato resultante del proceso de metanización. Se desprende también que a un subproducto de origen animal, como el estiércol, no le son de aplicación dichas normativas cuando es valorizado directamente en la agricultura, pero sí le serían de aplicación al digestato procedente de la metanización del estiércol.

Por otro lado, la Ley de Residuos y Suelos Contaminados define biorresiduo como aquel biodegradable de jardines y parques, residuos alimenticios y de cocina procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de venta al por menor; así como, residuos comparables procedentes de plantas de procesado de alimentos. Se añade también que las autoridades ambientales deben promover su recogida separada para destinarlos al compostaje o a la digestión anaerobia en particular de la fracción vegetal, los biorresiduos de grandes generadores y los biorresiduos generados en los hogares.

El mencionado Reglamento (CE) N° 1069/2009¹ marca las condiciones específicas que deben cumplir los subproductos de origen animal, clasificándolos en tres categorías atendiendo al riesgo para la salud pública y la salud animal. Así mismo se contempla la posibilidad de utilizar estos residuos como materias primas para la obtención de biogás. Para ello se especifican los requisitos relacionados con los pretratamientos necesarios para su utilización como sustrato metanizable, los parámetros de transformación, y las condiciones y destinos posibles del digestato obtenido, en función de la categoría de las materias primas utilizadas.

¹ Las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 1069/2009 se recogen en el Reglamento (UE) N° 142/2011.

El marco legal europeo en materia de fertilizantes está constituido por el **Reglamento (CE) N° 2003/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 2003, **relativo a los abonos**. En España, este Reglamento se ha traspuesto a la normativa nacional mediante el **Real Decreto 824/2005**, de 8 de julio, **sobre productos fertilizantes**, constituyendo además el marco de coordinación con las comunidades autónomas. Hay que mencionar que la aplicación de lodos de depuración en suelos agrícolas esta regulada por la Directiva 86/278/CEE, traspuesta a la normativa española mediante el Real Decreto 1310/90, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario.

Dentro de los objetivos de este Real Decreto 824/2005 está la definición y tipificación de los productos fertilizantes que pueden utilizarse en la agricultura y la jardinería, definir sus especificaciones técnicas, prevenir los riesgos para la salud y el medio ambiente y crear un Registro de productos fertilizantes disponibles en el mercado.

Resulta de especial interés los tres condicionantes expuestos en el *Artículo 4*, relativo a los requisitos de los productos fertilizantes. Son los siguientes:

- a) Que aporte nutrientes a las plantas de manera eficaz o mejore las propiedades del suelo.*
- b) Que se disponga, para el producto, de métodos adecuados de toma de muestras, de análisis y de ensayo para poder comprobar sus riquezas y cualidades.*
- c) Que, en condiciones normales de uso, no produzca efectos perjudiciales para la salud y el medio ambiente.*

Para ello se fijan en los anexos del Real Decreto 824/2005, los contenidos mínimos de nutrientes de cada tipo de fertilizante, la normativa de análisis a aplicar y el procedimiento de etiquetado de abonos y enmiendas.

2.2. OBJETIVOS

En el capítulo introductorio ha quedado patente la necesidad de optimizar la gestión de residuos del sector agroindustrial, los cuales se caracterizan por su enorme diversidad y la tendencia a concentrarse en modernas instalaciones y áreas concretas. Este trabajo está enfocado a la gestión de los residuos ganaderos, ya que suponen en torno al 90% del total generado por la agroindustria en España.

2.2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es la aplicación de la biometanización de residuos ganaderos suplementados con co-substratos procedentes de otras agroindustrias locales (patata y glicerina residuales), evaluando tanto la capacidad de producción de biogás como el grado de estabilización alcanzado por el producto digerido.

2.2.2. Objetivos específicos

Las actividades desarrolladas en este trabajo se han realizado con el fin de dar respuesta a los siguientes objetivos:

- Determinar el rendimiento real y teórico de metanización de los diferentes substratos empleados.
- Estudio de la digestión anaerobia de estiércol ovino y su co-digestión con peladuras de patata y patata frita residual en continuo, con diferentes proporciones de mezcla y carga orgánica aportadas. Evaluación de la influencia del co-substrato en la producción de biogás.
- Estudio de la digestión anaerobia de purín porcino y su co-digestión con glicerina residual en continuo, con diferentes proporciones de mezcla y carga orgánica aportadas. Evaluación de la influencia del co-substrato en la producción de biogás.

- Determinar el potencial de producción de biogás de los digestatos en fase de estabilización.
- Comparación del análisis térmico (TA) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) como técnicas de evaluación y estudio del proceso de estabilización de biosólidos.
- Seguimiento y evaluación del grado de estabilidad alcanzado por el estiércol vacuno durante el proceso de digestión en discontinuo tanto en régimen mesofílico como en termofílico.
- Seguimiento y evaluación del grado de estabilidad alcanzado por el digerido de la mezcla purín - glicerina durante el proceso de estabilización tanto en mesofílico como en régimen térmico ambiental.

2.2.3. Planificación del trabajo

En la Figura 2.3 se representa el esquema general seguido en la elaboración del presente trabajo y su distribución por capítulos.

Figura 2.3. Esquema general de trabajo.

2.3. BIBLIOGRAFÍA

- Adani, F., Ubbiali, C., Genevini, P., 2006. The determination of biological stability of composts using the Dynamic Respiration Index: The results of experience after two years. *Waste Management* 26, 41 - 48.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I., 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiological and Biotechnology* 43, 559 - 565.
- Ahring, B.K., Westermann, P., 1988. Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2393 - 2397.
- Alves, M.M., Mota, J.A., Álvares, R.M., Pereira, M.A., Mota, M., 2001. Effects of lipids and oleic acid in biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: Oleic acid toxicity and biodegradability. *Water Research* 35, 264 - 270.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1992. Effect of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 808 - 812.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1993. Anaerobic thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 560 - 564.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research* 28 - 3, 727 - 731.
- Angelidaki, I., Petersen, S.P., Ahring, B., 1990. Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 469 - 472.
- Baraza, J., 2003. Contribución al estudio del tratamiento integrado de residuos municipales en un vertedero. Director: Joan Mata Álvarez [Tesis doctoral]. Universidad de Barcelona.
- Barredo, M.S., Evison, L.M., 1991. Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1764 - 1769.
- Blanco, D., 2009. Tratamiento biológico aerobio-anaerobio-aerobio de residuos ganaderos para la obtención de biogas y compost. Directores: Antonio Morán Palao y Luis Fernando Calvo Prieto [Tesis Doctoral]. Universidad de León.
- Bolzonella, D., Innocenti, L., Pavan, P., Traverso, P., Cecchi, F., 2003. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: focusing on the start-up phase. *Bioresource Technology* 86, 123 - 9.
- Boulter-Bitzer, J.I., Trevors, J.T., Boland, G.J., 2006. A polyphasic approach for assessing maturity and stability in compost intended for suppression of plant

- pathogens. *Applied Soil Ecology* 34, 65 - 81.
- Braun, R., Huber, P., Meyrath, J., 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion, *Biotechnology Letters* 3, 159 - 164.
- Breure, A.M., 1986. Hydrolysis and acidogena fermentation of protein and carbohydrates in anaerobic wastewater treatment. Off. Setduikkerrij, Kanters B.V., Alblaserdam.
- Broughton, M.J., Thiele, J.H., Birch, E.J., Cohen, A., 1998. Anaerobic batch digestion of sheep tallow. *Water Research* 5, 1423 - 1428.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., Yigun, O., 2005. Effect of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochemistry* 40, 1285 - 1292.
- Campos, A.E., 2001a. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Director: Xavier Flotats i Ripoll [Tesis Doctoral]. Universitat de Lleida.
- Campos, A.E., Palatsi, J., Flotats, X., 2001b. Co-digestion of pig slurry and organic wastes from food industry. II International Symposium on Anaerobic of Solid Waste 2, 192 - 195. Barcelona.
- Cecchi, F., Traverso, P., Pavan, P., Bolzonella, D., Innocenti, L., 2002. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. Chapter 6: Characteristics of the OFMSW and behavior of the anaerobic 2002 IWA Publishing.
- Cirne, D.G., Pauloumet, X., Björnsson, L., Alves, M.M., Mattiasson, B., 2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste: Effects of lipid concentration. *Renewable Energy* 32, 965 - 975.
- Consejo de las Comunidades Europeas, 1986. Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuración en agricultura. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 4 de julio de 1986, L 181, 0006 - 0012.
- Coombs, J., 1990. The present and future of anaerobic digestion, in anaerobic digestion: a waste treatment technology. Ed. Wheatley A. Critical reports on applied chemistry 31, 93 - 138. Elsevier applied science LTD.
- Cuetos, M.J., 2007. Digestión y co-digestión anaerobia de residuos de matadero avícola: control del proceso y evaluación del grado de estabilización. Directores: Antonio Morán Palao y Marta Otero Cabero [Tesis Doctoral]. Universidad de León.
- Del Borghi, A., Converti, A., Palazzi, E., Del Borghi, M., 1999. Hydrolysis and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste. *Bioprocess Engineering* 20, 553 - 560.

- Fermor, T.R., 1993. Applied aspects of composting and bioconversion of lignocellulosic materials: an overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 31, 87 - 106.
- Fernández-Polanco, F., García, A., 2000. Procesos biológicos anaerobios. Jornadas sobre tratamientos biológicos de residuos orgánicos. Ingeniería Química, Universidad de Valladolid.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., Nagai, S., 1990. Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 716 - 723.
- Gallert, C., Bauer, S., Winter, J., 1998. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 495 - 501.
- Hanaki, K., Matsuo, T., Nagase, M., 1981. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering* 23, 1591 - 1610.
- Hansen, K.H., Angelidaki I., Aharing B.K., 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research*, 33, 1085 - 1810.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* 32, 5 - 12.
- Hashimoto, A.G., 1986. Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes* 17, 241 - 261.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Yashiro, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2007. Diversity of anaerobic microorganisms involved in long-chain fatty acids degradation in methanogenic sludges revealed by RNA-based stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4119 - 4127.
- Haug, R.T., 1993. The practical handbook of compost engineering. Lewis publishers. CRC Press LLC. Florida.
- Hawkes, D.L., (1980). Factors affecting net energy production from mesophilic anaerobic digestion. *Anaerobic Digestion*, eds D.A. Stratford, B.I. Wheatley and D.E. Hughes, 131 - 50.
- Hill, D.T., Cobb, S.A., Bolte, J.P., 1987. Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digestion failure. *Transaction of the ASAE* 30, 496 - 501.
- Hwu, C-S., Donlon, B., Lettinga, G., 1997. Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Science Technology* 34, 351 - 358.
- Jefatura del Estado. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado, 29 de julio de 2011, núm 181, 85650 - 85705.

- Jefatura del Estado. Real Decreto-ley 1/2012, de 27 de enero, por el que se procede a la suspensión de los procedimientos de preasignación de retribución y a la supresión de los incentivos económicos para nuevas instalaciones de producción de energía eléctrica a partir de cogeneración, fuentes de energía renovables y residuos. Boletín Oficial del Estado, 28 de enero de 2012, núm 24, 8068 - 8072.
- Jiménez, S., Cartagena, M.C., Arce, A., 1990. Influence of lignin on the methanization of lignocellulosic wastes. *Biomass* 21, 43 - 45.
- Koster, I., 1987. Abatement of long chain fatty acid inhibition of methanogenesis by calcium addition. *Biological Wastes* 22, 295 - 301.
- Koster, I., Cramer, A., 1987. Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long chain fatty acids. *Applied Environmental Microbiology* 53, 403 - 409.
- Koster, I.W., 1989. Toxicity in anaerobic digestion with emphasis on the effect of ammonia, sulphide and long-chain fatty acids on methanogenesis. PhD thesis, Wageningen Agricultural University.
- Kugelman, I.J., Chin, K.K., 1971. Toxicity synergism, and antagonism in anaerobic waste treatment processes. *Anaerobic biological treatment processes. Advances in chemistry series, 105.* American Chemical Society. Washington D.C.
- Lalman, J.A., Bagley, D.M., 2000. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Water Research* 34, 4220 - 4228.
- Lasaridi, K.E., Stentiford E.I., 1998 A simple respirometric technique for assessing compost stability. *Water Research* 32, 3717 - 3723.
- Lay, J.J., Li, Y.Y., Noike, T., 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high solids sludge digestion. *Water Research* 31, 1518 - 1524.
- Llabrés-Luengo, P., Mata-Álvarez, J., 1988. Influence of temperature, buffer, composition and straw particle length on the anaerobic digestion of wheat straw-pig manure mixtures. *Resources, Conservation and Recycling*. 1 - 1, 27 - 37.
- Massé, D.I., Droste, R.L., 2000. Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Water Research* 34, 3087 - 3106.
- Masse, L., Massé, D.I., Kennedy, K.J., 2003. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Process Biochemistry* 38, 1365 - 1372.
- Masse, L., Massé, D.I., Kennedy, K.J., Chou, S.P., 2002. Neutral fat hydrolysis and long-chain fatty acid oxidation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 43 - 52.

- Mata-Álvarez, J., 2002. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. Chapter 1: Fundamentals of the anaerobic digestion process. 2002 IWA Publishing.
- McCarty, P.L., McKinney, R.E., 1961. Salt toxicity in anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Federation* 33, 399 - 415.
- McCarty, P.L., Young, L.Y., Gossett, J.M., Stuckey D.C., Healy Jr, J.B., 1981. Heat treatment for increasing yields from organic materials. H.G. Schlegel and J. Barnere (Eds.) *Microbial Energy Conversion*, Göttingen, 179 - 199.
- Megonigal, J. P., Hines, M. E., Visscher, P. T., 2003. Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. *Treatise on Geochemistry*, Volume 8, 317 – 424. Ed. Elsevier. New Haven, USA.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1990. Real Decreto 1310/90, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado*, 1 de noviembre de 1990, núm 262, 32339 - 32340.
- Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2007. Real Decreto 661/2007, de 25 de mayo, por el que se regula la actividad de producción de energía eléctrica en régimen especial. *Boletín Oficial del Estado*, 26 de mayo de 2007, núm 126, 22846 - 22886.
- Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, 2010. Plan de Acción Nacional de Energías Renovables 2011-2020. Instituto para la Diversificación y Ahorro Energético (IDAE). Madrid: MITyC.
- Ministerio de la Presidencia, 2005. Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial del Estado*, 19 de julio de 2005, núm 171, 25592.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010. El Sector del Biogás Agroindustrial en España. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. Madrid: MARM.
- Mosey, F.E., 1983. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science Technology* 15, 209 - 232.
- Noone, G.P., 1990. The treatment of domestic wastes in anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science Technology* 15, 209 - 232.
- Novak, J.T., Carlson, D., 1970. The kinetics of the anaerobic long chain fatty acids degradation. *Journal Water Pollution Control Federation* 42, 1932 - 1943.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2003. Reglamento (CE) N° 2003/2003, de 13 de octubre de 2003, relativo a los abonos. *Diario Oficial de la*

Unión Europea, 21 de noviembre de 2003, L304, 1 - 194.

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008. Directiva 2008/98/CE de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. Diario Oficial de la Unión Europea, 22 de Noviembre de 2008, L312, 3 - 30.

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2009. Directiva 2009/73/CE de 13 de julio de 2009, sobre normas comunes para el mercado interior del gas natural y por la que se deroga la Directiva 2003/55/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, 14 de Agosto de 2009, L211, 94 - 136.

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2009. Directiva 2009/28/CE, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, 5 de Junio de 2009, L140, 0016 - 0062.

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2009. Reglamento (CE) N° 1069/2009, de 21 de octubre de 2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) N° 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales). Diario Oficial de la Unión Europea, 14 de noviembre de 2009, L300, 1 - 33.

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2011. Reglamento (CE) N° 142/2011, de 25 de febrero de 2011 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano, y la Directiva 97/78/CE del Consejo en cuanto a determinadas muestras y unidades exentas de los controles veterinarios en la frontera en virtud de la misma

Pauss, A., Samson, R., Guiot, S., 1990. Continuous measurement of dissolved H₂ in an anaerobic reactor using a new hydrogen/air fuel cell detector. *Biotechnology and Bioengineering* 35, 570 - 577.

Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gómez E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Control* 21, 411 - 490.

Pérez, M., Romero, L.I., Sales, D., 1997. Tecnologías anaerobias para la depuración termofílica de vertidos de destilerías vónicas. *Ingeniería del Agua* 4, 7 - 16.

Perle, M., Kimchie, S., Shelef, G., 1995. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Research* 29, 1549 - 1554.

Poggi-Varaldo, H., Trejo, J., Fernández, G., Esparza, F., Caffarel, S., Rinderknecht, N., 1999. Quality of anaerobic compost for soil amendment. *Water Science Technology* 40, 179 - 186.

- Romero, L.I., de la Rubia, M.A., Pérez, M., Sales, D., 2002. Digestión anaerobia termofílica de lodos de EDAR. *Retema* 90, 8 - 22.
- Said-Pullicino, D., Gigliotti, G., 2007. Oxidative biodegradation of dissolved organic matter during composting. *Chemosphere* 68, 1030 - 1040.
- Salminen, E.A., Einola, J., Rintala, J.A., 2001. Characterisation and anaerobic batch degradation of materials accumulating in anaerobic digesters treating poultry slaughterhouse waste. *Environmental Technology* 22, 577 - 585.
- Salminen, E.A., Rintala, J.A., 2002a. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste: a review. *Bioresource Technology* 83, 13 - 26.
- Salminen, E.A., Rintala, J.A., 2002b. Semi-continuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste: effect of hydraulic retention time and loading. *Water Research* 36, 3175 - 3182.
- Saña, J., 1999. Introducción al proceso de compostaje. I simposio nacional de compost y compostaje. Palencia.
- Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K., Yagishita, T., 2004. Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97, 65 - 70.
- Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 262 - 280.
- Siegrist, H., Hunziker, W., Hofer, H., 2005. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste with UF-membrane separation and recycling of permeate after free ammonia stripping. *Water Science Technology* 52, 531 - 536.
- Sosnowski, P., Wieczorek, A., Ladakowicz, S., 2003. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Environmental Research* 7, 609 - 616.
- Speece, R.E., 1987. Nutrient requirements of anaerobic digestion of biomass. Elsevier Applied Science LTD.
- Stafford, D.A., 1982. The effects of mixing and volatile fatty acid concentrations on anaerobic digester performance. *Biomass* 21, 239 - 255.
- Tada, C., Yang, Y., Hanaoka, T., Sonoda, A., Ooi, K., Sawayama, S., 2005. Effect of natural zeolite on methane production for anaerobic digestion of ammonium rich organic sludge. *Bioresource Technology* 96, 459 - 464.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., 1995. Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. En: Diseño de instalaciones para el tratamiento y vertido del fango. Interamericana de España, S.A. Metcalf and Eddy, INC McGraw Hill 865 - 880.

- Tong, X., Smith, L.H., McCarty, P.L., 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass* 21, 239 - 255.
- Van Lier, J.B., Tilche, A., Aharing, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L.W., Len, P., Verstraete, W., 2001. New perspective in anaerobic digestion. *Water Science Technology* 43, 1 - 18.
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y. Rintala, J.A., Liveratos, G., 2001. Simplified hydrolysis models for the optimal desing of two-stage anaerobic digestion. *Water Research* 35, 4247 - 4251.
- Voolapalli, R.K., Stuckey, D.C., 2001. Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads – influence of formate production and H₂ kinetics. *Water Research* 35, 1831 - 1841.
- Wang, Z., Banks, C.J. 2003. Evaluation of a two stage anaerobic digester for the treatment of mixed abattoir wastes. *Process Biochemistry* 38, 1267 - 73.
- Zeeman, G., Wiegant, W.M., Koster-Treffer, M-E., Lettinga, G., 1985. The influence of the total ammonia concentration of the thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes* 14, 19 - 35.
- Zinder, S.H., 1984. Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *ASM News* 50, 294 - 298.

3. Material y métodos

3.1. SUBSTRATOS EMPLEADOS

3.1.1. Residuos ganaderos

Los residuos ganaderos fueron el sustrato principal de todos los ensayos realizados en este trabajo. Se utilizó **purín porcino** y **estiércol ovino** y **vacuno**. Los residuos ganaderos fueron generados a partir de deyecciones, restos de alimentos, material de encamado, y agua en proporciones variables, de lo que se deriva una caracterización prácticamente exclusiva para cada lote de purín y estiércol que será tratada en cada experimento.

3.1.2. Otros residuos agroindustriales

En este estudio se va a trabajar con **patata residual**, procedente de una industria de transformación agroalimentaria, y con **glicerina** excedentaria de una fábrica de producción de biodiesel. Ambos residuos se comentarán en sus respectivos capítulos.

3.1.3. Inóculo

Por inóculo se entiende una suspensión de microorganismos que se transfieren a un medio de cultivo para facilitar su colonización. En biodegradación de residuos la inoculación mejora el rendimiento de los procesos al instalar poblaciones microbianas adaptadas, en este caso, a la fermentación anaerobia. En este trabajo va a ser preciso arrancar tres grupos de ensayos para lo que se utilizan diferentes lotes de **lodo digerido** provenientes de la estación depuradora de aguas residuales (E.D.A.R.) de León. Esta instalación trata un caudal promedio de $4.400 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ dando servicio a aproximadamente 185.000 habitantes y a áreas industriales de León y su alfoz, de manera que en total, las aguas depuradas equivalen a una población de 350.000 habitantes (Saleal, Necso y Pridesa, 2003).

El lodo digerido se toma de la conducción que comunica los sedimentos primarios con el espesador por gravedad. Presenta una concentración promedio en origen de 1,5 – 5% de sólidos totales (ST), aunque el inóculo utilizado para los arranques puede presentar mayor contenido por decantación del mismo. El contenido en sólidos volátiles (SV) es aproximadamente un 70% respecto a los sólidos totales (ST). El contenido en metales pesados y microelementos del lodo se encuentra dentro de los rangos permitidos en la Directiva 86/278/CE¹ y Real Decreto 1310/90². En la Tabla 3.1 se presenta un análisis de los mismos.

Tabla 3.1. Características químicas del lodo digerido utilizado en el estudio.

Materia seca (%)	24	Sodio ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	856
pH	5,5	Hierro ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	22,09
Conductividad ($\text{dS} \cdot \text{m}^{-1}$)	1,72	Manganeso ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	381
Materia orgánica (%)	31,30	Cinc ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	895
Nitrógeno total (%)	4,15	Cobre ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	181
Relación C/N	4,4	Boro ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	75
Fósforo total (%)	1,83	Mercurio ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	1,54
Calcio (%)	3,33	Plomo ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	81
Magnesio (%)	0,46	Níquel ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	30
Potasio (%)	0,82	Cadmio ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	0,92
		Cromo ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	91

¹ Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuración en agricultura.

² Real Decreto 1310/90, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario.

3.2. ENSAYOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DISCONTINUO

En estos ensayos los reactores se llenan una única vez con residuo fresco e inóculo, degradándose el sustrato con la consiguiente formación de biogás. La producción de biogás tiene un comportamiento parejo al crecimiento de las poblaciones bacterianas, en el que se distingue una fase de adaptación al medio (fase lag), la fase de crecimiento exponencial, la fase estacionaria y una fase de declive o muerte celular tal como se muestra en la Figura 3.3.

Los ensayos en discontinuo llevados a cabo en este trabajo son mantenidos hasta que no se detecte producción de biogás, es decir hasta alcanzar la fase de declive.

Los reactores utilizados tienen un volumen de 0,25 l ó 1 l dependiendo del ensayo, relleniéndose con inóculo y sustrato en proporciones deseadas, añadiendo agua hasta alcanzar el volumen de trabajo.

Los reactores de menor volumen o baja producción de gas van a requerir el montaje de dos réplicas: una para medición de volumen y composición de gas y otra para análisis de digerido. Aparte de esto se precisa la instalación de un blanco o control negativo relleno únicamente con inóculo y agua.

La termorregulación del proceso se logra por inmersión de los reactores en baños de agua termostatizada. A su vez la homogenización se consigue con agitadores magnéticos en los reactores de 0,25 l y con agitación manual en los de 1 l.

3.2.1. Ensayos de biodegradabilidad. Producción máxima y teórica de metano

La **producción máxima de metano** que un determinado material orgánico puede proporcionar mediante digestión anaerobia se puede determinar experimentalmente mediante el **ensayo de biodegradabilidad** (Gunaseelan, 2007). Consiste en un proceso de digestión en discontinuo, donde los reactores se llenan una única vez con residuo fresco e inóculo, y se produce el proceso de degradación hasta completar la biometanización. Por tanto este ensayo permite determinar el rendimiento último (B_0) de producción de metano (Moller *et al.*, 2004).

El **rendimiento teórico de producción de metano (B_u)** se puede calcular mediante una aproximación teórica basada en la **fórmula de Buswell** (Buswell y Neave, 1930; Moller *et al.*, 2004 y Sialve *et al.*, 2009). Dicha expresión considera los índices estequiométricos promediados de las biomoléculas y supone la degradación total de los componentes orgánicos fermentables. Estos índices son n , referido al carbono; a , referido al hidrógeno; y b , referido al oxígeno.

La expresión es la siguiente:

$$B_u \left(\text{lCH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1} \right) = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} \right)}{12n + a + 16b} \cdot 22,4 \quad (3.1)$$

Los estudios realizados por Moller *et al.* (2004) se reflejan en la Tabla 3.2. Consideran la siguiente composición promedio y el potencial de producción bioquímica de metano para las distintas moléculas de interés. En estos resultados se puede apreciar el elevado potencial asignado a los lípidos.

Tabla 3.2. Composición promedio y potencial de producción bioquímica de CH₄ de las principales moléculas de interés.

Lípidos	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	B ₀ = 1014 lCH ₄ ·kgSV ⁻¹
Proteínas	C ₅ H ₇ O ₂ N	B ₀ = 496 lCH ₄ ·kgSV ⁻¹
Carbohidratos	C ₆ H ₁₀ O ₅	B ₀ = 415 lCH ₄ ·kgSV ⁻¹
AGVs:	C ₂ H ₄ O ₂	B ₀ = 370 lCH ₄ ·kgSV ⁻¹

3.3. ENSAYOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN SEMICONTINUO

En este estudio se han empleado dos modelos de reactores de mezcla completa, conocidos por sus siglas en inglés como CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactors*). Ambos modelos difieren en el material de fabricación: vidrio y metacrilato, y en el volumen efectivo: 3 y 5 l respectivamente. Los digestores se mantienen agitados mecánicamente y termostatizados en régimen mesofílico (en torno a 35 °C). Cada reactor está provisto de una toma de fondo y otra superior para la salida de digerido y aporte diario de sustrato. Además otra salida

superior independiente a la de alimentación permite la evacuación del gas producido, conduciéndolo al sistema de medición de volumen.

3.3.1. Banco de ensayos con reactores de 5 litros

Este banco de ensayos está constituido por tres reactores de mezcla completa (CSTR) de 5 l de capacidad individual, agitados mecánicamente y termostatizados a 35 ± 1 °C. Cada reactor está provisto de agitadores modelo RZR 2020 de la casa Heidolph y constan de un dispositivo para la regulación de la velocidad de agitación.

Figura 3.1. Imagen del banco de ensayos con reactores de 5 litros.

Los reactores son de vidrio transparente de 4 mm de espesor montados sobre una estructura autoportante. Están provistos de un encamisado exterior por el que circula agua de calefacción que permite mantener el sistema a una temperatura controlada. Cada reactor tiene una toma de fondo y otra superior, para la salida de digerido y aporte diario de sustrato.

El gas producido en cada reactor se recoge por una abertura superior independiente a la de alimentación y es conducido a un medidor en línea. La medición del volumen de biogás se realiza mediante medidores de desplazamiento de agua de volumen reversible asociados a contadores de contacto húmedo que registran el conteo en la consola de control.

El sistema de calefacción dispone de un depósito de 30 l en el que el agua es calentada a la temperatura deseada con una resistencia eléctrica J.P.Selecta, S.A. de 1 kW de potencia y controlador digital. El agua de calefacción es permanentemente recirculada hacia las camisas con una bomba peristáltica de Dosiper de 45 l·h⁻¹ de caudal.

3.3.2. Banco de ensayos con reactores de 3 litros

Se trata de un banco de ensayos constituido por cinco reactores CSTR de 3 l de capacidad cada uno, agitados mecánicamente y termostatizados a 35 ± 1 °C. Cada reactor está provisto de agitadores de tipo RZR 1 de la casa Heidolph y constan de un dispositivo para la regulación de la velocidad de agitación. Varios temporizadores regulan la distribución de los intervalos de agitación.

Figura 3.2. Esquema del banco de ensayos con reactores de 3 litros y detalle de uno de sus reactores.

Los reactores son de metacrilato transparente de 5 mm de espesor montados sobre una estructura autoportante de acero inoxidable. Un encamisado exterior por el que circula agua de calefacción permite mantener el sistema a temperatura controlada. Cada reactor tiene una toma de fondo, una apertura superior y una apertura lateral, para la salida de la muestra y por donde el sustrato es aportado diariamente, todas ellas dotadas de válvulas de esfera.

El gas producido en cada reactor se recoge por una abertura superior y es conducido a un medidor en línea. La medición del volumen de biogás se realiza mediante medidores de desplazamiento de agua de volumen reversible asociados a contadores de contacto húmedo que registran el conteo en la consola de control.

El sistema de calefacción dispone de un depósito de 60 l en el que el agua es calentada con una resistencia eléctrica de 2,5 kW de potencia. La temperatura en el depósito se mide con una sonda Pt-100 y se regula mediante un controlador digital PID. El agua de calefacción es permanentemente bombeada hacia las camisas con una bomba centrífuga EBAR modelo JESX de 0,37 kW de potencia y desde éstas vuelve al depósito.

3.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.4.1. Análisis Rutinarios

Durante el proceso de digestión anaerobia se llevaron a cabo una serie de análisis de modo periódico para el control del proceso: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), alcalinidad, DQO, amonio, producción y composición del biogás generado y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).

Los análisis de amonio, ST, SV y las mediciones de pH fueron determinados conforme al método estandarizado APHA (1998). Las concentraciones de amoniaco libre se calcularon usando las expresiones propuestas por Hansen *et al.* (1998) y Cali *et al.* (2005). El pH fue medido con un pHmetro Crison GLP22. Para el análisis de la DQO las muestras fueron homogeneizadas y digeridas en presencia de dicromato a 150 °C durante 2 h en un digestor Hanna C9800. Posteriormente este parámetro se determinó bien de forma manual mediante el método titulométrico de sal de Mohr o bien mediante un fotómetro multiparámetro Hanna Instruments Series C99. La producción de biogás se midió generalmente utilizando contadores de desplazamiento reversible de líquido, aunque también fueron utilizados gasómetros de botella. La composición del biogás se midió básicamente mediante cromatografía gaseosa (GC) con un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 GC, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). La columna utilizada era de 4 m de longitud modelo HayeSep Q 80/100 seguida de una columna de

tamiz molecular de 1 m de longitud modelo Molecular Sieve 13 x 80/100 Mesh (1,0 m x 1/8'' x 2,0 m). Las columnas separan metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N₂), hidrógeno (H₂) y oxígeno (O₂). El gas portador fue helio y se operó a 331 kPa y a una temperatura de 50 °C. Aparte de esta técnica de cromatografía se utilizó de forma puntual un analizador modular Mono-Gas® PRONOVA basado en sensores infrarrojos, para el análisis de la composición de biogás.

El contenido en AGV (C2 – C7) se determinó en el anterior cromatógrafo de gas utilizando el autosampler (Varian chrompack 8200 autosampler), el cual está equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar Nukol (30 m x 0.25 mm x 0.25 m) de Supelco. Para ello las muestras de ácidos grasos volátiles se prepararon mediante centrifugado a 3500 x g durante un tiempo condicionado por el tipo de muestra y filtrando el sobrenadante con filtros de celulosa de 0.45 µm. La temperatura del inyector y del detector fueron 200 y 250 °C respectivamente. La temperatura del horno fue de 150 °C durante los 3 minutos iniciales, incrementándose posteriormente hasta 180 °C. Se utilizó helio como gas portador. La calibración se llevó a cabo con una mezcla de AGV de Supelco para análisis de ácidos grasos C2 – C7. El límite de detección en los análisis de AGV fue de 5,0 mg·l⁻¹.

Para el manejo de datos y análisis estadístico se emplearon las aplicaciones informáticas Microsoft Office Excel 2003 e IBM SPSS Statistics 19.

3.4.2. Técnicas de análisis de estabilidad

3.4.2.1. DBO

El consumo de oxígeno demandado por una muestra es un parámetro indicador de estabilidad biológica de aguas, relacionándose dicho oxígeno demandado con la eficiencia de degradación del sustrato.

Esta analítica determina la cantidad de materia susceptible de ser degradada (oxidada) por métodos biológicos a través de la determinación del oxígeno consumido. La cantidad de oxígeno demandada por un lote de muestra durante el proceso de degradación biológica depende del propio tiempo de reacción tal como se muestra en la Figura 3.3. La evolución

de esta cantidad de oxígeno demandada ha de coincidir con la derivada de la curva típica de crecimiento bacteriano. De esta manera la demanda de oxígeno comienza a hacerse patente al comienzo de la fase de crecimiento, estabilizándose el incremento durante la fase de madurez y presentando un comportamiento asintótico al avanzar en la fase de declive. Es preciso por tanto estandarizar un tiempo de ensayo que haga aplicable esta técnica. Para ello se ha considerado la cantidad de oxígeno consumida tras cinco días de análisis (DBO₅).

Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.3. Ejemplo de una curva de crecimiento de la población bacteriana instalada sobre un substrato y evolución del oxígeno consumido.

Para la medición de este parámetro se utilizó el sistema Oxitop®, el cual consiste en un conjunto de incubadores cerrados herméticamente por un sistema-tapón capaz de atrapar el CO₂ generado mediante una trampa de sosa, medir la depresión originada en el interior del incubador, y relacionar dicha depresión con el oxígeno consumido por la muestra. En los incubadores se ha de introducir la muestra diluida en un medio nutritivo cuya fórmula es una adaptación de la propuesta por Chica *et al.* (2003). Su composición es la siguiente: tiourea, como inhibidor de la nitrificación (1,000 g·l⁻¹), Na₂HPO₅·12H₂O (1,339 g·l⁻¹), K₂HPO₄·3H₂O (334 mg·l⁻¹), NH₄Cl (51 mg·l⁻¹), CaCl₂·3½H₂O (328 mg·l⁻¹), Cl₃Fe (663 mg·l⁻¹) y MgSO₄·7H₂O (328 mg·l⁻¹).

La cantidad de muestra a introducir en el incubador se estima a partir del consumo específico de oxígeno previsto, considerando que el nivel de O₂ en la fase gaseosa no puede ser inferior al 10% (Veeken *et al.*, 2003), ya que niveles inferiores convierten la velocidad de difusión de O₂ a la fase acuosa en factor limitante del ensayo. Siguiendo este criterio se prepara una mezcla de 18 ml de muestra y 4,7 ml de medio nutritivo. La incubación de la materia se realiza durante 5 días a 20 ± 1 °C y en ausencia de luz.

3.4.2.2. Análisis termogravimétrico

Los análisis térmicos abarcan una serie de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia en función de la temperatura. Para ello se somete una muestra a un programa de temperatura determinado y en atmósfera controlada. Se distinguen varios métodos térmicos, destacando la termogravimetría (TG) y el análisis térmico diferencial (DTA).

El análisis termogravimétrico ha sido utilizado para investigar la valoración energética de residuos (Díez, 2003), para estudiar la evolución de la materia orgánica durante el compostaje (Melis and Castaldi, 2004) y en este trabajo va a servir como herramienta para evaluar el grado de estabilidad de los digestatos tras la digestión anaerobia (Otero *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2005; Gómez, 2006; Cuetos, 2007). La termogravimetría informa de la ganancia o pérdida de masa de la muestra, cuantificando esta variación, mientras que el DTA informa si un proceso es endotérmico o exotérmico, y a menudo es capaz de medir la variación de energía térmica, que se cuantifica utilizando la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La termogravimetría es una técnica en la cual la masa de una muestra se mide continuamente en función de la temperatura mientras que la muestra está sometida a un programa controlado de calentamiento o enfriamiento. El registro continuo de estos datos permite obtener la curva TG. La termogravimetría derivada (DTG) es una forma de representar los resultados de TG, por medio de la primera derivada de la curva, en función de la temperatura o el tiempo. La curva DTG representa, por tanto, la velocidad de variación de la masa frente a la temperatura o el tiempo (Gómez, 2006)

El análisis térmico bajo atmósfera oxidante se realizó utilizando una termobalanza de TA Instruments, modelo SDT2960, que registra simultáneamente medidas de TG-DTA. En la Figura 3.4 se presenta un esquema del instrumento, que consta de una balanza de precisión, un horno en el que se controla la temperatura y un sistema de registro de la señal.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.4. a) Esquema de la termobalanza utilizada. b) Esquema del horno de la termobalanza.

3.4.2.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de RMN es una técnica analítica que, basada en propiedades mecánico cuánticas de los núcleos atómicos, permite la determinación de determinadas estructuras moleculares. Buddrus *et al.* (1989) realizó un estudio mediante RMN bidimensional aplicado a sustancias húmicas. A su vez Fernández *et al.*, (2008) compararon las propiedades moleculares y estructurales de los ácidos húmicos aislados de lodos de aguas residuales haciendo uso de espectroscopía ^{13}C RMN en conjunto con análisis térmico, resultando una importante presencia de componentes alquilo. Un estudio previo (Gómez *et al.* 2010) propuso las técnicas de espectroscopía de fluorescencia, análisis térmico y ^1H NMR, como herramientas analíticas aptas para seguimiento de las transformaciones sufridas por la materia orgánica durante la digestión de residuos de comida bajo condiciones de operación en semi-continuo y meso y termofílico.

Los núcleos de los isótopos que poseen un número impar de protones, un número impar de neutrones, o ambos, exhiben un efecto mecánico de espín asociado al momento angular. Según se refleja en la Figura 3.5, si los núcleos son irradiados con radiación electromagnética de la frecuencia adecuada, aquellos que se encuentren en el estado de baja energía absorberán un quantum y pasarán al estado de alta energía. Cuando esta transición ocurre, se dice que el núcleo está en resonancia con la radiación aplicada, de aquí el nombre de resonancia magnética nuclear.

Fuente: www.hartford.edu

Figura 3.5. Estado inicial de los núcleos (a) y alineamiento según la orientación del campo magnético (H_0), pasando al estado de alta energía (b).

Las diferentes señales de los espectros de RMN se distribuyen en función del desplazamiento químico (δ), propiedad que describe la dependencia de los niveles de energía magnética del núcleo con el ambiente electrónico de la molécula (Sanders & Hunter, 1994).

Los principales núclidos de interés para detección de estructuras moleculares orgánicas mediante esta técnica son el protón ^1H y el carbono ^{13}C . Adani *et al.*, (2006) seleccionaron la RMN como herramienta analítica capaz de identificar estructuras orgánicas y comparar las distintas concentraciones de los principales grupos funcionales.

La parte fundamental del espectrómetro RMN es el “imán”. En su eje interior se sitúa el vial de introducción de muestras. Consta de un generador de radiofrecuencia y un electroimán capaz de producir un campo magnético de alta intensidad y extremadamente homogéneo. Ambos producirán las condiciones necesarias para la resonancia magnética nuclear. Un Amplificador unido al detector de radiofrecuencia transforma las pequeñas variaciones de energía en corriente eléctrica. A continuación, el inscriptor transcribe la señal eléctrica a espectrografías.

En la Figura 3.6 se representa un modelo de espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

Fuente: www.varianinc.com

Figura 3.6. Esquema de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

Para la realización de las espectrometrías de RMN se utilizó un equipo Bruker Avance 600 spectrometer (5mm TCi cryoprobe, de detección inversa). Las frecuencias nominales fueron 600.13 MHz para ^1H y 150.90 MHz para ^{13}C . Se utilizó DMSO d_6 como patrón interno en todos los espectros. El desplazamiento químico (δ) a 298 K de DMSO d_6 está situado en los ensayos ^1H NMR en torno a 2.49 ppm en el caso de ensayos ^{13}C NMR en torno a 39.5 ppm).

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E., 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 65, 1414 - 1418.
- APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20^a ed. Washington DC: American Public Health Association.
- Buddrus, J., Burba, P., Herzog, H., Lambert, J., 1989. Quantification of partial structures of aquatic humic substances by one- and two-dimensional solution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry* 61, 628 - 631.
- Buswell, E.G., Neave, S.L., 1930. Laboratory studies of sludge digestion. Illinois. Division of State Water Survey, Bulletin N° 30.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., Yenigun, O., 2005. Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochemistry* 40, 1285 - 1292.
- Chica, A., Mohedo, J.J., Martin, M.A., Martin, A., 2003. Determination of the Stability of MSW Compost Using a Respirometric Technique. *Compost Science and Utilization* 11, 169 - 175.
- Clarke, T.C., Scott, J.C., Street, G.B., 1983. Magic angle spinning NMR of conducting polymers. *IBM Journal of Resource Development* 27, 313 - 320.
- Consejo de las Comunidades Europeas, 1986. Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuración en agricultura. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 4 de julio de 1986, L 181, 0006 - 0012.
- Cuetos, M.J., 2007. Digestión y co-digestión anaerobia de residuos de matadero avícola: control del proceso y evaluación del grado de estabilización. Directores: Antonio Morán Palao y Marta Otero Cabero [Tesis Doctoral]. Universidad de León.
- Díez, C., 2003. Valorización energética de neumáticos fuera de uso. Seguimiento cinético del proceso de pirólisis. Directores: Antonio Morán Palao y Oregario Martínez Morán [Tesis doctoral]. Universidad de León.
- Fernández, J.M., Hockaday, W.C., Plaza, C., Polo, A., Hatcher, P.G., 2008. Effects of long-term soil amendment with sewage sludges on soil humic acid thermal and molecular properties. *Chemosphere* 73, 1838 - 1844.
- Gómez, B., 2006. Biometanización de lodo primario de estaciones depuradoras de aguas residuales y su co-digestión con la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Evaluación del grado de estabilización mediante análisis térmico. Directores: Ana Isabel García Pérez y Jorge Cara Jiménez [Tesis Doctoral]. Universidad de León.

- Gómez, X., Cuetos, M.J., García, A.I., Morán, A., 2005. Evaluation of digestate stability from anaerobic processes by thermogravimetric analysis. *Thermochimica Acta* 426, 179 - 184.
- Gómez, X., Cuetos, M.J., Tartakovsky, B., Martínez-Núñez, M.F., Morán, A., 2010. A comparison of analytical techniques for evaluating food waste degradation by anaerobic digestion. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33, 427 - 438.
- Gunaseelan, V., 2007. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition, *Bioresource Technology* 98 - 6, 1270 - 1277.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* 32, 5 - 12.
- Melis, P., Castaldi, P., 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process. *Thermochimica Acta* 413, 209 - 214.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1990. Real Decreto 1310/90, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado*, 1 de noviembre de 1990, núm 262, 32339 - 32340.
- Moller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure, *Biomass Bioenergy* 26, 485 - 495.
- Otero, M., Calvo, L., Estrada B., García, A.I., Morán, A., 2002. Thermogravimetry as a technique for establishing the stabilization progress of sludge from waste-water treatment plants. *Thermochimica Acta* 389, 121 - 132.
- Saleal, Necso, Pridesa, 2003. E.D.A.R. de León y su Alfoz. Ed. Eje Producciones S.L. León.
- Sanders, J.K.M., Hunter, B.K., 1994. Modern NMR spectroscopy (A guide for chemists), 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, *Biotechnology Advances*, 27 - 4, 409 - 416.
- Veeken, A., de Wilde, V., Hamelers, H., 2002. Passively aerated composting of straw-rich pig manure: effect of compost bed porosity. *Compost Science and Utilization* 10, 114 - 128.
- University of Hartford. www.hartford.edu [fecha de consulta: octubre de 2011]
- Agilent Technologies. www.varianinc.com [fecha de consulta: noviembre de 2011]

***4. Ensayos de digestión de estiércol
ovino con residuos de una industria de
procesado de patatas.***

4.1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de residuos orgánicos mediante digestión anaerobia persigue la obtención de biogás valorizable energéticamente, la disminución del residuo generado, su estabilización y el control de patógenos (Salminen y Rintala, 1999). Sin embargo, un inadecuado balance de nutrientes en el substrato puede causar problemas y ser una limitación para la digestión anaerobia. Tal es el caso de residuos con inadecuada relación C/N, caso típico de las deyecciones ganaderas, o con elevado contenido lipídico (Blanco *et al.*, 2010).

La biometanización de residuos del sector agroindustrial parece ofrecer buenas expectativas de desarrollo si se considera la enorme cantidad de residuos producidos así

como su diversidad, que permitiría un amplio abanico de opciones de co-digestión. En este experimento pretendemos estudiar la co-digestión de estiércol ovino con patata residual.

La elección de estos substratos se justifica por un lado, por su disponibilidad y necesidad de gestión a nivel local. La cabaña ganadera ovina en la provincia de León se sitúa en 500.000 cabezas, que equivalen a una producción estimada de estiércol de 293.000 t anuales (JCyL, 2010a; JCyL, 2010b). Así mismo, la empresa Aperitivos Gus S.L. procesa el 14% de la patata frita comercializada en España, produciendo 9.000 t anuales de aperitivos. Como subproductos del proceso aparece una producción anual de 200 t de peladuras de patata y 600 t de patata frita rechazadas por su sistema de control de calidad.

Por otro lado, la inclusión de estos dos tipos de residuos como co-substratos en la digestión de estiércol ovino puede albergar consecuencias positivas para el proceso, debido fundamentalmente a la mejora de la relación C/N del medio de digestión. Para su estudio, se pretende calcular el rendimiento teórico y real de producción de metano, así como determinar rendimientos en ensayos de digestión en régimen semicontinuo.

Para evaluar el efecto de la co-digestión de estiércol con peladuras de patata y con patata frita residual, es precisa la optimización del modo operativo. La carga orgánica es uno de los parámetros principales que se pretende optimizar. También se debe fijar el contenido en ST. Según Da Costa *et al.*, (2008) las plantas de biogás alimentadas sólo o principalmente con estiércol y operadas en mesofílico funcionan con cargas de 2 a 3 $\text{kgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, pero se dimensionan para 3,5 a 4 $\text{kgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. En la práctica, es posible alcanzar cargas mayores, pero para ello es necesario un control de proceso más intensivo.

El contenido óptimo de ST del reactor debe ser de 8 - 9% (Da Costa *et al.*, 2008). Para conseguirlo, Cuetos (2007) y Kaparaju *et al.* (2007) diluyen con agua las alimentaciones. Además debe optimizarse la relación de mezcla estiércol - patata, ya que un exceso de estiércol generaría problemas de inhibición amoniacal, y dada la elevada biodegradabilidad de la patata, su exceso generaría inhibición o inestabilidad por desajustes cinéticos de las etapas de digestión. Se considera que la relación C/N adecuada para procesos fermentativos debe oscilar entre 15 y 35 (Hawkes, 1980; Speece, 1987; Lladrés-Luengo y Mata-Álvarez, 1988).

4.2. OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo son:

- Determinar el rendimiento último y teórico de metanización, así como los rendimientos de producción de biogás en régimen semicontinuo para cada mezcla de estiércol-patata.
- Determinar el modo operativo óptimo para la producción de biogás a partir de la co-digestión de estiércol ovino con residuos de una empresa de fritura de patata, especialmente en cuanto a carga orgánica y relación de mezcla idónea.
- Realizar un estudio comparativo del efecto de la inclusión de patata cruda o patata frita residuales en el proceso de fermentación anaerobia de estiércol ovino.

4.3. MATERIAL Y MÉTODO

4.3.1. Substratos utilizados

El estiércol utilizado en este estudio provino de una instalación ganadera ubicada en La Bañeza (León), perteneciente a la sociedad ganadera Maragata de Vacuno S. C. L.. El estiércol recogido procedía a partes iguales de cordero y oveja de raza assaf en régimen de producción cárnica. Este residuo presentó un contenido medio en sólidos totales (ST) de $23,4 \pm 0,7\%$ en peso, de los cuales un $74,7 \pm 1,4\%$ corresponden a sólidos volátiles (SV). La demanda química de oxígeno (DQO) fue de $133,5 \pm 5,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

El residuo de la industria de procesado de patata fue obtenido en la fábrica de Aperitivos Gus S.L. situada en Riego de la Vega (León). Se utilizaron dos modalidades de este residuo: restos de patata cruda generada en la fase de pelado, y patata frita rechazada tras la fase de freído. El primer sustrato se caracterizó por un contenido en ST de $12,3 \pm 0,3\%$ en peso de los cuales un $86,5 \pm 0,9\%$ corresponde a SV, y una DQO de $25,4 \pm 5,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. A

su vez, la patata frita residual presentó un contenido en ST de $85,8 \pm 0,1\%$ de los que un $94,7 \pm 0,2\%$ son SV. La DQO analizada fue de $1448,4 \pm 3,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Para el arranque de los reactores se utilizó como inóculo lodo digerido proveniente del digestor anaerobio de la estación depuradora de aguas de León. Dicho digestor procesa una mezcla de lodo primario y lodo activo en régimen mesofílico y 26 días de TRH. Este inóculo presentó una concentración de ST de $1,8 \pm 0,1\%$ de los cuales un $66,1 \pm 0,2\%$ son SV.

En la Tabla 4.1 se recoge la caracterización físico - química de los substratos utilizados.

Tabla 4.1. Caracterización físico química de los substratos empleados.

	Estiércol	Patata cruda	Patata frita
Materia orgánica (%)	63,97	83,24	90,54
C orgánico (%)	28,64	37,26	40,53
Nitrógeno total (%)	3,06	2,01	1,24
Relación C/N	12,17	24,04	42,53
Calcio ($\text{cmol}(+)\cdot\text{kg}^{-1}$)	16,16	8,87	0,32
Potasio ($\text{cmol}(+)\cdot\text{kg}^{-1}$)	70,01	93,71	24,91
Magnesio ($\text{cmol}(+)\cdot\text{kg}^{-1}$)	14,98	8,74	2,57
Sodio ($\text{cmol}(+)\cdot\text{kg}^{-1}$)	45,46	1,76	0,36
Cobre ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	4,83	2,70	2,23
Hierro ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	87,93	5,71	5,92
Manganeso ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	37,45	29,88	13,69
Zinc ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	83,56	6,67	7,91
Fósforo total ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	4400	2117	1405
Grasa (%)	-	0,48	44,25
pH	8,43	5,45	5,84
Densidad ($\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) *	1,04	1,01	1,12
Cenizas (%)	8,27	1,45	2,23
DQO ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) *	133,5	25,4	1448,4
N – NH ₃ total ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) *	1045,03	8,93	9,58
N – NH ₃ libre ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) *	2,9297	0,0004	0,0068
ST ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) *	233,7	122,8	858,1
SV ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) *	174,5	106,2	812,6

* Analítica en base fresca.

4.3.2. Rendimiento teórico de producción bioquímica de metano. Fórmula de Buswell

Para obtener el rendimiento teórico de producción bioquímica de metano, se utiliza la fórmula de Buswell. Para ello se precisa determinar la proporción de lípidos, proteínas, carbohidratos fácilmente degradables (excluyen a la lignina) y ácidos grasos volátiles. Esta analítica es aportada para el caso de la peladura de patata y la patata frita residual por el laboratorio de Aperitivos Gus S.L. En el caso del estiércol se consideran las analíticas aportadas por el Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA, 2011) basado en una amplia base de datos. En la Tabla 4.2 se expone el contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos fácilmente degradables y AGVs de las materias empleadas en este experimento.

Tabla.4.2. Contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos fácilmente degradables y AGVs de los substratos.

	Lípidos (g·kgSV ⁻¹)	Proteínas (g·kgSVI ⁻¹)	Carbohidratos (g·kgSV ⁻¹)	AGVs (g·kgSV ⁻¹)
Peladuras de patata	6	180	813	-
Patata frita	338	77	567	-
Estiércol	68	150	433	36

4.3.3. Ensayos de biodegradabilidad

Se empleó como inóculo lodo digerido de la EDAR de León y como substratos estiércol ovino (BdE), peladuras de patata (BdPa) y patata frita residual (BdPf).

Como reactores se emplearon matraces erlenmeyer de 250 ml (Figura 4.1). Cada uno se rellenó con 5 ó 10 g de patata o estiércol, respectivamente y la cantidad de inóculo correspondiente para obtener una relación de SV inóculo/alimentación de 1.

Figura 4.1. Fotografías de reactores (a) y detalle del montaje del baño utilizado (b).

Los reactores se introdujeron en un baño termostatzado a 34 ± 2 °C con agitadores magnéticos (200 rpm) y se mantuvieron en funcionamiento hasta que no se detectó ni producción de gas ni AGV en el efluente analizado (Chynoweth *et al.*, 1993). En los ensayos se emplearon dos réplicas: una para llevar a cabo los análisis rutinarios de la fase líquida y otra para medir el volumen diario de biogás producido y su composición. Al mismo tiempo, existió otro reactor adicional empleado como control negativo (blanco).

Los análisis rutinarios para el control del proceso de digestión anaerobia medidos en el líquido extraído periódicamente fueron: volumen y composición del biogás producido, ST, SV, pH y concentración de AGV.

4.3.4. Ensayos en semicontinuo

Los ensayos de co-digestión de estiércol y patata se llevaron a cabo en el banco de ensayos descrito en el epígrafe 3.3.1.

Para optimizar la relación de mezcla estiércol - patata se ha considerado como antecedente el trabajo realizado por Blanco *et al.* (2010), elaborándose las alimentaciones de estiércol - peladuras de patata y estiércol - patata frita residual a razón de mezcla 3:1 en sólidos volátiles.

Durante el proceso de digestión anaerobia se llevan a cabo una serie de análisis de modo periódico para el control del proceso: pH, ST, SV, alcalinidad, DQO, DBO, amonio,

producción y composición del biogás producido y concentración de AGV. Estos parámetros fueron medidos cada tres días, a excepción de la DQO, que fue medida 2 veces por semana, y la producción y composición de gas que fue medida diariamente. Así mismo se aplicó este conjunto de analíticas a cada lote de alimentación preparada.

Para optimizar la carga orgánica a introducir en los sistemas se fijaron tres niveles de estudio: 2,5, 3,5 y 4 $\text{kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Se dispuso de 3 reactores, en dos de los cuales se modificó el régimen de operación, resultando los 5 sistemas expuestos en la Figura 4.2. De esta manera se permitió la comparación secuencial de los mismos.

		Carga orgánica ($\text{kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)		
		2,5	3,5	4
Substrato	Estiércol	E		
	Estiércol + peladuras de patata	<u>EPa1</u>	<u>EPa2</u>	
	Estiércol + patata frita residual		<u>EPf1</u>	<u>EPf2</u>

Figura 4.2. Diseño experimental por comparativas secuenciales.

La nomenclatura de los reactores es la siguiente: el sistema *E* corresponde con el ensayo de Estiércol a carga orgánica de $2,5 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, *EPa* denomina los sistemas de co-digestión estiércol-peladuras de patata atribuyéndole con los números 1 y 2 las cargas orgánicas de $2,5$ y $3,5 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ respectivamente. Los sistemas de estiércol suplementado con patata frita se denominan *EPf* atribuyéndole los números 1 y 2 las cargas orgánicas de $3,5$ y $4 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ respectivamente.

En la planificación de los ensayos hay que considerar una fase de aclimatación del inóculo de aproximadamente 20 días. Tras ella tiene lugar el arranque inicial en el que se redujo progresivamente el TRH¹ de 50 a 19-32,9 días, en función de la carga orgánica deseada. Una vez conseguidas las condiciones estacionarias de operación se desecharon los análisis del primer TRH, ya que suele presentar un comportamiento inestable.

¹ Tiempo de retención hidráulica.

Considerando las experiencias realizadas por Da Costa *et al.* (2008), Cuetos (2007) y Kaparaju *et al.* (2007), las mezclas alimentadas a cada uno de los reactores contienen un 10% de ST, modulando la cantidad de aporte (y en consecuencia el TRH) para conseguir la carga orgánica deseada. En la Tabla 4.3 se exponen los TRH de cada uno de los ensayos.

Tabla 4.3. Tiempos de retención hidráulica aplicados a cada sistema.

	TRH
E	29,9 días
EPa1	32,9 días
EPa2	23,5 días
EPf1	21,6 días
EPf2	19 días

En la Tabla 4.4 se muestra la caracterización de las alimentaciones introducidas en los 5 experimentos.

Tabla 4.4. Caracterización de las alimentaciones utilizadas.

	E	EPa1	EPa2	EPf1	EPf2
ST g·l ⁻¹	104,2 ± 0,2	103,0 ± 0,3	103,0 ± 0,3	103,1 ± 0,1	103,1 ± 0,1
SV %	72,4 ± 1,2	77,1 ± 2,0	77,1 ± 2,0	77,1 ± 0,1	77,1 ± 0,1
Relación C/N	12,2	14,0	14,0	15,2	15,2
pH	8,43 ± 0,04	7,82 ± 0,02	7,82 ± 0,02	7,67 ± 0,03	7,67 ± 0,03
Alcalinidad total (g·l ⁻¹)	0,45 ± 0,05	0,69 ± 0,06	0,69 ± 0,06	0,44 ± 0,04	0,44 ± 0,04
Amoniaco total (mg·l ⁻¹)	430,0 ± 12,4	324,7 ± 14,2	324,7 ± 14,2	285,7 ± 11,1	285,7 ± 11,1
Amoniaco libre (mg·l ⁻¹)	95,45 ± 2,7	20,07 ± 0,9	20,07 ± 0,9	13,46 ± 0,5	13,46 ± 0,5
DQO (gO ₂ ·l ⁻¹)	54,93 ± 2,18	45,85 ± 2,41	45,85 ± 2,41	37,85 ± 0,18	37,85 ± 0,18
DBO (gO ₂ ·l ⁻¹)	10,30 ± 0,51	13,01 ± 0,79	12,78 ± 0,73	22,34 ± 1,03	22,23 ± 0,92

A continuación se expone el cronograma de los ensayos, observándose que los sistemas EPf1 y EPf2 parten de reactores activados, evitándose la fase de aclimatación del inóculo.

Figura 4.3. Cronograma de los ensayos.

4.3.5. Técnicas analíticas

De forma general, para las analíticas de este experimento se siguen las pautas recogidas en el Capítulo 3 de Material y Método, citándose en este epígrafe las diferencias específicas.

Así pues, la composición del biogás producido en los ensayos de digestión en semicontinuo fue analizada utilizando un analizador modular Mono-Gas® PRONOVA, basado en sensores infrarrojos. La composición del biogás producido en los ensayos en discontinuo se midió mediante cromatografía gaseosa (GC) según lo expuesto en la metodología general.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Rendimiento teórico de producción de metano

La aplicación de la ecuación de Buswell a los 3 sustratos aquí tratados refleja las siguientes producciones máximas teóricas de metano:

Estiércol ovino: $336,6 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kg SV}_{\text{alim}}^{-1}$.

Peladuras de patata: $433,1 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kg SV}_{\text{alim}}^{-1}$.

Patata frita residual: $825,8 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kg SV}_{\text{alim}}^{-1}$.

En estos resultados destaca el elevado potencial de producción de metano calculado para ambos residuos de patata, por lo que su inclusión como co-substrato en la digestión de estiércol incrementará la productividad específica de este gas. Asimismo es destacable el elevado rendimiento teórico calculado para la patata frita residual, el cual radica en su contenido lipídico, dado que según Moller *et al.* (2004) se obtendrían 1014 l CH₄ por cada kgSV de lípidos alimentado.

4.4.2. Ensayos de biodegradabilidad

Como puede observarse en la Tabla 4.1 de caracterización físico química de los substratos, se trata de residuos orgánicos con un alto porcentaje de materia orgánica. Sin embargo, el estiércol presenta una relación C/N de 12,2, inferior por tanto al óptimo referenciado (Hawkes, 1980; Speece, 1987; Llabrés-Luengo y Mata-Álvarez, 1988). A su vez, la patata frita residual es deficitaria en nitrógeno (relación C/N de 42,5). Esta circunstancia hace que a priori las mezclas de estos residuos puedan ser substratos adecuados para la digestión anaerobia. Cabe destacar el alto contenido en grasas de la patata frita, que sugiere que será un residuo con problemas en el control de su digestión pero del que se esperan altas producciones de biogás.

En la Figura 4.4 se representan las gráficas de la producción diaria acumulada de biogás obtenido durante los ensayos. La prolongada fase de retardo o lag del sistema BdPf hasta que comenzó la producción de biogás puede estar relacionada con la tendencia a la acidificación.

El biogás producido en los sistemas presentó un contenido en metano de 65 - 70% para BdE y BdPa y 78% para BdPf. La mayor concentración registrada en el sistema de patata frita puede atribuirse al mayor potencial de metanización derivado del contenido lipídico de este residuo.

Figura 4.4. Producción diaria acumulada de gas de los residuos ensayados.

Para hacer comparables los sistemas se calculó la producción acumulada de metano por unidad de SV alimentados. Los valores que se obtuvieron fueron: $308 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kg SV}_{\text{alim}}^{-1}$ para el reactor BdE, $207 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kg SV}_{\text{alim}}^{-1}$ para BdPa y $784 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kg SV}_{\text{alim}}^{-1}$ para el sistema BdPf.

Así pues, el resultado de los ensayos de biodegradabilidad reflejan rendimientos respectivos para el estiércol y la patata frita un 9 y 5% inferiores respecto al máximo teórico marcado por la expresión de Buswell. Sin embargo, en el caso de las peladuras de patata el resultado de la prueba de biodegradabilidad es un 52% inferior. Hay que destacar que los carbohidratos son el principal constituyente de la patata, y según Moller *et al.* (2004) se obtendrían 415 l CH_4 por cada kgSV de estos carbohidratos. Por otro lado, Gunaseelan (2007) obtuvo un rendimiento máximo de metano de $267 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$. Estas circunstancias evidencian el colapso sufrido en la fermentación, probablemente por acidificación del substrato.

El pH del sistema BdE se mantuvo en torno a 7,5 una vez estabilizado. En el caso de BdPa se observó un comportamiento inestable durante todo el ensayo precisando un control continuo del pH para que se mantuviera en torno a 7 y no se acidificara. Por último, el sistema BdPf requirió control del pH en el comienzo del ensayo, estabilizándose posteriormente en torno a 7,8.

4.4.3. Ensayos en semicontinuo

- Producción de CH_4

La producción de metano de los cinco sistemas se expone en la Tabla de rendimientos 4.5 y en la Figura 4.5. Comparando los sistemas E y EPa1, se tiene que a igual carga orgánica la adición del co-substrato eleva la producción volumétrica y la producción específica de metano un 216% respecto al sistema de estiércol.

Tabla 4.5. Rendimiento de producción de metano.

	Producción volumétrica de metano (l CH ₄ · m ⁻³ · d ⁻¹)	Producción específica de metano (l CH ₄ · kgSV ⁻¹)
E	341,1	135,8
EPa1	735,4	293,6
EPa2	976,9	277,6
EPf1	1307,5	384,4
EPf2	1347,8	327,5

Comparando los dos sistemas de co-digestión de patata, se tiene que en el ensayo EPa2, con un 40% más de carga orgánica, tiene una producción volumétrica de metano un 32,8% superior. Esto supone que la producción específica de metano sea un 5,4% mayor en el sistema de co-digestión alimentado a 2,5 kgSV·m⁻³ frente al de 3,5 kgSV·m⁻³. Dicho de otro modo, el aumento de carga orgánica de 2,5 kgSV·m⁻³ a 3,5 kgSV·m⁻³ reduce la productividad del substrato, alejándola de su máximo, pero aumenta la productividad del sistema de digestión.

Analizando los resultados de los sistemas EPa2 y EPf1, alimentados ambos con la misma carga orgánica, se puede comparar el rendimiento relativo de ambas mezclas. Según se muestra en la Tabla 4.5, la producción volumétrica de metano es un 38% superior en el sistema alimentado con estiércol-patata frita. El incremento en la producción específica de metano es similar, ya que se parte de sistemas alimentados con la misma carga orgánica. Este resultado está en consonancia con los altos valores de metano potencial de la patata frita obtenidos en los ensayos de biodegradabilidad.

Finalmente, comparando los dos sistemas de co-digestión de patata frita a distinta carga orgánica se tienen similares producciones volumétricas pese a la mayor carga de EPf2, siendo la producción específica de metano un 17% menor en dicho sistema. Dicho de otro modo, aunque con ambas cargas orgánicas (3,5 y 4 kgSV·m⁻³·d⁻¹) el aprovechamiento de los digestores es similar en términos de producción volumétrica de gas, la carga orgánica más baja permite mejor aprovechamiento de la energía del residuo, operando en condiciones más alejadas de la inestabilidad.

Figura 4.5. Tasa de producción específica de metano.

La expresión de Buswell aplicada a los distintos sustratos alimentados en los sistemas y sus respectivas producciones específicas de metano, se muestran en la Tabla 4.6. Además se incluye la relación entre ambos parámetros, que se constituye como indicador de la eficiencia de la producción de metano.

Tabla 4.6. Rendimiento máximo teórico según Buswell y el obtenido experimentalmente.

	Rendimiento máximo teórico (l CH ₄ ·kgSV ⁻¹)	Producción específica de metano (l CH ₄ ·kgSV ⁻¹)	Eficiencia de producción de metano
E	336,4	135,8	0,40
EPa1	384,1	293,6	0,76
EPa2	384,1	277,6	0,72
EPf1	401,3	384,4	0,96
EPf2	401,3	327,5	0,82

Así pues, la producción de metano en el sistema E supone una eficiencia del 0,40 (en tanto por uno) respecto al máximo teórico marcado por la expresión de Buswell. Los sistemas suplementados con patata presentan una eficiencia de producción de metano de 0,76 y 0,72 respecto al mencionado rendimiento máximo teórico y en los casos de los sistemas con patata frita, la eficiencia asciende al 0,96 y 0,82.

- Riqueza en CH₄

El contenido en metano del biogás producido en los diferentes sistemas se muestra en la Tabla 4.7. Pese a que la riqueza en CH₄ es muy similar, el análisis de varianza² demuestra que los sistemas suplementados con patata frita (EPf1 y EPf2) y el sistema EPa2 presentan concentraciones en metano significativamente mayores que los sistemas E y EPa1. Esto aparentemente indica que la inclusión de la patata frita, por un lado, y el aumento de carga, por otro, incrementan la concentración de metano. Esta circunstancia está en

² Para el estudio de las variables se ha realizado un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test DMS con un nivel de confianza del 95% (P<0,05). Este análisis ha sido realizado con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 19.

consonancia con los resultados de los ensayos de biodegradabilidad, en los cuales se detectó que la patata frita generó mayor riqueza de metano en el biogás.

Tabla 4.7. Contenido en metano.

	CH ₄ (%)
E	48,56 ± 3,42
EPa1	47,59 ± 3,52
EPa2	51,37 ± 4,49
EPf1	52,35 ± 1,49
EPf2	53,43 ± 3,18

- ST y SV

Se analizó el contenido en ST y SV de los efluentes de los 5 sistemas, mostrando estos resultados en la Tabla 4.8 junto con los porcentajes de destrucción de SV.

Comparando estos valores con los expuestos para el influente, se observa que el sistema alimentado únicamente con estiércol presenta la destrucción de SV más baja (35,5%). A su vez los sistemas de co-digestión, presentan tasas de destrucción de volátiles sensiblemente más elevadas, destacando el sistema EPa1 con un 66,3% de SV destruidos.

Tabla 4.8. Contenido en ST y SV.

	ST (g·l ⁻¹) (Influente)	ST (g·l ⁻¹)	SV (%) (Influente)	SV (%)	Destrucción de SV (%)
E	104,2 ± 0,2	66,0 ± 1,3	72,4 ± 1,2	70,9 ± 1,0	35,5 ± 0,1
EPa1	103,0 ± 0,3	37,5 ± 3,6	77,1 ± 2,0	69,3 ± 1,3	66,3 ± 0,4
EPa2	103,0 ± 0,3	61,8 ± 4,4	77,1 ± 2,0	69,8 ± 1,8	44,0 ± 0,2
EPf1	103,1 ± 0,1	63,6 ± 3,3	77,1 ± 0,1	71,5 ± 1,1	41,0 ± 0,1
EPf2	103,1 ± 0,1	64,8 ± 1,7	77,1 ± 0,1	71,1 ± 1,1	40,3 ± 0,1

Hay que señalar en primer lugar que el estiércol es materia generada tras una degradación bioquímica previa, presentando mayor contenido en materia de difícil degradación. Secundariamente la propia co-digestión, puede tener como efecto el incremento de la destrucción de SV, ya que al mejorarse el balance de nutrientes se potencia el proceso degradativo.

En los sistemas de co-digestión los diferentes resultados en la proporción de SV destruidos son explicables por la idoneidad de la mezcla: primeramente en lo que a la naturaleza y composición de los residuos se refiere (estiércol ovino - peladuras de patata y estiércol ovino - patata frita residual) y por otro lado en lo referido a la carga orgánica, ya que en niveles bajos permite un mayor TRH y consecuentemente más tiempo para progresar en la degradación anaerobia.

Es esperable que a mayor destrucción de SV se obtengan también mayores destrucciones de DQO durante el proceso. Sin embargo, hay que tomar esta afirmación con cautela, ya que el comportamiento en ambos parámetros no ha de ser estrictamente parejo.

- pH

El pH es uno de los parámetros de diagnóstico en el manejo de procesos fermentativos, considerándose que un proceso es estable cuando se opera en rangos de pH de 6,6 - 7,6 (Lay *et al.* 1997). En este grupo de ensayos se ha trabajado con valores de pH en torno a 7,45 en los sistemas de estiércol y estiércol-patata, siendo ligeramente inferiores en los dos sistemas de co-digestión estiércol-patata frita (pH = 7,30). (Ver Tabla 4.10)

- AGV

El seguimiento del contenido de AGVs en todos los reactores mostró incremento en la concentración de acético y propiónico durante el arranque y una rápida degradación posterior. En la Tabla 4.9 se expone el contenido promedio de AGVs registrado en el lecho de digestión. Según Ahring *et al.*, (1995), la metanogénesis puede ser inhibida con concentraciones de AGVs superiores a 3,5 g·l⁻¹. A su vez, Kryvoruchko *et al.*, (2009) citan como nivel de inhibición en la digestión de peladuras de patata concentraciones de AGVs superiores a 3,0 g·l⁻¹ o concentraciones de propiónico superiores a 0,3 g·l⁻¹. Comparando estas referencias con estos resultados, puede decirse que no hay inhibición causada por AGVs

Tabla 4.9. Concentración de AGV registrada en el digerido.

	Total (mg·l ⁻¹)	Acético (mg·l ⁻¹)	Propi- nico (mg·l ⁻¹)	Isobu- tírico (mg·l ⁻¹)	Butírico (mg·l ⁻¹)	Isova- lérico (mg·l ⁻¹)	Valérico (mg·l ⁻¹)	Isoca- proico (mg·l ⁻¹)	Hepta- noico (mg·l ⁻¹)
E	99 ± 24	74 ± 19	6 ± 5	3 ± 2	7 ± 5	4 ± 2	1 ± 2	2 ± 1	2 ± 2
EPa1	36 ± 18	31 ± 11	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1
EPa2	40 ± 15	31 ± 10	3 ± 3	1 ± 1	5 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EPf1	42 ± 17	30 ± 13	5 ± 3	1 ± 2	6 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EPf2	41 ± 13	31 ± 10	3 ± 2	1 ± 1	5 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1

- N-NH₃

La degradación de los substratos ricos en nitrógeno eleva la concentración de N-NH₃ pudiendo inhibir la metanogénesis (Zeeman *et al.*, 1985; Angelidaki y Ahring, 1994). El nivel considerado inhibitorio depende de las diferentes condiciones de operación. Así pues según Calli *et al.*, (2005) se detecta inhibición con concentraciones de N-NH₃ superiores a 3,0 g·l⁻¹, aunque poblaciones adaptadas han tolerado concentraciones superiores a 4,0 g·l⁻¹ (Angelidaki y Ahring, 1993) e incluso concentraciones de 5,0 - 8,0 g·l⁻¹ pueden ser toleradas si el pH es suficientemente bajo (Tchobanoglous y Burton, 1995; Siegrist *et al.*, 2005). De todos modos se ha propuesto la concentración de amoníaco libre (NH₃) como el componente activo causante de la inhibición, situándose el umbral de tolerancia a 0,1 - 1,1 g·l⁻¹ (Hansen *et al.*, 1998; Angelidaki y Ahring, 1993).

En la siguiente tabla se expone el contenido de N-NH₃ registrado en el influente e efluente de los reactores.

Tabla 4.10. Contenido en N-NH₃ y pH.

	N-NH ₃ Total (mg·l ⁻¹) (Influente)	N-NH ₃ Total (mg·l ⁻¹)	N-NH ₃ Libre (mg·l ⁻¹) (Influente)	N-NH ₃ Libre (mg·l ⁻¹)	pH
E	430,0 ± 12,4	756,9 ± 34,8	95,45 ± 2,7	24,2 ± 3,6	7,46 ± 0,12
EPa1	324,7 ± 14,2	474,1 ± 22,6	20,07 ± 0,9	12,6 ± 2,3	7,42 ± 0,11
EPa2	324,7 ± 14,2	740,2 ± 35,3	20,07 ± 0,9	24,3 ± 4,1	7,47 ± 0,09
EPf1	285,7 ± 11,1	707,7 ± 42,9	13,46 ± 0,5	16,9 ± 2,6	7,30 ± 0,09
EPf2	285,7 ± 11,1	866,8 ± 47,2	13,46 ± 0,5	20,0 ± 4,3	7,30 ± 0,10

Dos son las variables básicas que pueden explicar la variabilidad del contenido de N-NH₃ entre los lechos de digestión: por un lado la carga orgánica alimentada al reactor y por otro el N-NH₃ contenido en el influente.

Comparando los sistemas con igual carga orgánica se puede determinar el efecto de los diferentes substratos alimentados (Ver su caracterización en la Tabla 4.4). De esta forma, el sistema E alimentado con estiércol ovino ($430,0 \pm 12,4$ mg N-NH₃total·l⁻¹ influente) presenta un contenido de N-NH₃total en el digerido de $756,9 \pm 34,8$ mg·l⁻¹. A su vez, el sistema EPa1 con $324,7 \pm 14,2$ mg N-NH₃total·l⁻¹ influente, presenta un contenido en N-NH₃ en el digerido de $474,1 \pm 22,6$ mg·l⁻¹. El incremento en la concentración de N-NH₃ es resultado de la degradación del N-orgánico contenido en la alimentación. La patata es un co-substrato con una relación C/N que duplica a la presentada por el estiércol (24,0 frente a 12,2), por lo que la inclusión de patata en la alimentación diluye el N-orgánico de la mezcla. Así pues, el reactor E presenta una relación C/N de 12,2 en el influente, mientras que en el reactor EPa1 dicha relación es de 14,0 lo que supone un contenido en N 13% inferior. Tras el proceso de digestión, el contenido en N-NH₃ del reactor E es un 59% superior al sistema de co-digestión EPa1. Este resultado nos permite comprobar que la inclusión de patata en la alimentación constituye una técnica de control del N-NH₃ reduciendo el riesgo de inhibición por amonio. A su vez, comparando el contenido de N-NH₃ de la alimentación frente al efluente dentro de un mismo reactor, se observa un incremento del 76% en el reactor E y del 46% en el EPa1.

La misma comparación puede efectuarse entre los sistemas EPa2 y EPf1, alimentados con $3,5$ KgSV·m⁻³·d⁻¹ de estiércol - patata y estiércol - patata frita. Ambos sistemas presentan un contenido en N-NH₃ de entrada de $324,7 \pm 14,2$ y $285,8 \pm 11,1$ mg·l⁻¹ respectivamente, incrementándose durante la degradación hasta los $740,2 \pm 35,3$ y $707,7 \pm 42,9$ mgN-NH₃·l⁻¹ para EPa2 y EPf1. Considerando una relación C/N de 14,0 en el influente del reactor EPa2 y una relación C/N de 15,2 en el influente de EPf1, se deriva que el sistema suplementado con patata frita residual presenta un contenido en N 8% menor que el sistema suplementado con residuo de patata. Comparando el contenido en N-NH₃ del efluente de ambos reactores se constata una concentración en el reactor EPf1 4% inferior frente al digerido de EPa2. Asimismo, comparando el contenido de N-NH₃ de la alimentación frente al efluente, se observa un incremento del 127% en el reactor EPa2 y del 147% en el EPf1. Este recorte en las diferencias entre ambos sistemas, indica que el

control del N-NH₃ del lecho es relativamente mejor en el ensayo suplementado con peladura de patata que con patata frita residual.

A continuación se procede a comparar sistemas con distinta carga orgánica pero igual mezcla alimentada. Los sistemas EPa1 y EPa2, alimentados con estiércol - peladuras de patata a una carga orgánica de 2,5 y 3,5 KgSV·m⁻³·d⁻¹, presentan una concentración de N-NH₃ de entrada de 324,7 ± 14,2 mg·l⁻¹. Dicha concentración se incrementó durante el proceso fermentativo hasta los 474,1 ± 22,6 y 740,2 ± 35,3 mg·l⁻¹ respectivamente, por lo que el aumento supuso un 46% y un 128% para EPa1 y EPa2 respectivamente. Por otro lado, considerando caudales y concentraciones de influentes y efluentes, se tiene que el aporte de N-orgánico al reactor es un 40% superior en el sistema EPa2. Sin embargo, la cantidad de N-NH₃ evacuado en dicho sistema resultó ser un 119% mayor que en EPa1, lo que indica que en una operación prolongada puede generarse acumulación de N-NH₃.

En cuanto a los sistemas EPf1 y EPf2, la situación de partida es similar: alimentados con la misma mezcla a cargas orgánicas de 3,5 y 4 kgSV·m⁻³·d⁻¹ respectivamente, presentan una concentración de N-NH₃ a la entrada del reactor de 285,8 ± 11,1 mg·l⁻¹. La corriente de salida muestra un contenido de 707 ± 42,9 mg·l⁻¹ en EPf1 y 866,8 ± 47,2 mg·l⁻¹ en EPf2 lo que indica un incremento en la concentración de N-NH₃ de 147 y 203 % respectivamente. Por otro lado, comparando los balances de materia en ambos sistemas tenemos que el influente en EPf2 aporta un 14,3% más N-orgánico que en EPf1, mientras que en el efluente el N-NH₃ detectado fue un 40% mayor. De nuevo este incremento en las diferencias de contenido amoniacal entre aportes y efluentes de ambos sistemas, supone una aproximación a condiciones adversas en cuanto a acumulación de N-NH₃ en el sistema EPf2.

- DQO

Analizando la DQO de los efluentes de los reactores (Tabla 4.11) se observa que de nuevo la mayor destrucción de DQO se consiguió en el sistema EPa1, mientras que la menor se obtuvo en el sistema de digestión de estiércol.

Tabla 4.11. Análisis de DQO.

	DQO influente (g·l ⁻¹)	DQO final (g·l ⁻¹)	DQO destruida (%)
E	54,93 ± 2,18	33,42 ± 3,0	39,16 ± 0,09
EPa1	45,85 ± 2,41	16,98 ± 1,9	62,82 ± 0,12
EPa2	45,85 ± 2,41	25,76 ± 4,8	43,61 ± 0,19
EPf1	37,85 ± 0,18	28,37 ± 2,0	57,47 ± 0,07
EPf2	37,85 ± 0,18	26,31 ± 5,4	60,56 ± 0,21

- DBO₅

En la Tabla 4.12 se exponen los resultados promedio del ensayo DBO₅. Este parámetro es ampliamente utilizado en análisis de aguas residuales, empleándose como indicador de estabilidad biológica de las aguas. Además el porcentaje de DBO₅ destruida se relaciona con la eficiencia de degradación del sustrato. De esta manera se tiene que tras el proceso fermentativo, el efluente más estable biológicamente es el procedente del sistema EPa1, así mismo las mayores estabilizaciones se consiguen en los sistemas EPa1 y en los suplementados con patata frita. Este resultado es acorde a lo expuesto en el apartado de ST y SV, y parejo a la evolución de los resultados de los análisis de DQO.

Tabla 4.12. Resultados de los ensayos DBO₅

	DBO ₅ alimentación (g·l ⁻¹)	DBO ₅ digerido (g·l ⁻¹)	% DBO ₅ destruida
E	10,30 ± 0,51	5,25 ± 0,57	48,9 ± 0,1
EPa1	13,01 ± 0,79	3,64 ± 0,64	71,8 ± 0,2
EPa2	12,78 ± 0,73	5,62 ± 0,51	56,5 ± 0,1
EPf1	22,34 ± 1,03	6,26 ± 0,41	71,3 ± 0,1
EPf2	22,23 ± 0,92	6,45 ± 0,28	71,5 ± 0,1

- DBO₅, DQO e índice de biodegradabilidad.

La DBO₅ mide la cantidad de materia susceptible de ser degradada bioquímicamente, por lo que según esta afirmación será siempre inferior al análisis de DQO, es decir, a la cantidad de materia susceptible de ser degradada por agentes químicos. Existe entonces

una fracción de la DQO que se constituye como materia oxidable químicamente pero no biológicamente en condiciones del ensayo DBO₅. A esta fracción se denomina DQO no biodegradable, cumpliéndose que el sumatorio de la demanda de oxígeno biodegradable y la DQO no biodegradable equivale a la DQO total. Durante el proceso de digestión anaerobia tiene lugar una degradación biológica del sustrato que podría ser más elevada que la expresada en los análisis DBO₅, ya que la temperatura y el tiempo de residencia de los sistemas son más elevados y la ruta de degradación es distinta a los del ensayo respirométrico.

Experimentalmente se obtiene que la fracción DQO no biodegradable se modifica tras el proceso fermentativo, lo cual se expone en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. Resultados de la fracción DQO no biodegradable.

	DQO no biodegradable alimentación (gO ₂ ·l ⁻¹)	DQO no biodegradable digerido (gO ₂ ·l ⁻¹)	Destrucción de la DQO no biodegradable (%)
E	44,6	28,2	36,9
EPa1	32,7	13,3	59,2
EPa2	32,9	20,1	38,8
EPf1	44,4	22,1	50,2
EPf2	44,5	19,9	55,3

Se observa que la destrucción de la DQO no biodegradable se incrementa al suplementar la alimentación con peladuras de patata o patata frita residual. Era predecible que la inclusión de ambas formas de patata en los reactores aumente la degradación de los sustratos introducidos al contener la patata mayor proporción de materia fácilmente degradable. Se observa que la variación en el grado de destrucción de la fracción DQO no biodegradable no responde linealmente al aumento de biodegradabilidad de la mezcla introducida. En la Tabla 4.14 se muestra el índice de biodegradabilidad de las distintas alimentaciones aportadas y de los digeridos efluentes de los reactores. Este parámetro se define como el cociente DBO₅/DQO. Si se analiza el porcentaje de reducción del índice de biodegradabilidad tras el proceso fermentativo se obtiene que en el sistema de digestión unitaria de estiércol la transformación es del 16%, mientras que en los sistemas EPa1, EPa2, EPf1 y EPf2 la reducción del índice de biodegradabilidad supone un 25, 22, 34 y 26% respectivamente.

Tabla 4.14. Índice de biodegradabilidad de los influentes y efluentes de los sistemas.

DBO ₅ /DQO	Alimentación	Digerido	Reducción del índice de biodegradabilidad
E	0,187	0,157	16%
EPa1	0,285	0,215	25%
EPa2	0,280	0,218	22%
EPf1	0,335	0,221	34%
EPf2	0,333	0,245	26%

- Reducción del índice de biodegradabilidad, producción máxima teórica de metano y eficiencia de producción de metano

Se estudió la correlación bivariada lineal simple entre las variables reducción del índice de biodegradabilidad y producción máxima teórica según Buswell. Se empleó el coeficiente de Pearson, el cual es un estadístico que permite cuantificar el grado de relación entre dos variables. La prueba de significación es bilateral e indica la probabilidad de obtener coeficientes tan alejados de cero o más que el valor obtenido. Se rechaza la hipótesis nula de independencia lineal cuando el nivel crítico es menor que el nivel de significación, establecido en $\alpha = 0,01$.

Aplicando este estadístico (Figura 4.6) se concluye que no existe relación lineal significativa entre la reducción del índice de biodegradabilidad por digestión anaerobia y la proporción de materia biodegradable existente en las distintas mezclas. Dicho de otro modo, el incremento en la proporción de materia biodegradable de un substrato-mezcla, no modifica en igual proporción la degradación de ese substrato, sino que la idoneidad de la mezcla puede potenciar la eficiencia de la degradación perseguida.

Figura 4.6. Correlación entre la reducción del índice de biodegradabilidad y el rendimiento máximo teórico.

Por otro lado, aplicando el estudio de correlación bivariada lineal simple a las variables porcentaje de reducción del índice de biodegradabilidad y a la eficiencia en la producción de metano, definida como el cociente entre la producción específica de metano y el rendimiento máximo teórico tenemos el resultado expuesto en la Figura 4.7:

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 4.7. Correlación entre la reducción de biodegradabilidad y la eficiencia de producción de metano.

Esto nos indica que existe correlación entre ambas variables a un nivel de significación de 0,05, por lo que en consonancia con el anterior razonamiento, la producción de metano de una mezcla no sigue un comportamiento aditivo conforme se elabora dicha mezcla, sino que la idoneidad de los co-substratos puede potenciar la producción de biogás de forma sinérgica.

4.5. CONCLUSIONES

- Tanto la **peladura de patata** como la **patata frita son co-substratos aptos para la digestión de este residuo ganadero**, obteniéndose mejores resultados en cuanto a destrucción de SV y de DQO en sistemas de co-digestión frente a sistemas unitarios.
- El incremento en materia biodegradable de un sustrato no aumenta proporcionalmente la degradación de ese sustrato, sino que **la eficiencia de dicha degradación depende del sinergismo derivado de la naturaleza de los sustratos-mezcla**.
- En base a la eficiencia en la producción de metano, se tiene que **la carga orgánica óptima se sitúa a $3,5 \text{ kgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ si se trabaja con estiércol - patata frita**. Empleando la mezcla **estiércol - peladura de patata se considera la carga orgánica óptima a $2,5 \text{ kgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$** .
- La concentración de N-NH_3 registrada en los digestatos no alcanzan niveles de inhibición metanogénica, evidenciándose no obstante la **mayor resistencia de los sistemas de co-digestión**. Por otro lado, la comparación de los sistemas de co-digestión de igual carga orgánica, indica un **mayor control del N-NH_3 en el sistema de estiércol suplementado con peladura de patata** frente al suplementado con patata frita residual.

- El análisis de DBO indica que el **mayor grado de estabilización** se consigue en el **efluente de los sistemas de co-digestión** (concretamente en EPa1, EPf1 y EPf2), siendo el digerido del sistema EPa1 el más estable biológicamente.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahring, M., Sandberg, I., Angelidaki, I., 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 559 - 565.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1993. Anaerobic thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 560 - 564.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research* 28 - 3, 727 - 731.
- Blanco, D., Lobato, A., Fenández, C., Escapa, A. y Gómez, X., 2010. Batch dry anaerobic co-digestion of sheep manure and potato waste. 14th Ramiran International Conference. Lisboa.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., Yigun, O., 2005. Effect of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochemistry* 40, 1285 - 1292.
- Chynoweth, D.P., Turick, C.E., Owens, J.M., Jerger, D.E., Peck, M.W., 1993. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass & Bioenergy* 5, 95 - 111.
- Cuetos, M.J., 2007. Digestión y co-digestión anaerobia de residuos de matadero avícola: control del proceso y evaluación del grado de estabilización. Directores: Antonio Morán Palao y Marta Otero Cabero [Tesis Doctoral]. Universidad de León.
- Da Costa, C., Poeche, G., Heldwein, G., 2008. Agrobiogas: An integrated approach for biogas production with agricultural waste. *Operational Guidelines.GBA, Guideline1*.
- Gunaseelan, V., 2007. Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition, *Bioresource Technology* 98 - 6, 1270 - 1277.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* 32, 5 - 12.
- Hawkes, D.L., (1980). Factors affecting net energy production from mesophilic anaerobic digestion. *Anaerobic Digestion*, eds D.A. Stratford, B.I. Wheatley and D.E. Hughes, 131 - 50.

- Junta de Castilla y León, 2010a. Cuentas Económicas de la Agricultura 2010. Servicio de Estadística, Estudios y Planificación Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería. Secretaría General. JCyL.
- Junta de Castilla y León, 2010b. Encuestas Ganaderas 2010. Servicio de Estadística, Estudios y Planificación Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería. Secretaría General. JCyL.
- Kaparaju, P., Buendia, I., Ellegaard, L., Angelidaki, I., 2007. Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology* 99 - 11, 4919 - 4918.
- Kryvoruchko, V., Machmuller, A., Bodiroza, V., Amon, B., Amon, T., 2009. Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. *Biomass and Bioenergy*, 33 - 4, 620 - 627.
- Lay, J., Li, Y., Noike, T., 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Research* 31 - 6, 1518 - 1524.
- Llabrés-Luengo, P., Mata-Álvarez, J., 1988. Influence of temperature, buffer, composition and straw particle length on the anaerobic digestion of wheat straw-pig manure mixtures. *Resources, Conservation and Recycling* 1 - 1, 27 - 37.
- Moller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure, *Biomass & Bioenergy* 26, 485 - 495.
- Salminen, E.A., Rintala, J.A., 1999. Anaerobic digestion of poultry slaughtering wastes. *Environmental Technology* 20 - 1, 21 - 28.
- Siegrist, H., Hunziker, W., Hofer, H., 2005. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste with UF-membrane separation and recycling of permeate after free ammonia stripping. *Water Science Technology* 52, 531 - 536.
- Speece, R.E., 1987. Nutrient requirements of anaerobic digestion of biomass. Elsevier Applied Science LTD.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., 1995. Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. En: Diseño de instalaciones para el tratamiento y vertido del fango. Interamericana de España, S.A. Metcalf and Eddy, INC McGraw Hill 865 - 880.
- Zeeman, G., Wiegant, W.M., Koster-Treffer, M.E., Lettinga, G., 1985. The influence of the total ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes* 14, 19 - 35.
- Aperitivos Gus S.L. www.aperitivosgus.es [fecha de consulta: marzo de 2011]
- Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA). www.inra.fr [fecha de consulta: enero de 2011]

**5. Digestion of cattle manure under
mesophilic and thermophilic conditions:
Characterization of organic matter applying
Thermal analysis and ^1H NMR**

Biodegradation 22, (2011) 623-635.

X. Gómez^a, D. Blanco^a, A. Lobato^a, A. Calleja^b, F. Martínez-Núñez^c,
J. Martin-Villacorta^a

^a*Chemical Engineering Area, University of Leon, IRENA-ESTIA, Avda. de Portugal 41, León 24071, Spain.*

^b*Animal Production Department, University of León, Campus de Vegazana S/N., León 24071, Spain.*

^c*Laboratorio de Técnicas Instrumentales, University of León, Campus de Vegazana S/N., León 24071, Spain.*

Abstract

Digestion of cattle manure collected from a livestock farm together with bedding material (straw) has been studied under mesophilic and thermophilic conditions in batch reactors. The digestion was carried out for a prolonged period with the aim of evaluating the changes undergone by the organic matter. The mesophilic digestion carried out revealed a greater capacity to produce gas and transform organic matter, while a higher conversion rate, but a lower gas yield, was obtained under thermophilic conditions. Degradation of the organic matter was evaluated by means of thermal analysis and ^1H NMR. Stabilisation through anaerobic digestion (either mesophilic or thermophilic) resulted in an increase in the quality of the organic matter, as characterised by an enrichment in thermostable compounds, and an accumulation of long chain aliphatic materials. The experiments performed demonstrated the transformation of organic matter into complex materials under anaerobic conditions with an accumulation of aliphatic components under both types of conditions tested. Degradation through mesophilic digestion, in comparison to the thermophilic process, resulted in a greater destruction of straw particles.

Keywords: Cattle manure, stabilisation, anaerobic digestion, Thermal analysis, ^1H NMR

Resumen

Se estudió la digestión de estiércol vacuno en régimen discontinuo y bajo condiciones mesofílicas y termofílicas. El residuo ganadero procede de una explotación intensiva incluyéndose el material de encamado (paja). La digestión se llevó a cabo durante largo periodo con el objetivo de evaluar los cambios sufridos por la materia orgánica. El ensayo en mesofílico demostró mayor producción de gas y transformación de la materia orgánica, mientras que el reactor en termofílico presentó mayor velocidad de conversión pero menor producción acumulada de gas. La degradación de la materia orgánica se evaluó mediante análisis térmico y ^1H RMN. La estabilización mediante digestión anaerobia (tanto en mesofílico como en termofílico) mejoró la calidad de la materia orgánica, caracterizada por un enriquecimiento en componentes termoestables y una acumulación de materia alifática de cadena larga. Ambos experimentos demostraron la transformación de la materia orgánica en materiales complejos bajo condiciones anaerobias. La degradación mediante digestión mesofílica mostró mayor destrucción de partículas de paja, frente a lo observado en el ensayo en termofílico.

Palabras clave: Estiércol vacuno, estabilización, digestión anaerobia, análisis térmico, ^1H RMN

5.1. INTRODUCTION

Composting and anaerobic digestion are biological treatment processes intended to stabilize organic matter, with the digestion process presenting the additional benefit of obtaining biogas as a valuable end product. However, composting is the technical process available for conversion of waste organic matter into humic substances with a high content in aromatic structures. Humification of biomolecules provides the environmental benefit of carbon sequestration through the reduction in CO₂ release caused by mineralization (Smidt and Tintner, 2007). Despite these apparent benefits, the composting process entails a long maturation stage to attain humification of organic matter.

The treatment of biowastes by the anaerobic digestion process is characterised by a long period of permanence inside the reactor, around 20 to 40 d. This time requires to be optimised in order to increase the economic feasibility of the digestion treatment plant, by achieving a reduction in the volume of the reactor needed. In this sense, contrary to the composting process, the lack of a maturation stage is a particularity of the digestion process. Assessment of the quality of the digestate obtained under anaerobic conditions has been studied by different authors (Tambone *et al.*, 2009; Bartoszek *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2005) as well as the subsequent degradation of digestate through composting (Amir *et al.*, 2006) and sludge aeration (Smidt and Parravicini, 2009) as a means of increasing the quality of the organic matter.

The study of the transformations suffered by the organic matter during biological degradation is not an easy task. Different parameters have been proposed for evaluating the quality of organic matter, with special attention given to the thermogravimetric behaviour of the samples when heated up to a desired temperature, as in the case of Thermal Analysis (TA). Owing to the simplicity of sample preparation and the short time needed to obtain results, this technique of analysis has proven simple, fast and yet reliable when dealing with the characterization of organic matter (Melis and Castaldi, 2004). On these lines, thermal characterization of organic matter has been studied by several authors (Gómez-Rico *et al.*, 2005; Otero *et al.*, 2002; Font *et al.*, 2001; Dell'Abate *et al.*, 1998). TA and Differential Scanning Calorimetry (DSC) have also been applied to the study of the degradation of organic matter during composting (Klammer *et al.*, 2008; Smidt and Lechner, 2005) and to the assessment of compost stability (Dell'Abate *et al.*, 1998).

^1H and ^{13}C NMR spectroscopy has been selected as an analytical tool thanks to its capacity for the selective identification of different types of C and H moieties and for comparing differences in concentrations of main functional groups (Adani *et al.*, 2006). The humic substances (HS) two-dimensional (2D) NMR study was introduced by Buddrus *et al.* (1989). Solid-state ^{13}C NMR spectroscopy in conjunction with thermal analysis has been used for comparing the molecular and structural properties of humic acids isolated from sewage sludges, and for determining changes in amended soils. As an example, humic acids in thermally dried sewage sludge showed an important presence of alkyl and O/N-alkyl compounds (Fernández *et al.*, 2008). In our previous study (Gómez *et al.*, 2010), TA, fluorescence spectroscopy and ^1H NMR were proposed as analytical tools for characterisation of the organic matter transformations during the digestion of food wastes under semi-continuous operation at mesophilic and thermophilic conditions. As result, enrichment in aliphatic components was observed under both conditions studied, although the degradation attained at thermophilic temperatures was faster, with a higher content in aromatic structures remaining in the thermophilic digestate, while under mesophilic conditions degradation of these structures was observed.

The aim of this study was to assess the transformations taking place during the digestion process of cattle manure under mesophilic and thermophilic conditions during prolonged stabilisation. TA and ^1H NMR were used as analytical tools for studying the degradation of organic matter.

5.2. MATERIAL AND METHODS

5.2.1. Substrates and digestion characteristics

The inoculum used for starting up the reactors was obtained from the wastewater treatment plant of the city of León (Spain). The concentrations of total solids (TS) and volatile solids (VS) in the inoculum used were $46.2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ and $25.7\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ respectively. Cattle manure originated from a local livestock farm. Straw was used as bedding material on the farm, gathering liquid and solid dejections together. The cattle manure presented an initial concentration of TS of $172\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, with a percentage of VS of 82.7% (wt%).

The digestion was carried out in triplicate using static reactors (under batch conditions), with a working volume of 1 L and thermostatised at 34 ± 1 and 55 ± 1 °C. The reactors were loaded with 300 g of fresh manure, 200 mL of inoculum and 500 mL of tap water. In each case a blank containing only inoculum and tap water was used.

5.2.2. Kinetic analysis

Final cumulative biogas produced was fitted to the modified Gompertz equation (Zwietering *et al.*, 1990) (1) which is a suitable model for describing the process of cumulative biogas production in batch experiments (Sung and Liu, 2003):

$$P(t) = P_{\max} \cdot \exp \left[-\exp \left[\frac{R_{\max} \cdot e}{P_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right] \quad (1)$$

where $P(t)$ is the cumulative biogas production (l); $P_{\max}$ is the biogas production potential (l), $R_{\max}$ is the maximum biogas production rate ($\text{l} \cdot \text{d}^{-1}$), λ is lag-phase time (d) and e is 2.718. Data analysis was performed using Origin 6.1 software.

5.2.3. Analytical techniques

Cattle manure used as substrate was characterised by the following chemical analysis: electrical conductivity and pH were determined using a sample diluted in de-ionized water in the proportion 1:25 (w:v as g:mL) shaken for 30 min. Total organic carbon was determined on the basis of Walkey-Black method (Walkey and Black, 1934). N-Kjeldahl was determined in accordance with the APHA Standard Methods (1989). The extract for determination of cations and phosphorus was obtained by wet digestion carried out with HNO_3 65% in a pressurized microwave oven at 170-200 °C for 20 min. Total phosphorus and cation content in the extract was quantified by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) using Perkin Elmer Optima 2000 DV. Ammonium nitrogen (NH_4^+ -N) was determined from the extract after submitting the sample to one hour of agitation with 20 mL of 2 M KCl solution and quantified by Keeney and Nelson (1982). Cellulose, hemicellulose and lignin content were estimated by analysis of neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and crude fibre (Van Soest *et al.*, 1991) using ground samples in duplicate with an Ankom 200 Fibre Analyser.

TS, VS, chemical oxygen demand (COD), ammonium and pH were analysed during the digestion process. These parameters were determined in accordance with APHA Standard Methods (1989). Daily gas production was measured using a liquid displacement device. Biogas composition was analysed using a gas chromatograph (Varian CP 3800 GC) equipped with a thermal conductivity detector. A four-metre-long column packed with HayeSep Q 80/100 followed by a one-metre-long molecular sieve column were used to separate CH₄, CO₂, N₂, H₂ and O₂. The carrier gas was Helium and the columns were operated at 331 kPa and a temperature of 50 °C.

Thermogravimetry (TG) and differential thermogravimetry (DTG) are based on a programmed heating of samples in controlled atmospheres, providing qualitative and quantitative information regarding the organic content of the sample (Melis and Castaldi, 2004). Differential thermal analysis (DTA) is based on the temperature change in the sample, as compared to that in an inert sample submitted to the same programmed heating. TG curves are usually represented in terms of the percentage of the weight loss experienced by the sample, while DTG curves are obtained from the first derivative of TG profiles, thus representing the rate of weight loss (Gómez *et al.*, 2007). DTA data are represented by the difference between the temperature of the sample and that of the reference material. The higher the temperature at which weight loss occur, the more resistant and ordered structurally is the organic fraction which is burning (Otero *et al.*, 2002).

Sampling on days 17 and 33 were taken from only one of the 3 reactors of the experimental set-up (half of the total volume each time). The other 2 reactors were used for gas measurement and analysis, as well as for sampling on day 77 (at the end of the experiment) using the whole content. The experimental methodology was based on previous work (Gómez *et al.*, 2007) for monitoring organic matter conversion by TA. Samples were divided into two fractions with the aid of a 3 mm mesh for separating straw particles of greater size which do not undergo changes in VS/TS percentage over the course of the digestion process. The two fractions thus obtained were dried at 105 °C. Prior to drying, TS, VS, ammonium and COD were analysed (by triplicate) in the slurry fraction not retained by the mesh. The straw particles retained by the mesh were washed with deionised water, with any small particles passing through the mesh being added to

the slurry previously obtained. The dried solids from the slurry were subsequently ground with a ball mill Retch 200MM. In the case of the sample taken at the end of the experiments, a composite sample was obtained from the two reactors used for gas measurements. A sub-sample selected from the ground material was then submitted to TA using a TA Instruments SDT2960 thermobalance. The heating rate applied was 10 °C·min⁻¹ up to 700 °C with a flow-rate of 100 ml·min⁻¹ of synthetic air.

Ground samples were extracted using dimethyl sulfoxide d6 (DMSO-d₆) as proposed by Francioso *et al.* (2007) for 24 h and the extract obtained after centrifugation was then analysed by ¹H NMR. NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 600 spectrometer (5mm TCi cryoprobe, inverse detection). Nominal frequencies were 600.13 MHz for ¹H and 150.90 MHz for ¹³C. An internal lock on DMSO-d₆ was used for all spectra. The chemical shifts (δ) at 298 K were referred to DMSO-d₆ (δ for ¹H: 2.49 and δ for ¹³C: 39.5).

5.3. RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1. Anaerobic digestion

The chemical characteristics of the substrate used in this study are presented in Table 5.1 (chemical analyses were expressed in dry basis). CH₄ production for thermophilic and mesophilic systems is presented in Figure 5.1. A larger volume of gas was produced at mesophilic temperature although thermophilic reactors presented a higher rate of gas production (see Table 5.2). Production of gas started on the first day of the experiments, with maximum gas rate obtained between days 6 and 7 for thermophilic reactors and around day 20 for their mesophilic counterpart. Thermophilic systems presented a reduced lag phase (Table 5.2), although reactors were inoculated with mesophilic microflora. The start up of thermophilic digestion systems has also been studied by Chachkhiani *et al.* (2004) on the treatment of cattle manure, reporting fast microbial growth and a maximum gas rate on day 10 of experimentation, with the dominant species being the thermophilic microorganisms originally presented on cattle manure (a mesophilic ecosystem) at a subdominant level, which quickly became dominant under thermophilic conditions.

Table 5.1. Chemical composition of the substrate.

Parameter	Substrate
pH	7.5
Conductivity ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)	7.57
Organic carbon (%)	32.5
Total Kjeldahl nitrogen (%)	2.24
Ammonium - N (%)	0.23
Total phosphorus ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	9310
K ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	33800
Ca ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	4010
Mg ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	984
Na ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	5182
Cellulose (%)	10.6
Hemicellulose (%)	13.1
Lignin (%)	7.4

Figure 5.1. Methane production for thermophilic and mesophilic systems.

Table 5.2. Characteristics of batch digestion systems.

Substrate characteristics		
Liquid fraction with particles of size less than 3mm		
TS (g·l ⁻¹)	36.9 ± 0.3	
VS (g·l ⁻¹)	28.1 ± 0.4	
COD (g·l ⁻¹)	42.6 ± 3.5	
Organic carbon (%)	28.5 ± 1.5	
Solids retained by 3 mm sieve		
Mass (g)	18.1 ± 0.6	
%VS	91 ± 2	
Batch digestion systems		
	Mesophilic	Thermophilic
Gompertz kinetic parameters		
P_{max} (mL)	10620 ± 85	6599 ± 64
R_{max} (mL·d ⁻¹)	435 ± 39	487 ± 91
λ (d)	5.7 ± 0.1	1.4 ± 0.2
R^2	0.997	0.966
Digestate at day 77: Liquid fraction with particles of size less than 3mm		
TS (g·l ⁻¹)	25.5 ± 0.2	20.9 ± 0.2
VS (g·l ⁻¹)	16.7 ± 0.4	14.3 ± 0.4
COD (g·l ⁻¹)	35.7 ± 1.6	30.1 ± 1.8
Organic carbon (%)	22.7 ± 1.8	25.4 ± 1.5
Cumulative gas production (L)	17.5 ± 1.1	13.4 ± 0.9
Digestate at day 77: Solids retained by 3 mm sieve		
Mass (g)	3.4 ± 0.1	5.6 ± 0.2
%VS	92 ± 3	91 ± 2
% Mass Removal	82 ± 5.3	69 ± 5.8

Mesophilic (35 °C) and thermophilic (60 °C) digestion of cattle manure have been studied by Sánchez *et al.* (2000) under batch conditions for a 33 day period, reporting a reduction in the methane yield with the increase of temperature. In the present study, digestion was maintained until day 77. Gas production was measured until total stoppage of gas generation. The methane yield obtained was 234 ± 19 and 159 ± 17 ml · g⁻¹ VS added for

mesophilic and thermophilic digesters. Table 5.2 also presents the characteristics of the substrate based on the separation of particles by the 3 mm sieve, together with those of the digestates obtained under each set of conditions evaluated. Thermophilic digestate was characterized by a lesser removal of particles of a size greater than 3 mm, thus explaining the lower methane yield achieved. In consonance, the total volume of gas produced was also in accordance with this behaviour with the thermophilic reactor presenting a lower cumulative gas production.

Degradation of the particulate substrate was in accordance with the behaviour of gas production which was adjusted to the modified Gompertz model. This equation was developed by dividing gas accumulation into two fractions, one arising from rapidly fermentable feed and the other from slowly fermentable feed (France *et al.*, 2005). The reduction in the amount of particulate substrate may be seen as relating to the slowly fermentable organic matter, thus presenting thermophilic microflora a limited capacity to assimilate this fraction, which in turn leads to a lower biogas yield.

The systems presented low variability in pH measurements. In the initial state of digestion, the pH value was 7.4, with a reduction to 6.6 by day 3. Thereafter, the pH of the mesophilic reactor returned to its initial value, while the thermophilic reactor reached a higher value (7.8) by the end of the experiments. NH_4^+ content did not reach inhibitory values (Henze and Harremoes, 1983; Siegrist *et al.*, 2005). Initial content of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was $359 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, increasing to $882 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in mesophilic reactors and $707 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in the thermophilic reactors by the end of experimentation.

5.3.2. Thermal analysis

Thermal profiles of the fresh cattle manure are presented in Figure 5.2. These profiles are characterised by a three step pattern as reported by Mondini *et al.* (2003) Thermal profile of fresh cattle manure has been analysed previously (Sánchez *et al.*, 2008). The profile was characterised by two main peaks, once the water released is disregarded. The peak at around 300°C is associated with labile components of organic matter, while the peak at higher temperatures is associated with aromatic structures (Flaig *et al.*, 1975). Although the intensity of the second exothermic peak in DTG profile was lower than that of the first peak (indicating a lower release of mass), a similar intensity for both peaks was observed

in the DTA profile, indicating that a higher temperature is reached with the oxidation of complex compounds.

Figure 5.2. Thermal profiles of the fresh cattle manure.

TG, DTG and DTA profiles for digestates curves obtained from mesophilic and thermophilic digestion processes are presented in Figure 5.3. The profiles maintained the thermal characteristics of fresh manure. Dehydration reactions take place at low temperatures (Dell'Abate *et al.*, 1998), just as in the previous case (the fresh cattle manure sample). The two exothermic peaks, representing the fractions of different thermal stability, can be distinguished. However, a reduction in the intensity of the first peak was registered for both digestates (mesophilic and thermophilic), indicating no relevant effect of the temperature on stabilisation whenever readily oxidized materials are concerned. The thermophilic sample at day 33 presents a similar thermal pattern at low temperature (300 °C) to that of the mesophilic sample at the end of digestion. This behaviour may be

indicative of a higher velocity of the thermophilic microflora for degrading labile components.

Figure 5.3. TG, DTG and DTA profiles for digestates curves obtained from mesophilic (a, b, c) and thermophilic (d, e, f) digestion processes.

The continuous weight loss in the temperature range of 350 – 450 °C may be associated with the combustion of char formed at lower temperatures. This process has been reported by Font *et al.* (2001) and Zhu *et al.* (2007) in the thermogravimetric study of sewage sludge and landfill sludge. In relation to the second exothermic peak, thermophilic and mesophilic systems are well differentiated. Thermophilic digestates were characterised by lower intensity peaks in the high temperature range. This second exothermic peak was found in the feed sample, and was also registered in digestate samples, with the peak of the mesophilic digestate registering a delay as the stabilisation proceeded. This peak has been used for the characterisation of the maturity of compost using DSC profiles (Klammer *et al.*, 2008) and may be associated with lignin components, which are reported to present exothermic peaks around 476 °C (Xu *et al.*, 2006). Since it is well-known that lignin is not degraded under anaerobic conditions, the digestion of manure in both cases resulted in a digestate enriched with lignin components which present a complex structure. DTA curve corroborates this fact by the increase in the temperature difference signal which is related to the accumulation of these compounds.

The samples taken from the digestion process at different intervals presented an increment of the mineral content as the substrate was digested. The initial content for the feed was

22.1%, increasing to 24.8% at day 16 and to 38.3% at the end of the mesophilic digestion, while increasing to 27.5% and 33.5% under thermophilic conditions. Although the rate of destruction of the organic matter and posterior transformation into biogas was higher during thermophilic digestion process, this was not linked to a greater degree of mineralisation.

Distortions in DTG profiles have been observed by the presence of a mineral matrix in the sample (Rovira and Vallejo, 2000). The content and composition of ashes presented in the organic matter are known to delay the combustion process. Rubiera *et al.* (2002) and Vamvuka *et al.* (2006) reported that de-mineralized samples presented lower burn-out temperatures than those of their parent fuels. In the thermal analysis of concentrated olive mill wastewater, with a high mineral content, an increase in the burn-out temperature was reported by Miranda *et al.* (2008). In the present study, the higher mineralisation content of digestates samples from mesophilic systems may account for the shift to the right on the temperature scale of the peak registered around 450 – 500°C.

The increase in the time for stabilisation led to the presence of high temperature peaks in samples evaluated under both temperature conditions. A mass loss registered above 500 °C was also reported by Lopez-Capel *et al.* (2006), this being associated with polycondensation and the formation of increasingly stable C and N forms in the study of the fungal degradation of wheat straw. The formation of complex molecules containing N, has also been reported by Cuetos *et al.* (2009, 2010) in the study of anaerobic digestion of slaughterhouse wastes, with thermal profiles presenting high intensity peaks centred at around 550 °C. The digestate sample obtained on day 33 of stabilisation from the thermophilic reactor presented a peak of particularly high intensity associated with these stable molecules. However, a peak of lesser intensity was registered at the end of the stabilisation, with this fact also being a characteristic of the mesophilic digestate sample. The DTA signal confirmed that the release of mass at this high temperature is an exothermic process. Hence, components being oxidized were able to generate an important increase in the temperature difference signal. In this context stability should not be exclusively related to the presence of C and N complex molecules.

5.3.3. ^1H NMR spectroscopy

1D ^1H NMR spectrum obtained from the fresh cattle manure sample is presented in Figure 5.4 (a). The signal at 2.5 ppm corresponds to DMSO-*d*₆. The spectrum is dominated by sharp signals in the aliphatic region ascribed to terminal methylic and aliphatic chains. Unsaturated compounds were also identified in two regions, one ascribed to methylenic protons in proximity to the double bond, and the other corresponding to protons in the ethylenic group (see Table 5.3). Methylic protons in acetic acid present a chemical shift at 2.08 ppm. The region at 3.0 – 4.0 ppm cannot be perfectly characterised due to overlapping of signals derived from the presence of water in the sample.

Table 5.3. Signal identification of ^1H NMR spectrum of samples taken in the present study.

Signal (ppm)	Components	References
0.6 – 0.84	Terminal methylic chain	Francioso et al. 2007
1.22 – 1.42	Aliphatic chains $[(\text{CH}_2)_n]$	Guillén et al. 2006
1.94 – 2.14	Methylenic protons in relation to one double bond(unsaturated compounds)	Guillén et al. 2006
5.04	Methoxy groups in aromatic rings	Larghi and Kaufman, 2006
5.3 – 5.4	Protons in the ethylenic group	Aursand et al. 1998
6.4 – 8.6	Aromatic protons	Xia et al. 2003; Adani <i>et al.</i> , 2006
7.37	Aromatic protons: positions 2 and 6 in structures containing a $\text{C}\alpha=\text{O}$ group, and in <i>p</i> -coumaric and ferulic acids	Seca et al. 2000
8.03 – 8.5	Aromatic amides	Chang and Liou, 2007

Signal intensities in the range of 6.2 – 8.0 ppm are an indirect method of monitoring the level of substitution on the aromatic ring of lignin (Xu *et al.*, 2006). The intensity of signals in the aromatic region of the spectrum was low, compared to those obtained in the aliphatic region, thus indicating either a low content in aromatic components, or a high level of substitution (Adani *et al.*, 2006). The complexity of the organic matter shown by the ^1H NMR spectra was associated with the thermal profile obtained by TG analysis.

Aromatic components gave rise to mass loss at high temperature; hence, lignin components identified in ^1H NMR were probably responsible for the mass release reported around 470 °C in thermal analysis. Protons in the aromatic ring of substituted aromatic amides were identified in the spectrum of Fig. 4a. However C and N stable forms were identified in digestate samples but not in the substrate sample (by the mass loss experienced above 500 °C) in DTG profiles. This result may indicate possible transformation of the aromatic compounds containing nitrogen into components of greater complexity, which were subsequently identified by thermal analysis.

Figure 5.4 (b) shows ^1H , ^{13}C HSQC spectra of the fresh cattle manure sample. The unsaturated region which could not be observed in ^1H NMR spectra due to overlapping with water signal is now clearly discernible allowing the identification of polysaccharide and protein region being associated with signals between 60 to 110 ppm. Side-chain groups (oxygenated C_α , C_β , and C_γ carbon) of the phenylpropane lignin structural unit provide a minor contribution to this region (Kolodziejwski *et al.*, 1982; Haw *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 2006). The signals peaking at 56 and 71 ppm suggest that aromatic moieties have a high content of N-alkyl and O-alkyl carbons (Adani *et al.*, 2006). The main contributions giving rise to ^1H resonance signals at 3.75–3.92 ppm are likely to arise from CHOH and CH_2OH functional groups which may indicate the presence of methoxyphenylpropyl repeating unit which typically occur in lignin and lignin-like matter (Yasuda *et al.*, 1999) and/or the presence of polysaccharides moieties (Adani *et al.*, 2006).

Signals around 72 to 74 ppm (3.4 and 3.2 in ^1H NMR) are due to C2, C3, and C5 of cellulose as well as carbons from xylans (Sosanwo *et al.*, 1995; Hatcher, 1987). C=C and aromatic rings give rise to signals around 120 and 130 ppm in ^{13}C NMR spectra, coinciding with signals at around 7 ppm in ^1H NMR spectrum indicative of syringyl and guaiacyl units (Vivas *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006) and signals at 5.03 and 5.30 ppm ascribed to unsaturated compounds. The signal at 8.5 in ^1H NMR spectrum is associated with 166 signal in ^1H , ^{13}C HSQC spectrum, corroborating the presence of nitrogen heteroaromatic compounds.

Figure 5.4. (a) 1D ^1H NMR spectrum obtained from the fresh cattle manure. (b) ^1H , ^{13}C HSQC spectra of the fresh cattle manure.

Spectra obtained from samples at 16 and 77 d for mesophilic and thermophilic digestates are represented in Figure 5.5. No major differences were observed in the aliphatic region at an early stage of the mesophilic processes (Fig. 5.5a). Prolonged stabilisation under mesophilic conditions led to modifications in the aliphatic components of the organic

matter, presenting an important relative increase in signals at 0.6 and 0.8 ppm in relation to that at 1.22 ppm, this being indicative of enrichment in terminal methylic groups (Fig. 5.5b). The great intensity of signals registered in the aliphatic region of the ^1H NMR spectrum may be explained by components in the extract which are resistant to microbial degradation. The presence of these components was confirmed by results obtained from thermal analysis, in which a continuous mass loss was registered in the DTG profile around 350 – 400 °C. The pyrolysis of components may be attributed to the large aliphatic content of the samples. Results were in accordance to those previously reported by Gómez *et al.* (2007) in the study of cattle and poultry manure digestion, where an important presence of CH_2 groups was found in digestate samples.

Figure 5.5. Spectra obtained from samples at 16 and 77 d for mesophilic and thermophilic digestates. (a) Mesophilic, 16d. (b) Mesophilic, 77d. (c) Thermophilic, 16d. (d) Thermophilic, 77d.

The signal at 1.78 ppm in the fresh sample spectrum was displaced to 1.8 ppm in that of the digestate sample. This modification may be rationalized by changes in substitutions of the main chain due to the degradation of organic matter. There is an important reduction of this signal when its relative intensity is compared with that at 1.22 ppm of final digestate spectrum (Fig. 5.5b), indicating a decrease in the amount of unsaturated components, this being in accordance with the reduction in signal intensity at 5.3 ppm.

The aromatic region presented low-intensity signals and was characterized by the absences of signals ascribed to coumaric and ferulic acids, and also by the persistence of signals at 7.08 and 7.46 which were ascribed to guaiacyl and syringyl units of lignin. With regard to the spectra obtained from mesophilic digestates, an increase in the intensity of signals at 7.25 and 7.84 ppm relative to that at 5.3 ppm of unsaturated compounds was observed at day 16 of the digestion process. These signals may be derived from those initially registered in the fresh cattle manure spectrum at 7.37 and 7.92 ppm. As previously stated, the signal recorded in the aromatic region was ascribed to lignin fractions, and their higher intensity may be rationalized by a preferential degradation leading to an accumulation of complex components. This statement was in accordance with results obtained from thermal analysis, indicating a reduction in the content of readily oxidized components thus, favoring an increase in the content of complex organic matter. Additionally, the energy release from the thermal degradation of these complex materials was higher as the time of experimentation increased, with results being coincident with those reported by Rovira *et al.* (2000), suggesting an increase in the quality of organic matter as biological degradation takes place, as it was evident from the enrichment of thermostable fractions (indicated by the mass loss registered at temperatures higher than 450 °C in thermal profiles). The increase in the time of stabilisation resulted in the formation of organic components of C and N stable forms, as it was indicated from TG-DTG analysis and ¹H NMR spectrum, in which a low intensity signal at 10.2 ppm was registered. This signal was neither initially presented in the fresh cattle manure sample nor in the digestate sample at an early stage of stabilisation and was attributed to amidic protons (In and Kim, 2005).

In relation to thermophilic digestates, spectra obtained showed a similar trend to those previously analysed (Fig. 5.5c and 5.5d). However, the thermophilic digestate presented a great degree of conversion at an early stage in stabilisation (day 16) with almost the total

volume of biogas being produced during this period. The degradation of unsaturated compounds needed a longer time, even at thermophilic conditions, as it is shown in Fig. 5.5d by the persistent presence of signal at 1.86 ppm.

Lignin derived units presented a lower intensity signal in contrast to results obtained from the mesophilic digestate at day 16 (these aromatic doublets placed around 7.48 and 7.06 ppm have a $^3J_{H,H}$ of 7.3 Hz). At the end of the thermophilic digestion it was possible to observe a relative increase of the signal ascribed to N-complex compounds (8.5 ppm), in relation to that of lignin units.

HSQC spectra obtained in the final stage of digestion are presented in Figure 5.6 for mesophilic and thermophilic samples. The HSQC fingerprints for both digestates are similar, presenting an accumulation of signals in the aliphatic region at around 20 - 30 ppm. These aliphatic components present resemblance with suberin and cutin biopolymers (Moire *et al.*, 1999) which are considered to be the protective layers of higher plants. Suberin and cutin are considered to be polyesters, with similar structures (composed of fatty acids), differing in their chain length and their substitution patterns. Suberin contains, in contrast to cutin, lignin-like aromatic components, covalently linked to the aliphatic chain by ester bonds (Kolattukudy, 1980).

The main differences were a decrease in signals ascribed to unsaturated compounds at around 5.2 and 5.3 ppm in 1H NMR coupled with 120 and 123 ppm in HSQC in thermophilic digestate. This digestate also presented a major contribution to signals ascribed to the polysaccharide region. Although thermophilic digestion of cattle manure presented a higher rate of stabilisation, the degradation of the organic matter under mesophilic conditions revealed a higher destruction of cellulose (decrease in signal at around 72 and 74 ppm) when digestion time was prolonged.

Figure 5.6. HSQC spectra obtained in the final stage of digestion for mesophilic (a) and thermophilic (b) samples.

5.4. CONCLUSIONS

Results obtained from the digestion process showed a **higher degradation of particulate material under mesophilic conditions**. Transformation of the organic matter was evaluated by means of thermal analysis and ^1H NMR. These analytical techniques demonstrated that **prolonged stabilisation at constant temperature resulted in an increase in the quality of the organic matter**, as characterised by the accumulation of thermostable compounds, N-complex and long chain aliphatic structures. Results demonstrated the initial degradation of readily oxidised components with the consequent accumulation of the complex fraction, and posterior transformation into stable compounds.

The advantages of the use of **thermal analysis** are based on the easiness of application, sample preparation and short time needed for the analysis. In this sense, this technique **may be useful for control and improvement of process performance** by identification of overloading problems associated to the amount of readily oxidised materials. On the other hand **^1H NMR spectroscopy allows the identification of functional groups resulting in a better characterisation of the transformation suffered** at different stabilisation times by digestate samples. However the wide application of this technique is limited by the higher analytical cost of the equipment needed, thus recommending this analysis for obtaining detailed information related to the transformations undertaken by biological stabilisation processes. Future research in this area should focus in determining relationships between expected gas production and thermal behaviour of substrates, reactor operating conditions and quality of digestate attained, as well as assessing the quality of the organic matter when land application of the stabilised wastes is the disposal option selected.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank collaboration of the WWTP of León-SALEAL (mancomunidad municipal para el saneamiento integral de León y su alfoz).

They also would like to thank Dr Margarida Gairí (NMR Facility at Parc Científic de Barcelona) for access to 600 MHz spectrometer.

5.5. REFERENCES

- Abraham, R.J., Canton, M., Griffiths, L., 2001. Proton chemical shifts in NMR: Part 17. Chemical shifts in alkenes and anisotropic and steric effects of the double bond. *Magnetic Resonance in Chemistry* 39, 421 - 431.
- Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E., 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 65, 1414 - 1418.
- Amir, S., Hafidi, M., Lemee, L., Merlina, G., Guiesse, M., Pinelli, E., Revel, J.C., Bailly, J.R., Ambles, A., 2006. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting by thermochemolysis–gas chromatography–mass spectrometry. *Process Biochemistry* 41, 410 - 422.
- APHA, AWWA, WPCF, 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Díaz de Santos SA (ed) American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Madrid, Spain.
- Aursand, M., Mabon, F., Martin, G.J., 1998. High-resolution ^1H and ^2H NMR spectroscopy of pure essential fatty acids for plants and animals. *Magnetic Resonance in Chemistry* 35, S91 - S100.
- Bartoszek, M., Polak, J., Sułkowski, W.W., 2008. NMR study of the humification process during sewage sludge treatment. *Chemosphere* 73, 1465 - 1470.
- Buddrus, J., Burba, P., Herzog, H., Lambert, J., 1989. Quantification of partial structures of aquatic humic substances by one- and two-dimensional solution ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry* 61, 628 - 631.
- Chachkhiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, G., Tsiklauri, L., Dudaui, T., Godon, J.J., 2004. 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology* 93, 227 - 232.
- Chang, C., Liou, G., 2007. Stably anodic green electrochromic aromatic poly(amine–amide–imide)s: Synthesis and electrochromic properties. *Organic Electronics* 8, 662 - 672.
- Cordeiro, N., Belgacem, M.N., Silvestre, A.J.D., Pascoal, C., Gandini, A. 1998. Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition. *International Journal of Biological Macromolecules* 22, 71 - 80.
- Cuetos, M.J., Gómez, X., Otero, M., Morán, A., 2010. Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste: study of biological stabilization by Fourier Transform infrared spectroscopy and thermogravimetry combined with mass spectrometry. *Biodegradation* 21 - 4, 543 - 556.

- Cuetos, M.J., Morán, A., Otero, M., Gómez, X., 2009. Anaerobic co-digestion of poultry blood with OFMSW: FTIR and TG-DTG study of process stabilization. *Environmental Technology* 30 - 6, 571 - 582.
- Dell'Abate, M.T., Canali, S., Trinchera, A., Benedetti, A., Sequi, P., 1998. Thermal Analysis in the evaluation of compost stability: a comparison with humification parameters. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 51, 217 - 224.
- Fernández, J.M., Hockaday, W.C., Plaza, C., Polo, A., Hatcher, P.G., 2008. Effects of long-term soil amendment with sewage sludges on soil humic acid thermal and molecular properties. *Chemosphere* 73, 1838 - 1844.
- Flaig, W., Beutelspacher, H., Rietz, E., 1975. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: Gieseking JE (Eds.) *Soil Components* vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, 119 - 126.
- Font, R., Fullana, A., Conesa, J.A., Llavador, F., 2001. Analysis of the pyrolysis and combustion of different sewage sludges by TG. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58 - 59, 927 - 941.
- France, J., Lopez, S., Kebreab, E., Bannink, A., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J. 2005. A general compartmental model for interpreting gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology* 123 - 124, 473 - 485.
- Francioso, O., Ferrari, E., Saladini, M., Montecchio, D., Gioacchini, P., Ciavatta, C., 2007. TG-DTA, DRIFT and NMR characterisation of humic-like fractions from olive wastes and amended soil. *Journal of Hazardous Materials* 149, 408 - 417.
- Gómez, X., Cuetos, M.J., García, A.I., Morán, A., 2005. Evaluation of digestate stability from anaerobic processes by thermogravimetric analysis. *Thermochimica Acta* 426, 179 - 184.
- Gómez, X., Cuetos, M.J., Tartakovsky, B., Martínez-Núñez, M.F., Morán, A., 2010. A comparison of analytical techniques for evaluating food waste degradation by anaerobic digestion. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33, 427 - 438.
- Gómez, X., Diaz, M.C., Cooper, M., Blanco, D., Morán, A., Snape, C.E., 2007. Study of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric analysis and ^{13}C NMR. *Chemosphere* 68, 1889 - 1897.
- Gómez-Rico, M.F., Font, R., Fullana, A., Martín-Gullón, I., 2005. Thermogravimetric study of different sewage sludges and their relationship with the nitrogen content. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74, 421 - 428.
- Guillén, M.D., Ruiz, A., 2006. Study by means of ^1H nuclear magnetic resonance of the oxidation process undergone by edible oils of different natures submitted to microwave action. *Food Chemistry* 96, 665 - 674.
- Hatcher, P.G., 1987. Chemical structural studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Organic Geochemistry* 11, 31 - 39.

- Haw, J.F., Maciel, G.E., Schroeder, H.A., 1984. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric study of wood and wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning. *Analytical Chemistry* 56, 1323 - 1329.
- Henze, M., Harremoes, P., 1983. Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a literature review. *Water Science and Technology* 15, 1 - 101.
- In, I., Kim, S.Y., 2005 Hyperbranched poly(arylene ether amide) via nucleophilic aromatic substitution reaction. *Macromolecular Chemistry and Physics* 206, 1862 - 1869.
- Keeney DR, Nelson DW (1982) Nitrogen: Inorganic Forms. In: Miller RH, Keeney DR (ed) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties* Page AL, American Society of Agronomy, Soil Science Society America, Madison, 643 - 698
- Klammer, S., Knapp, B., Insam, H., Dell'Abate, M.T., Ros, M., 2008. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. *Waste Management and Research* 26, 173 - 187.
- Kolattukudy, P.E., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990 - 1000.
- Kolodziejski, W., Frye, J.S., Maciel, E., 1982. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic-angle spinning for analysis of lodgepole pine wood. *Analytical Chemistry* 54, 1419 - 1424.
- Larghi, E.L., Kaufman, T.S., 2006. Synthesis of *N*-Methyl-*N*-formyltyramine, a new *b*-phenethylamide derivative isolated from *Cyathobasis fruticulosa* (Bunge) Aellen. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 599 - 602.
- Lopez-Capel, E., Abbott, G.D., Thomas, K.M., Manning, D.A.C., 2006. Coupling of thermal analysis with quadrupole mass spectrometry and isotope ratio mass spectrometry for simultaneous determination of evolved gases and their carbon isotopic composition. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 75, 82 - 89.
- Melis, P., Castaldi, P., 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process. *Thermochimica Acta* 413, 209 - 214.
- Miranda, T., Esteban, A., Rojas, S., Montero, I., Ruiz, A., 2008. Combustion Analysis of Different Olive Residues. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 512 - 525.
- Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., Ryser, U., 1999. Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis 1. *Plant Physiology* 119, 1137 - 1146.

- Mondini, C., Dell'Abate, M.T., Leita, L., Benedetti, A., 2003. An integrated chemical, thermal and microbiological approach to compost stability evaluation. *Journal of Environmental Quality* 32, 2379 - 2386.
- Otero, M., Calvo, L.F., Estrada, B., García, A.I., Morán, A., 2002. Thermogravimetry as a technique for establishing the stabilization progress of sludge from wastewater treatment plants. *Thermochimica Acta* 389, 121 - 132.
- Rovira, P., Kurz-Besson, C., Coûteaux, M., Vallejo, V.R., 2008. Changes in litter properties during decomposition: A study by differential thermogravimetry and scanning calorimetry. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 172 - 185.
- Rovira, P., Vallejo, V.R., 2000. Evaluating thermal and acid hydrolysis methods as indicators of soil organic matter quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31, 81 - 100.
- Rubiera, F., Arenillas, A., Pevida, C., García, R., Pis, J.J., Steel, K.M., Patrick, J.W., 2002. Coal structure and reactivity changes induced by chemical demineralisation. *Fuel Processing Technology* 79, 273 - 279.
- Sánchez, E., Borja, T., Weiland, P., Travieso, L., Martín, A., 2000. Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 22, 247 - 252.
- Sánchez, M., Gómez, X., Barriocanal, G., Cuetos, M.J., Morán, A., 2008. Assessment of the stability of livestock farm wastes treated by anaerobic digestion. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62, 421 - 426.
- Seca, A.M.L., Cavaleiro, J.A.S., Domingues, F.M.J., Silvestre, A.J.D., Evtuguin, D., Neto, C.P., 2000. Structural characterization of the lignin from the nodes and internodes of *Arundo donax* reed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 817 - 824.
- Siegrist, H., Hunziker, W., Hofer, H., 2005. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste with UF-membrane separation and recycling of permeate after free ammonia stripping. *Water Science Technology* 52, 531 - 536.
- Smidt, E., Lechner, P., 2005. Study on the degradation and stabilization of organic matter in waste by means of thermal analyses. *Thermochimica Acta* 438, 22 - 28.
- Smidt, E., Parravicini, V., 2009. Effect of sewage sludge treatment and additional aerobic post-stabilization revealed by infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Bioresource Technology* 100, 1775 - 1780.
- Smidt, E., Tintner, J., 2007. Application of differential scanning calorimetry (DSC) to evaluate the quality of compost organic matter. *Thermochimica Acta* 459, 87 - 93.
- Sosanwo, O.A., Fawcett, A.H., Apperley, D., 1995. ^{13}C CPMAS NMR spectra of tropical hardwoods. *Polymer International* 36, 247 - 259.

- Sung, S., Liu, T., 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere* 53, 43 - 52.
- Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., Adani, F., 2009, Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource Technology* 100, 3140 - 3142.
- Vamvuka, D., Troulinos, S., Kastanaki, E., 2006. The effect of mineral matter on the physical and chemical activation of low rank coal and biomass materials. *Fuel* 85, 1763 - 1771.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583 - 3597.
- Vivas, N., Nonier, M.F., Pianeti, I., Vivas de Gaulejac, N., Bouquet, É., 2006. Structure of extracted lignins from oak heartwood (*Quercus petraea* Liebl., *Q. Robur* L.) *CR Chim* 9, 1221 - 1233
- Walkey, A., Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29 - 38.
- Xia, Z., Yoshida, T., Funaoka, M., 2003. Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols). *European Polymer Journal* 39, 909 - 914.
- Xu, F., Sun, J.X., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2006. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products* 23, 180 - 193.
- Yasuda, S., Hamaguchi, E., Asano, K., 1999. Ready chemical conversion of acid hydrolysis lignin into water-soluble lignosulfonates. III. Successive treatment of acid hydrolysis lignin and lignin model compounds by phenolation and aryl-sulfonation. *Journal Wood Science* 45, 245 - 249.
- Zhu, Y., Chai, X., Li, H., Zhao, Y., Wei, Y., 2007. Combination of combustion with pyrolysis for studying the stabilization process of sludge in landfill. *Thermochimica Acta* 464, 59 - 64.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modelling the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875 - 1881.

***6. Improvement of biogas production by
co-digestion of swine manure and
residual glycerine***

Biofuels 1, (2010) 59-68.

A. Lobato, M.J. Cuetos, X. Gómez, A. Morán

*Chemical Engineering Area, University of Leon, IRENA-ESTIA, Avda. de Portugal 41,
León 24071, Spain.*

Abstract

Anaerobic digestion of swine manure supplemented with residual glycerine from a biodiesel production plant was investigated as a means for increasing biogas production on livestock farms treating residues by the anaerobic digestion process. Two different manures were tested proceeding from two local facilities, being evaluated under batch digestion. Semi-continuous co-digestion was studied using single-stage completely mixed anaerobic digesters. Mixtures were prepared at 2, 5 and 8% (V/V) of glycerine. Improvement of biogas was observed with the increment in the content of residual glycerine fed to the digester, increasing the biogas production from 2.1 to 5.4 l·d⁻¹. Inhibition by ammonium was presented in all systems evaluated (with free ammonia concentrations above 300 mg·l⁻¹), resulting in volatile fatty acids build-up, being higher as the content of glycerine was increased in the feeding mixture. Although systems were submitted to a 30 d adaptation period and the time of study was performed until completing three times the hydraulic retention time, volatile fatty acids measurements presented great variability being indicative that a time greater than three volumes turnovers is needed if conditions of steady state are to be set.

Key words: Anaerobic digestion, biogas, swine manure, glycerine.

Resumen

Se estudió la digestión anaerobia de purín suplementado con glicerina residual como técnica de incremento de la producción de biogás en instalaciones de tratamiento de residuos ganaderos por digestión. Se utilizaron 2 lotes de purín procedentes de 2 explotaciones locales, evaluándose primeramente en régimen continuo. A continuación se llevó a cabo un estudio de co-digestión en régimen semicontinuo utilizando reactores de digestión en una fase y mezcla completa. Se alimentaron con mezclas preparadas al 2, 5 y 8% (V/V) de glicerina, observándose un incremento en la producción de biogás de 2,1 a 5,4 l·d⁻¹ conforme al aumento del contenido en glicerina. Se detectó inhibición por amonio en todos los sistemas evaluados (con concentraciones de amoniaco libre superiores a 300 mg·l⁻¹), provocando una acumulación de AGVs mayor conforme al aumento del contenido en glicerina de la alimentación. Aunque los sistemas fueron sometidos a un periodo de adaptación de 30 d y el tiempo de estudio se prolongó durante 3 TRH completos, las medidas de AGVs presentaron gran variabilidad, indicando la necesidad de un periodo superior para alcanzar condiciones de estabilidad.

Palabras clave: digestión anaerobia, biogás, purín porcino, glicerina.

6.1. INTRODUCTION

Organic wastes, which are potentially valuable as fertilizers or amendments, must be considered as resources to be managed adequately, instead of pollutants to be removed. Following this simple concept, manure has to be considered as a by-product of livestock production and, when required, processed, in accordance with the objective of optimal management within the context of the farm (Flotats *et al.*, 2009). Traditional biological treatments for organic waste materials are composting and anaerobic digestion, being this last process an adequate way of reducing the organic content of bio-wastes and obtaining energy when valorization of biogas is intended. Anaerobic digestion is frequently the most cost-effective due to its high energy recovery and its limited environmental impact, especially with respect to the greenhouse effect (Mata-Álvarez *et al.*, 2000). It is estimated that up to 20% reduction of global warming may be achieved by utilizing discarded biomass and waste for the production of biofuels and chemicals (Vieitez and Ghosh, 1999).

Swine manure (SM) is an organic waste presenting a high load which makes it suitable for treatment under anaerobic digestion. The ever increasing size of pig farm which creates a problem of disposing SM (Oleszkiewicz and Kosiarski, 1981) may result in an advantage when digestion is the treatment option selected. European pig production is mainly developed in eight zones: Denmark, Belgium, The Netherlands, Northern Germany, Brittany (France), Catalonia and Aragon (Spain) and Po valley (Italy) (Bernet and Béline, 2009). In relation to Spain, yearly generation of nitrogen by livestock farming corresponds to an average charge of 21 kg N/ha (Flotats *et al.*, 2009). Agriculture and manure management are involved in gas emissions: ammonia (NH₃) and two green house gases, nitrous oxide (N₂O) and methane (CH₄). Livestock are responsible for 64% of anthropogenic NH₃ emissions, 37% of anthropogenic CH₄ and 65% of anthropogenic N₂O (Steinfeld, 2006). In this sense the treatment of waste by anaerobic digestion not only allows energy recovery by gas valorization, but also by reducing the impact over the environment by allowing odour control, reduction in NH₃ release and green house gases emissions.

One of the general problems arising when treating SM by anaerobic digestion is the high nitrogen content of this substrate, which may lead to inhibition associated to high concentrations of ammonium and pH resulting in toxic levels of free ammonia. Although microbial population can be adapted to increase the tolerance to high levels of this ion, a threshold always possesses limits for a stable process performance. Hansen *et al.*, (1998) reported a threshold for free ammonia in the anaerobic digestion of swine manure of $1.1 \text{ g-N}\cdot\text{l}^{-1}$ in batch culture at pH 8.0. Inhibition related to nonadapted microflora has been observed to commence at $2.5 \text{ g-N}\cdot\text{l}^{-1}$ of total ammonium (Hashimoto, 1986).

The addition of a co-substrate is a viable option to give suitable values of C/N ratios and also a way of handling different wastes in a centralized facility. Co-digestion process with SM may take advantage of the highly buffer systems attained inside the digesters (Murto *et al.*, 2004). Co-digestion of SM with different co-substrates has been tested by different authors (Kaparaju and Rintala, 2005; Gelegenis *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Specific gas production was considerably increased (approximately twofold) in the digestion of mixture of swine feces, urine and garbage when compared to the single digestion of swine feces (Feng *et al.*, 2008). Murto *et al.* (2004) studied the digestion of pig manure with slaughterhouse and agricultural wastes reporting a stable process performance due to high alkalinity associated to high levels of ammonium, although VFA accumulation (mainly acetic acid) was found.

An alternative for increasing biogas production in existing facilities presenting either a low organic load or inadequate C/N ratio may be the addition of residual glycerine as co-substrate. Biodiesel production plants are generating large amount of low quality glycerine which is not susceptible to upgrading due to saturation of the market. Thus, biodiesel producers may affront with handling a waste instead of dealing with a valuable by-product. Glycerol is a readily digestible substance, which can also be easily stored over a long period. These advantages make glycerol an ideal co-substrate for the anaerobic digestion process (Fountoulakis and Manios, 2009). The increase in biogas generated from the supplementation of glycerine may account for a greater amount of valuable biofuel production, while the use of an existing facility which may not need great modifications may result in increasing efficiencies in biogas production.

The addition of glycerine to pig manure has been tested by Amon *et al.* (2006). The supplementation of glycerine led to an increase in CH₄ production, demonstrating a co-fermentation effect, with the methane yield of the combined mixture being higher than those of the single substrates (a 6% supplementation of glycerine to pig manure and maize silage resulted in an increase in CH₄ production from 569 to 679 Nl CH₄·kg VS⁻¹). Ma *et al.* (2008) reported an increase of 0.74 l biogas·ml⁻¹ glycerol (added) when treating potato processing wastewater in a UASB reactor. Fountoulakis and Manios (2009) studied the addition of glycerol to the digestion process of the organic fraction of municipal solid wastes, with a TS content of 4%, reporting a 50% increment in the biogas yield with the addition of the co-substrate (the mesophilic reactor treating the organic fraction of municipal solid waste produced 1400 ml CH₄·d⁻¹ before the addition of glycerol and 2094 ml CH₄·d⁻¹ after the addition of glycerol, by adding 1% v/v crude glycerol to the feed) (Fountoulakis and Manios, 2009).

The aim of the present study was the assessment under continuous operation of the anaerobic digestion process using residual glycerine as co-substrate in the degradation of swine manure (SM). Tests were carried out using SM from two different livestock farms, evaluating the biogas potential of the single waste and semi-continuous digestion process at different levels of residual glycerine in the feeding mixture.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1. Substrates and batch digestion

The SM used in this study was obtained from two different livestock farms close to the city of León (Spain). The SM obtained from the farm located at Alcoba de la Ribera (denominated SM_A) presented a total and volatile solid (TS, VS) content of 20.7 ± 0.1 and 13.6 ± 0.2 g·l⁻¹, respectively, with a chemical oxygen demand (COD) value of 27.5 ± 0.4 g·l⁻¹. The SM proceeding from Morales del Vino (SM_M) presented a solid content of 46.2 ± 0.2 and 32.1 ± 0.2 g·l⁻¹ of TS and VS, respectively and 58.7 ± 0.4 g·l⁻¹ of COD. Differences encountered between substrates were based on the cleaning operation of the

farm (total amount of flushing water used and the type of swine species. The farm at Morales del Vino is dedicated to the production of pigs of Iberian type, while the farm at Alcoba de la Ribera to the breeding of Large-White swine.

The residual glycerine was obtained from a local biodiesel industry located at San Cristobal de Entreviñas. Before utilization, the glycerine was evaporated at 80 °C for 3 h to eliminate any residual content of methanol. Physicochemical characterization is presented in Table 6.1. For determination of chemical elements 0.3 g of sample was digested in 10 ml of nitric acid at 65% in a microwave oven at 100 °C for 5 min and subsequently at 190 °C for 30 min. A PerkinElmer Optima 2000 DV inductively-coupled plasma (ICP) atomic emission spectrometer was used for determination of the remaining elements. A LECO CHN – 600 apparatus was used to analyze C, H and N in accordance with ASTM Standard D-5373. Total sulphur was determined on a LECO SC-132 in accordance with ASTM Standard D-4239. Ash content was determined using a LECO MAC-300 thermogravimetric analyzer (TGA). The pH was measured with a Crison GLP22 pH meter and electrical conductivity with a WTW LF330 conductivity meter. These parameters were determined diluting the sample in de-ionized water (1:10 w/v as g·ml⁻¹).

Digested sludge from the digester of the wastewater treatment plant (WWTP) of the city of León with a TS and VS concentration of 11.3 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1 g·l⁻¹, respectively was used as inoculum. The digester treated a mixture of primary sludge and waste activated sludge. The temperature of the digestion process was 32 °C and the average hydraulic retention time (HRT) was 26 d.

Batch experiments were performed to determine the gas produced from the SM used in the study. Experiments were carried out for 35 days. The batch reactors (Erlenmeyers flasks of 250 ml) were filled with 125 ml of inoculum and the corresponding amount of SM in order to attain a proportion of VS of 1:1 between SM and the inoculum. Tap water was added to complete 250 ml volume in all batch reactors. Two reactors were used for measurement of the gas production and composition. A batch reactor containing only inoculum was used as blank. The biogas produced by this reactor was subtracted from the corresponding tests. The temperature of digestion was 34 °C being controlled by a water bath. Agitation was provided by means of magnetic stirrers. The gas volumes were

measured using bottle gasometers and corrected to a standard temperature (0°C) and pressure (760 mmHg) (STP).

Table 6.1. Physicochemical characterization, metals and phosphorus content of residual glycerine used as co-substrate

Parameter	Value
pH	10.1 ± 0.1
Conductivity (μS)	46.1 ± 0.3
Density (g·ml ⁻¹)	1.052 ± 0.1
Water content (%)	4.3 ± 0.2
Ashes (%)	7.2 ± 0.4
COD (g·l ⁻¹)	262 ± 9
Element	Content
Cd (ppb)	< 5
Hg (ppb)	< 120
Fe (ppm)	11.3
Cu (ppm)	0.64
Ni (ppm)	1.22
Al (ppm)	< 15
Cr (ppm)	1.55
Mn (ppm)	0.59
Zn (ppm)	1.69
Pb (ppm)	0.44
P (ppm)	45.1
Ca (cmol·kg ⁻¹)	0.04
Mg (cmol·kg ⁻¹)	< 0.05
Na (cmol·kg ⁻¹)	49.3
K (cmol·kg ⁻¹)	<0.05

6.2.2. Anaerobic digestion

The co-digestion process was carried out in completely mixed reactors provided with mechanical stirrers. The working volume was 3 l and the systems were thermostated at a temperature of 34 ± 1 °C. The reactors treating SM and glycerine were evaluated at a HRT of 30 days during three consecutive HRT periods. All processes evaluated were initially adapted to a low feeding regime starting at a HRT of 50 days. The acclimation was carried out for a total period of 30 d, increasing the feeding volume until the desired HRT.

Digestion of SM_A was performed only with a mixture at 2% (V/V) of residual glycerine (based on results obtained). Evaluation of the liquid phase of this reactor was started on day 40 of operation due to the great variability found in the biogas production of the system during the start-up phase and first HRT. SM_M was evaluated under continuous operation with mixtures at 2, 5 and 8% content of residual glycerine. The feeding of the systems was manually performed once a day. Before feeding an equivalent amount was withdrawn from the reactor. Nomenclature used to designate digesters involves the type of SM used and proportion of glycerine added.

6.2.3. Analytical techniques

TS, VS, ammonium and pH were monitored during the digestion process. These parameters were determined in accordance with the APHA Standard Methods (1989). Free ammonia concentration was calculated on expressions suggested by Hansen *et al.* (1998) and Calli *et al.* (2005). The chemical oxygen demand (COD) was determined using a Hanna Instruments Series C99 multi-parameter photometer. The homogenized sample was digested in the presence of dichromate at 150 °C for 2 h in a Hanna C9800 reactor. The production of biogas was measured using a reversible liquid displacement apparatus and biogas composition was analyzed using a gas chromatograph (Varian CP 3800 GC) equipped with a thermal conductivity detector. A packed column (HayeSep Q 80/100; 4 m) followed by a molecular sieve column (1 m) was used to separate CH₄, CO₂, N₂, H₂ and O₂. The carrier gas was helium and the columns were operated at a pressure of 331 kPa and a temperature of 50 °C.

Volatile fatty acids (VFAs) were determined on the same gas chromatograph, using a flame ionization detector (FID) equipped with a Nukol capillary column ($30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\text{m}$) from Supelco. The carrier gas was helium. Injector and detector temperatures were 220 and 250°C, respectively. The oven temperature was set at 150°C for 3 min and thereafter increased to 180°C. The detection limit for VFA analysis was $5.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. The system was calibrated with a mixture of standard volatile acids from Supelco (for the analysis of fatty acids C2–C7). Samples were previously centrifuged (10 min, $3500 \times g$) and the supernatant filtrated through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ cellulose filters.

6.3. RESULTS

6.3.1. Batch digestion tests of SM

Digestion of individual substrates was performed under batch conditions. Cumulative CH_4 production is presented on Figure 6.1 for both substrates tested. The total amount of biogas produced is clearly higher for SM_M, although the content of VS of the feed added to the batch reactors was the same. The results obtained may be indicative of a more severe inhibition problem affecting methanogens involved due to the longer lag phase experienced by SM_A system. Biochemical methane potential obtained from the batch experiments were $0.14 \pm 0.01\text{ l CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{ COD}$ ($276 \pm 10\text{ ml CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{ VS}_{\text{added}}$) for SM_A and $0.28 \pm 0.1\text{ l CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{ COD}$ for SM_M ($512 \pm 19\text{ ml CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{ VS}_{\text{added}}$). Values obtained for SM_M are coincident with those reported in literature under batch conditions. However, this is not the case for SM_A, corroborating the hypothesis of inhibition. González – Fernández *et al.* (2008) reported a value of $0.26\text{ l CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{ COD}$ and Chae *et al.* (2008) reported a value of $403\text{ ml CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{ VS}_{\text{added}}$ when digesting SM under mesophilic conditions.

Figure 6.1. Cumulative CH₄ produced under batch tests digestion of SM_A and SM_M

6.3.2. Co-digestion of SM and residual glycerine

The characteristics of the feed used for each digestion system is presented in Table 6.2. Only one system using SM_A was evaluated during semi-continuous digestion with residual glycerine due to the prolonged lag phase presented from results obtained under batch conditions and results obtained under operation at the 2% mixture. Under continuous operation the mixture with this SM at 2% was evaluated in order to assess the performance of the microbial population when the readily degradable co-substrate was added to the process.

Table 6.2. Physicochemical characteristics of the co-digestion mixtures.

Substrate	TS (g·l ⁻¹)	VS (g·l ⁻¹)	COD (g·l ⁻¹)
SM_A2	49.8 ± 0.3	36.9 ± 0.4	81.3 ± 2.5
SM_M2	73.4 ± 0.5	53.5 ± 0.3	129.8 ± 4.3
SM_M5	91.6 ± 0.5	72.0 ± 0.4	170.7 ± 5.7
SM_M8	103.0 ± 0.4	84.5 ± 0.4	195.2 ± 5.2
COD: Chemical oxygen demand; SM: Swine manure; TS: Total solid; VS: Volatile Solid			

The daily production of biogas is presented in Figure 6.2 for the digestion of this mixture. Increments on biogas production were observed during the acclimation period of the inoculum to the feed and subsequently, associated with the gradual increase of the organic loading rate (OLR) until 30 days HRT was reached (from 4.9 ± 0.1 to 8.1 ± 0.3 g COD·d⁻¹). The average gas production obtained was 1.50 ± 0.3 l·d⁻¹ (period corresponding to days 30 – 120, at HRT of 30 days), although there is a marked decrease in the gas production around day 40. The average methane content was $62 \pm 3\%$, although lower values (55.7%) were observed around day 40, which was associated with the decrease in biogas production of the system.

Figure 6.2. Daily biogas production of co-digestion system SM_A2.

The theoretical amount of methane produced can be calculated using the Buswell formula (Buswell and Neave, 1930) and assumptions proposed by Fountoulakis and Manios (2009). The methane produced from the exclusive utilization of glycerine as substrate for a mixture at 2% (v/v) would be $896 \text{ ml CH}_4\cdot\text{d}^{-1}$ which approximates to the total amount the reactor was producing from the organic matter content in the feeding mixture, clearly indicating that the substrate was not completely utilized. Additionally, from results obtained under batch digestion, the methane yield was $0.14 \pm 0.01 \text{ l CH}_4\cdot\text{g}^{-1} \text{ COD}$ while the SMP for the reactor under continuous operation supplemented with 2% of glycerine was lower. Differences between methane yield under batch digestion and continuous operation has also been reported by Hansen *et al.* (1998) in the thermophilic digestion of SM, with the results of biochemical methane potential being much lower than those obtained at continuous operation. The methane produced under batch digestion was $300 \text{ ml CH}_4\cdot\text{g}^{-1} \text{ VS}$ while the SMP at continuous operation was $67 \text{ ml CH}_4\cdot\text{g}^{-1} \text{ VS}$.

Performance parameters of reactors evaluated are presented in Table 6.3. Although average values are presented for the period studied, analyses corresponding to this particular system were performed from day 40 on. Higher values of soluble COD were found close to day 40 and were in correspondence with the initial decrease in the volume of biogas produced. With the increment in the production of gas there was an associated decrease in the mean value of this parameter. Although the deterioration of performance parameters is a temporal circumstance, this result may be rationalized either by an inadequate acclimation period or by a high COD supplemented from the glycerine with respect to the COD of the SM. However, this type of transient variation may be common in systems presenting inhibitory factors and any attempt to explain erratic changes from single-value observations is undertaken with care.

Table 6.3. Performance parameters of digester treating different mixtures of SM and glycerine

Parameter	SM_A2	SM_M2	SM_M5	SM_M8
pH	7.7	8.5	8.4	8.3
SMP ($1 \text{ CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ COD}$)	0.11	0.10	0.14	0.17
TS ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	26.1	49.2	56.9	57.2
VS ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	17.7	31.3	37.8	38.7
NH_4^+ ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	5.3	4.7	4.7	4.0
Alkalinity ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	14.2	17.8	18.9	16.6
COD sol ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	25.7	51.2	68.3	60.0
%VS dest	52.0	41.5	47.5	54.2

Regarding the evolution of VFA for this digestion system (Figure 6.3) it is observed that at the moment measurements were carried out, high concentrations of acetic and propionic acids were found in the digester effluent. Around day 55 there was a continuous decrease in the concentration of acetic acid being coincident with the improvement in biogas production. However this is not the case for propionic acid presenting a minor decrease close to the end of experimentation. Although digestion was carried out for three HRT, from VFA evolution is observed that steady state was not attained, thus results confirm the statement by Hashimoto *et al.* (1986) that even after three to four volumes turnovers,

assuming steady state may lead to erroneous conclusions when inhibitory substances are present in the substrate.

Mineralization of organic matter under methanogenic conditions proceeds in a number of steps, carried out by different groups of bacteria (Harper and Pohland, 1986). When easily degradable substrate are being degraded, as it is the case of glycerine, hydrolysis is not the limiting step and oxidation of VFAs and methanogenesis, which are low-energy yielding, are often the rate-limiting steps in anaerobic reactors (Pavlostathis and Giraldo-Gómez, 1981), thus explaining VFA accumulation. Although high values of VFAs were found in the present study, no modifications in the pH were observed during the experimentation.

The alkalinity is mainly dependent on the bicarbonate and VFA-concentrations ($-\log[\text{acid dissociation constant}]$ [pKa] values of 6.35 and 4.75, respectively) and in some processes the ammonium concentration (pKa value of 9.4) (Jantsch and Mattiasson, 2004) where the content of this ion in the reactor is high. When proteins are degraded, ammonium is released forming ammonium bicarbonate, which results in additional buffering of the reactor liquid (Gallert *et al.*, 1998). Georgacakis *et al.* (1982) and Patni and Jui (1985) reported the pH of manure slurries to be determined by the strength of the $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{=}$ and $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ buffer systems, and the concentration of VFA. The increase in the concentration of VFA in swine manure digesters reduces the importance of the $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{=}$ buffer system, with the pH of the slurry being determined primarily by VFA and ammonia concentrations (Georgacakis *et al.*, 1982; Paul and Beauchamp, 1989).

Total ammonium content was at high levels in the digester liquor, giving rise to high free ammonia concentrations. Setting the limits of inhibitory to microbial population at approximately $150\text{--}200\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Braun *et al.*, 1981), the calculated concentration of free ammonia in SM_A2 digester was above this threshold, with mean values around $396 \pm 27\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. In this sense, incapability of VFA degradation may be explained by inhibitory effects caused by high free ammonia concentrations. Although a strong inhibitory effect over acetoclastic methanogens has been reported (Hansen *et al.*, 1998; Robbins *et al.*, 1989), a major propionic build-up was observed in the present study while acetate concentration in the reactor could be finally reduced. Propionic accumulation has also been reported by Arbeli *et al.* (2006) in the treatment of high-strength dairy wastewater.

Figure 6.3. VFA evolution for co-digestion system SM_A2

The biogas production of SM_M2 is shown in Figure 6.4A, registering a constant increase corresponding to the increase in the OLR (from 7.8 ± 0.2 to 13 ± 0.4 g COD·d⁻¹). Once conditions for assessment were established (HRT of 30 days), biogas production remained steady. Average gas production in this case was 2.13 ± 0.2 l·d⁻¹ (calculated for the period at constant HRT, from day 30 to the end of experimentation), being higher than the one obtained in the previous system studied, with an average CH₄ content of $62.6 \pm 2.4\%$. The higher production obtained was in relation to the greater content of VS of the SM used, since SMP for the system was similar to the one obtained with its homologous digester using SM_A.

Evolution of VFAs for co-digestion with SM_M2 is presented in Figure 6.5A. In contrast to the previous SM evaluated, once the HRT of 30 days had been reached, a low content of VFA was initially observed (during the adaptation period and the following days) but continuous feeding of the digester led to an increase of acetic and propionic acid, although no compassing effect was associated with the gas evolution. Close to the end of experimentation period, both acids were continuously reduced having previously reached peak concentrations, probably indicating that microbial populations could adapt under varying conditions.

The total ammonium concentration in the reactor effluent registered an increase as the experimentation proceeds, with an initial concentration of 3.3 ± 0.1 g·l⁻¹. The mean value of free ammonia obtained (discarding values from the adaptation period) was 1061 ± 46

mg·l⁻¹. Although values should be consider inhibitory, after a three HRT of evaluation, acclimation of microflora to such conditions was observed as indicated by a reduction in VFA concentrations at the end of the digestion. This different behaviour in relation to VFA accumulation may be indicating that in the previous case (SM_A2) the propionic build-up might be a consequence of the lower proportion of VS supplemented by the SM and not a result of either improper adaptation or inhibitory levels of free NH₃.

Figure 6.4. Daily biogas production of co-digestion systems with SM_M and residual glycerine: (A) SM_M2, (B) SM_M5, (C) SM_M8.

HRT: Hydraulic retention time; VFA: Volatile fatty acids.

Figure 6.5. VFA concentrations of co-digestion systems with SM_M and residual glycerine: (A) SM_M2, (B) SM_M5, (C) SM_M8.

The effect of an increment in the content of residual glycerine to 5 and 8% when digesting SM_M on gas production is observed in Figure 6.4B & C. As in the previous reactors, with the continuous increment of the OLR (from 10.2 ± 0.3 to 17.1 ± 0.6 g COD $\cdot$ d $^{-1}$ in the case of SM_M5, and from 11.7 ± 0.3 to 19.5 ± 0.5 g COD $\cdot$ d $^{-1}$ for SM_M8), biogas

production was increased showing slight variations in the generation of gas during the complete time of experimentation. The average production was higher in each reactor in relation to the higher glycerine content of the feed. SM_M5 presented a mean production of $3.84 \pm 0.3 \text{ l}\cdot\text{d}^{-1}$ while this value for SM_M8 was $5.37 \pm 0.3 \text{ l}\cdot\text{d}^{-1}$. The average concentration of CH_4 in the biogas was $62.4 \pm 2.1\%$ in both cases indicating no deterioration of the quality with the increase in the amount of co-substrate added. Additionally, an increase in the SMP was obtained with the higher OLR applied to the different systems. This increase may be rationalized by a synergistic co-fermentation effect during the treatment of both substrates rather than a simple increase in the production of gas due to the higher amount of readily degradable substrate available to microorganisms in the reactor. Although an improvement in the biogas production (in the digestion of SM) has not been corroborated when glycerine is added as co-substrate since only SM was evaluated as single substrate under batch conditions. The addition of glycerine under continuous operation resulted in higher SMP with the increase of the amount of glycerine added to the feeding mixture. However, as in the previous case evaluated (SM_A2), the theoretical value of methane produced was similar to the total volume of methane produced from the mixture at 5 and 8% (v/v, glycerine addition), which may be used as an indicator of incomplete utilization of substrates.

Figures 6.5B & C show VFA profiles during the experiment. As in the cases of SM_M2, the system working with a 5% content of glycerine presented an initial reduction of the content of these acids. However, as the continuous process was evaluated, there was a permanent increase in the concentration of acetic and propionic acids resulting in higher concentrations when compared to the previous system at 2% of residual glycerine, indicating that the generation of these intermediaries derived primarily from the glycerine added. At the end of experimentation reductions were not observed as was the case of the previous systems analyzed, indicating that microorganisms were unable to use the substrate completely. In this case, propionic and acetic degradation were inhibited during operation of the digester.

Before being degraded to CH_4 , VFA are first degraded to acetic acid, therefore accumulation of propionic acid always result in failure of methanogenesis (Wang *et al.*, 2009). VFA concentrations above $2.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ have caused inhibition of cellulose degradation (Siegert and Banks, 2005), while VFA values above $4.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ only caused feeble inhibition

of glucose degradation (Yeole *et al.*, 1996). During digestion at 5% glycerine total VFA values were above $4.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ indicating that degradation of some complex substrates may be inhibited but it may be considered that the effect on simple substrates as glycerol may be disregarded. In fact, SMP of this system was higher than the one obtained for the digestion system at lower glycerine content, indicating that although the digester was suffering from an inhibition problem, the effect over conversion of glycerine to CH_4 was low, explaining thus the increase of SMP with the increase in the content of glycerine in the mixture.

As in the case of reactor SM_M2, with lower glycerine content, a constant increase in the total ammonium concentration was observed in SM_M5 reactor until a steady behaviour was attained from day 40 onward of operation. The initial value was $3.4 \pm 0.1 \text{ NH}_4^+ \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, while the mean value obtained during the three periods studied at constant HRT was $4.7 \pm 0.8 \text{ NH}_4^+ \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Table 6.3). Free ammonia content in this reactor was $1013 \pm 75 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, an average value similar to that obtained from SM_M2. Although in the previous system studied, VFA could be reduced when experimentation was coming to an end, in SM_M5, acetic and propionic acid presented an increasing trend. In this sense, regarding ammonia toxicity, both systems confront similar circumstances. However, the higher content of VFA in the digester effluent may be translated into a longer time needed for microorganisms to be able to reduce VFA accumulated in the digester.

An increase in the content of glycerine to the co-digestion mixture (to 8%) revealed an earlier build-up of acetic and propionic acid concentrations. Although acetic was continuously reduced during the acclimation period, this is not the case for propionic acid. Thus, the microbial population is facing high concentrations of this acid in an earlier stage, which was not the case in the previous digesters. Since higher values of VFA were found with every increase in the proportion of glycerine to the system, the hypothesis of accumulation of these acids by the addition of the co-substrate is corroborated. Additionally, with the time of experimentation, propionic acid concentration keeps its increasing trend until reaching a peak around day 90 with a value close to $4.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. The persistent build-up in all reactors studied may be explained by the lower degradation rate of propionic acid by methanogens compared with acetic and butyric acid degradation (Braun *et al.*, 1981; Ren *et al.*, 2003). However, in this case, in which microflora face a prolonged stage at high concentrations, the final consequence from the long acclimation is the degradation of the intermediary close to the end of the digestion.

From the three reactors evaluated it was observed that VFA accumulated as the glycerine content was increased, indicating the existence of a threshold. Amon *et al.* (2006) reported an increase in the CH₄ yield from anaerobic digestion of protein-dominated substrates (maize silage, rapeseed meal and pig manure) with the addition of glycerine, recommending that the amount of this co-substrate should not exceed 6% (v/v) for a stable digestion process. In the present study is observed from Figure 6.4C a trend to decrease biogas production with the digestion time. In this sense, the statement that a suitable threshold should be a value lower than 8% (v/v) may be accepted. Additionally, the study of a final maturation stage should also be considered in a future research work if land disposal is the selected option for recycling nutrients from the digestate obtained in order to attain a reduction in VFA concentrations

The evolution of ammonium concentration in the digester SM_M8 is similar to that reported for the previous reactors, with an initial value of $2.94 \pm 0.1 \text{ NH}_4^+ \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, with increasing concentrations being registered as the system operated. However, the increase in glycerine content of the feeding mixture allows an increase of the C/N ratio, which is translated into a lower value of total ammonium in the reactor during the period of study at constant HRT (Table 6.3). Since microbial population experience lower free ammonia levels in this digester ($695 \pm 52 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), it seems plausible to assume that this lower level allowed the conversion of VFA by reducing the factor of ammonia toxicity over methanogens in the transformation of acetic and propionic acid into methane.

6.4. CONCLUSIONS

The anaerobic co-digestion of swine manure (SM) and residual glycerine proved to be a feasible option for increasing biogas production and thus efficiency of existing facilities. The average gas and the specific methane production of systems evaluated increased with the increasing content of residual glycerine in the mixture. However, the supplementation of residual glycerine also caused an increase in the content of volatile fatty acids (VFAs) in the digester effluent, although an adaptation period was introduced in the start-up phase of all reactors evaluated. Propionic build-up was persistent in the different digestions systems evaluated.

The content of free ammonia in the reactors was higher than those reported as inhibitory, perhaps contributing to the inability of the system to achieve stable conditions during the period of study (equivalent to three HRTs).

6.5. EXECUTIVE SUMMARY

Co-digestion of glycerine and swine manure (SM) under semi-continuous operation was tested in single-phase completely stirred tank reactors. The addition of this co-substrate allowed an increase in biogas and specific methane production with the increase in the content of residual glycerine in the mixture. Although systems presented steady gas production during the period of evaluation, a propionic and acetic acid build-up resulted as consequence of the conjunctions factors of a high COD supplemented by the readily degradable substrate (glycerine) and high free ammonia concentration in the reactor. Attaining a reduction in volatile fatty acid concentrations should be considered in a further study by means of a maturation stage if land disposal is the final option of the digestate in order to attain the aim of recycling nutrients.

6.6. FUTURE PERSPECTIVE

Anaerobic digestion of livestock waste will be in the near future a leading option for the treatment of high strength organic waste materials, since it allows the recovery of energy (by means of biogas valorization) from biomass with high water content and prevents pollution caused by the uncontrolled release to water bodies of nitrogen and organic matter. The increasing size of pig farms poses a problem due to the lack of available land to dispose the total amount of pig manure generated, especially in the winter period. Additionally, the choice of anaerobic digestion as an alternative for treating pig manures increases the percentage of renewable energy in the total energy supply. However, many assignments are still pending as it is stable policies and the removal of local constraints that may allow the digestion of co-substrates resulting in an increase of the economic feasibility of treatment plants.

6.7. REFERENCES

- Amon, Th., Amon, B., Kryvoruchko, V., Bodiroza, V., Pötsch, E., Zollitsch, W., 2006. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of dairy systems and of glycerine supplementation. *International Congress Series* 1293, 217 - 220.
- APHA-AWWA-WPCF, 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, New York.
- Arbeli, Z., Brenner, A., Abeliovich, A., 2006. Treatment of high-strength dairy wastewater in an anaerobic deep reservoir: Analysis of the methanogenic fermentation pathway and the rate-limiting step. *Water Research* 40 - 19, 3653 - 3659.
- Bernet, N., Béline, F., 2009. Challenges and innovations on biological treatment of livestock effluents. *Bioresource Technology* 100 - 22, 5431 - 5436.
- Braun, R., Huber, P., Meyrath, J., 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion, *Biotechnology Letter* 3, 159 - 164.
- Buswell, E.G., Neave, S.L., 1930. Laboratory studies of sludge digestion. Illinois. Division of State Water Survey, Bulletin N° 30.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., Yenigun, O., 2005. Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochemistry* 40, 1285 - 1292.
- Chae, K.J., Jang, A., Yim, S.K., Kim, S., 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology* 99, 1 - 6.
- Feng, C., Shimada, S., Zhang, Z., Maekawa, T., 2008. A pilot plant two-phase anaerobic digestion system for bioenergy recovery from swine wastes and garbage. *Waste Management NY*. 28, 1827 - 1834.
- Flotats, X., Bonmatí, A., Fernández, B., Magrí, A., 2009. Manure treatment technologies: On-farm versus centralized strategies. NE Spain as case study. *Bioresource Technology* 100, 5519 - 5526.
- Fountoulakis, M.S., Manios, T., 2009. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology* 100, 3043 - 3047.
- Gallert, C., Bauer, S., Winter, J., 1998. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 495 - 501.
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I., Mavris, V., 2007. Optimization of

- biogas production from olive-oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry-manure. *Applied Energy* 84 - 6, 646 - 663.
- Georgacakis, D., Sievers, D.M., Ianotti, E.L., 1982. Buffer stability in manure digesters. *Agricultural Wastes* 4, 427 - 441.
- González-Fernández, C., León-Cofreces, C., García-Encina, P.A., 2008. Different pretreatments for increasing the anaerobic biodegradability in swine manure. *Bioresource Technology* 99, 8710 - 8714.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* 38, 5 - 12.
- Harper, S.R., Pohland, F.G., 1986. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 28, 585 - 602.
- Hashimoto, A.G., 1986. Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes* 17, 241 - 261.
- Jantsch, T.G., Mattiasson, B., 2004. An automated spectrophotometric system for monitoring buffer capacity in anaerobic digestion processes. *Water Research* 38 - 17, 3645 - 3650.
- Kaparaju, P., Rintala, J., 2005. Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resources Conservation and Recycling* 43 - 2, 175 - 188.
- Liu, K., Tang, Y-Q., Matsui, T., Morimura, S., Wu, X.L., Kida, K., 2009. Thermophilic anaerobic co-digestion of garbage, screened swine and dairy cattle manure. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 - 1, 54 - 60.
- Ma, J., Van Wambeke, M., Carballa, M., Verstraete, W., 2008. Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by codigestion with glycerol. *Biotechnology Letters* 30, 861 - 867.
- Mata-Álvarez, J., Macé, S., Llabres, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74, 3 - 16.
- Murto, M., Björnsson, L., Mattiasson, B., 2004. Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management* 70, 101 - 107.
- Oleszkiewicz, J.A., Kosiarski, S., 1981. Management and treatment of wastes from large piggeries. *Agricultural Wastes* 3, 123 - 144.
- Patni, N.K., Jui, P.Y., 1985. Volatile fatty acids in stored dairy cattle slurry. *Agricultural Wastes* 13, 159 - 178.

- Paul, J.W., Beauchamp, E.G., 1989. Relationship between volatile fatty acids, total ammonia, and pH in manure slurries. *Biological Wastes* 29, 313 - 318.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gómez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology* 24 - 8, 35 - 59.
- Ren, N.Q., Liu, M., Wang, A.J., Ding, J., Hong, M., 2003. Organic acids conversion in methanogenic-phase reactor of the two phase anaerobic process. *Environmental Science* 24 - 4, 89 - 93.
- Robbins, J.E., Gerhard, S.A., Kappel, T.J., 1989. Effects of ammonia in anaerobic digestion and an example of digester performance from cattle manure protein mixtures. *Biological Wastes* 27, 1 - 14.
- Siegert, I., Banks, C., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry* 40 - 11, 3412 - 3418.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., 2006. Livestock's long shadow—environmental issues and options. FAO, 390.
- Vieitez, E.R., Ghosh, S., 1999. Biogasification of solid wastes by two-phase anaerobic fermentation. *Biomass and Bioenergy* 16, 299 - 309.
- Wang, Y., Zhang, Y., Meng, L., Wang, J., Zhang, W., 2009. Hydrogen–methane production from swine manure: Effect of pretreatment and VFAs accumulation on gas yield. *Biomass and Bioenergy* 33, 1131 - 1138.
- Yeole, T.Y., Gokhale, S., Hajarnis, S.R., Ranade, D.R., 1996. Effect of brackish water on biogas production from cattle dung and methanogens. *Bioresource Technology* 58 - 3, 323 - 325.

***7. Ensayos de estabilización del efluente de
digestión de purín – glicerina***

7.1. INTRODUCCIÓN

En el proceso de digestión anaerobia tratado en el capítulo anterior, tiene lugar la degradación biológica de purines porcinos suplementados con glicerina residual. Como consecuencia de la biometanización, se genera un nuevo efluente que potencialmente podrá ser utilizado como fertilizante o enmienda orgánica en suelos. Como se ha mencionado anteriormente, existen riesgos inherentes a la aplicación de biosólidos no estables o inmaduros¹ (Said-Pullicino y Gigliotti, 2007; Adani *et al.*, 2006), por lo que en este capítulo se pretende estudiar la evolución de la etapa de estabilización a fin de optimizar el proceso.

¹ La **madurez** de un biosólido se refiere al grado de humificación del material. La **estabilidad** se refiere al nivel de actividad microbiana de la biomasa

El estudio de la transformación sufrida por la materia orgánica durante los procesos biológicos no resulta sencillo. Se han propuesto diferentes parámetros de evaluación de las cualidades de la materia orgánica, resultando de interés los análisis termogravimétricos y espectroscópicos (Otero *et al.*, 2002; Gomez-Rico *et al.*, 2005). En este estudio se va a hacer uso de la espectroscopía de RMN. Según Chen (2003), las metodologías de análisis espectral son las que permiten avanzar en el entendimiento de los procesos de degradación de la materia orgánica. En ellas los niveles energéticos en los cuales aparecen las bandas dependen de las propiedades de las moléculas, asociándose las bandas individuales con grupos químicos específicos. A su vez, las magnitudes de dichas bandas individuales dependen de las concentraciones, permitiendo realizar análisis cuantitativos.

La RMN es una técnica muy potente para determinar la estructura molecular de muestras puras. Sin embargo, en análisis de materias no purificadas, debido a la complejidad de los resultados, se impide la determinación precisa de las estructuras químicas presentes. No obstante, atendiendo a las regiones genéricas de los espectros, pueden vislumbrarse las principales estructuras orgánicas que componen las muestras.

En este estudio se realizó el seguimiento de la estabilización del contenido de dos reactores de digestión anaerobia de purín suplementado con glicerina, empleándose para ello técnicas de espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN).

7.2. OBJETIVOS

Este capítulo está enfocado al seguimiento de la estabilización del digerido de purín glicerina mediante el estudio de parámetros físico-químicos y determinar el tiempo mínimo del proceso.

En este experimento se pretende obtener los espectros de resonancia de ^1H de las muestras extraídas durante el progreso de la estabilización para visualizar señales características de grupos funcionales que puedan aportar información acerca de las estructuras moleculares mayoritarias. Asimismo se compara la evolución de un reactor estabilizado en régimen mesofílico y otro en condiciones ambientales.

7.3. MATERIAL Y MÉTODO

7.3.1. Procedimiento experimental

Este estudio se desarrolló a partir del efluente resultante del proceso fermentativo descrito en el Capítulo 6, ya que el presente experimento está vinculado secuencialmente.

Se consideraron los contenidos resultantes de los reactores SM_M5 y SM_M8, los cuales fueron alimentados con purín suplementado con glicerina al 5 y 8% (v/v) respectivamente. Ambos digeridos se almacenaron en botellas de vidrio de 3 l, sin aporte de alimentación y conectados a un gasómetro de botella para evaluación de la producción residual de biogás. El contenido del reactor SM_M5 se mantuvo termostatzado en baño de agua en régimen mesofílico (34 ± 1 °C). El digerido SM_M8 se mantuvo a temperatura ambiente en una dependencia exterior (Ver Anexo 7.1. Grafico de temperatura media diaria del periodo de experimentación).

El distinto contenido en la glicerina alimentada a ambos reactores durante la etapa fermentativa no se ha considerado una variable a introducir en el experimento, ya que se supone la degradación completa del glicerol al comenzar la etapa de estabilización. Esta suposición se confirmará con el análisis de RMN de la primera muestra de digerido en estabilización.

En cada reactor de estabilización (SM_M5 y SM_M8) se extrajeron 3 muestras de 200 ml de contenido para posteriores analíticas; una vez finalizada la digestión (SM_M5_0 y SM_M8_0), otra a los tres meses de comenzar el proceso de estabilización (SM_M5_1 y SM_M8_1), y una última a los 10 meses (SM_M5_2 y SM_M8_2)). Además se tomó una muestra de las últimas alimentaciones introducidas en ambos digestores (SM_M5_Alím y SM_M8_Alím). Todas las muestras fueron secadas a 105 °C en estufa durante 2 días y se almacenaron herméticamente a temperatura ambiente.

Las muestras secas procedentes de los reactores SM_M5 y SM_M8 se trituraron en un molino de bolas (modelo Mixer Mill type MM200 de Retdch GMBH & Co.) a 30100 rpm durante 4 minutos. En el caso de las muestras de alimentación (SM_M5_Alím y

SM_M8_Alím), el triturado se vio dificultado por una posible hidratación de la muestra durante el almacenado, por lo que se procedió a un nuevo secado a 105 °C durante 3 días. Tras esto la muestra se trituró sin dificultad.

7.3.2. Substratos utilizados

El sustrato de este experimento es la materia resultante del proceso de digestión anaerobia de los reactores SM_M5 y SM_M8. En la Tabla 7.1 se exponen las caracterizaciones básicas analizadas de la mezcla de alimentación (SM_M5_Alím y SM_M8_Alím) y del digerido al comenzar la estabilización (SM_M5_0 y SM_M8_0).

Tabla 7.1 Caracterización básica de las mezclas de alimentación y contenido de los reactores SM_M5 y SM_M8 al comenzar la estabilización.

	SM_M5_Alím*	SM_M5_0**
ST (g·l ⁻¹)	91,6 ± 0,5	56,9 ± 0,3
SV (g·l ⁻¹)	72,0 ± 0,4	37,8 ± 0,2
pH	8,0 ± 0,19	8,4 ± 0,10
NH ₄ ⁺ (g·l ⁻¹)	4,7 ± 0,6	4,7 ± 0,7
DQO (gO ₂ ·l ⁻¹)	170,7 ± 5,7	68,3 ± 2,5

	SM_M8_Alím*	SM_M8_0**
ST (g·l ⁻¹)	103,0 ± 0,4	57,2 ± 0,4
SV (g·l ⁻¹)	84,5 ± 0,4	38,7 ± 0,3
pH	7,9 ± 0,02	8,3 ± 0,18
NH ₄ ⁺ (g·l ⁻¹)	4,3 ± 0,6	4,0 ± 0,6
DQO (gO ₂ ·l ⁻¹)	195,2 ± 5,2	60,0 ± 2,9

*Análisis de las alimentaciones introducidas durante la fase de digestión.

**Análisis del digerido al finalizar la fase de digestión.

7.3.3. Técnicas analíticas

La producción de biogás fue medida utilizando un gasómetro de botella por evacuación de líquido.

Para el análisis de DQO, la muestra homogeneizada fue oxidada en presencia de dicromato a 150 °C durante 2 horas en un digestor Hanna C9800. A continuación fue valorada mediante el método titulométrico con sal de Mohr.

Para el seguimiento del proceso de estabilización del digerido se sometieron las muestras extraídas a espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN).

Las muestras a introducir en el equipo de RMN deben estar en fase líquida, por lo que se tomaron 100 mg de muestra sólida y se mezclaron con 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Se agitaron repetidas veces de forma manual durante 2 horas, para poner en contacto la muestra con el disolvente. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 3.5 minutos, se extrajeron 600 μl de sobrenadante y se depositaron en el tubo porta-muestras a introducir en el equipo Bruker Avance 600 MHz NMR Spectrometer.

Finalmente se obtuvieron los espectros de la alimentación, del digerido al finalizar la digestión y de las muestras del digerido a los 3 y 10 meses del proceso de estabilización. Se identificaron las señales de resonancia y se llevó a cabo una comparación cualitativa y cuantitativa mediante el soporte informático MestReNova y Microsoft Office Excel 2003.

7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.4.1. Parámetros físico - químicos

Los parámetros físico - químicos pueden utilizarse como índices de la estabilidad del residuo tratado (Bartoszczek *et al.*, 2008). En base a este principio se exponen los resultados de las caracterizaciones analizadas durante la experimentación.

Atendiendo a los SV y ST se produce una disminución con respecto a la fase de digestión, estabilizándose en $30,2 \pm 3,4 \text{ gSV}\cdot\text{l}^{-1}$ y $51,6 \pm 4,8 \text{ gST}\cdot\text{l}^{-1}$ para el SM_M5, y en $37,9 \pm 1,9 \text{ gSV}\cdot\text{l}^{-1}$ y $59,3 \pm 0,9 \text{ gST}\cdot\text{l}^{-1}$ para el SM_M8, a partir de los 2 meses de experimentación. En la Figura 7.1 se representa la evolución de los SV en ambos reactores en fases de digestión y estabilización.

Figura 7.1. Evolución de los SV en los reactores SM_M5 y SM_M8.

A su vez, analizando la relación entre ambos parámetros (Figura 7.2), se aprecia un descenso relativo del cociente (SV/ST) de entorno al 10% al finalizar la estabilización. Comparando los reactores SM_M5 y SM_M8 entre sí, podemos apreciar cómo el descenso y estabilidad de la relación SV/ST se alcanza más rápido a régimen térmico mesofílico, retrasándose este descenso y estabilidad en el SM_M8 debido probablemente a las bajas temperaturas registradas entre el primer y cuarto mes de estabilización (Ver Anexo 7.1 de temperaturas medias registradas durante la experimentación).

Figura 7.2. Evolución de la relación SV/ST en los reactores SM_M5 y SM_M8.

El pH es uno de los parámetros de diagnóstico en sistemas anaerobios, debiendo situarse en valores de 6,6 - 7,6, aunque por aclimatación de las poblaciones bacterianas se pueden estabilizar a valores superiores (Lay *et al.*, 1997), lo cual es frecuente en el tratamiento de residuos ganaderos. En este caso se operó a valores de pH de $8,4 \pm 0,1$ y $8,3 \pm 0,2$ para SM_M5 y SM_M8 durante la digestión, obteniéndose valores promedio de $8,2 \pm 0,3$ y $8,1 \pm 0,1$ respectivamente durante la estabilización.

Durante el proceso fermentativo de substratos orgánicos ricos en N (caso de las deyecciones ganaderas), suele producirse un aumento en la concentración de N-amoniaco derivado de la degradación del propio substrato. En la Figura 7.3 se expone la evolución de NH_4^+ durante el ciclo de operación de SM_M5 y SM_M8. En ambos reactores se detiene el aumento de NH_4^+ en torno a los dos meses de comenzar la fase de estabilización.

Figura 7.3. Evolución del contenido en N-amoniaco en los reactores SM_M5 y SM_M8.

El análisis de DQO, de forma paralela a lo ocurrido con los sólidos, muestra una disminución evidente al suspenderse el aporte de nueva alimentación. El parámetro se estabiliza tras 1 mes de almacenamiento en ambos reactores (Figura 7.4).

Figura 7.4. Evolución de la DQO en los reactores SM_M5 y SM_M8.

Según Adani *et al.*, (2006) la producción residual de biogás es un indicador adecuado de la estabilidad biológica. En la Figura 7.5 se evidencia esta cuestión, interrumpiéndose la producción de biogás al agotarse la materia fácilmente biodegradable. Hay que observar que la producción de biogás finaliza correlativamente a la estabilización de los SV y de la DQO.

Por otro lado, el reactor SM_M8 está sometido al régimen térmico ambiental. Observando las temperaturas medias diarias durante su periodo de estabilización (ver Anexo 7.1), se comprende la brusca detención en la metanización, no registrándose producción de gas hasta el aumento de temperaturas al finalizar el invierno (ver detalle en Figura 7.5).

Así pues, la producción residual de biogás en SM_M5 se estabiliza en torno a $12,0 \text{ l}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ de reactor a partir del segundo mes. En el caso de SM_M8, dado el colapso producido por la baja temperatura, se considera únicamente los últimos 5 meses del proceso, resultando una producción en torno a $5,4 \text{ l}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ de reactor. Estos datos comparados con las producciones de biogás durante la etapa de digestión, representan niveles de 0,9 y 0,3% para SM_M5 y SM_M8.

Figura 7.5. Producción de biogás residual en los reactores SM_M5 y SM_M8. Detalle del final del proceso.

El seguimiento de la composición del gas no pudo desarrollarse, ya que los bajos caudales registrados conforme avanzó el experimento, no consiguen purgar de forma eficaz el aire introducido en el reactor durante los muestreos de digerido.

7.4.2. Espectrometría ^1H RMN

7.4.2.1. Evolución del proceso de estabilización en régimen mesofílico

Una primera aproximación a los espectros de las Figuras 7.6, 7.7, 7.8 y 7.9 indica que todas las muestras presentan estructuras aromáticas, reflejadas en las señales existentes en el intervalo de desplazamientos químicos de 6.4 a 8.6 ppm (Adani *et al.*, 2006). La multitud de señales distribuidas en el intervalo 2.5 a 0.5 ppm reflejan una elevada complejidad de estructuras alifáticas (Francioso *et al.*, 2007; Guillén *et al.*, 2006). Por otro lado, la amplia señal de agua, situada a 3.5 ppm en los espectros de digerido, indica una desecación parcial o hidratación durante el preparado - almacenamiento de las muestras. A su vez el agudo triplete en torno a 2.5 ppm marca la posición del DMSO- d_6 .

Figura 7.6. Espectro ^1H RMN de la alimentación introducida en el reactor (SM_M5_Alím).

Figura 7.7. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido (SM_M5_0).

Figura 7.8. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 3 meses (SM_M5_1).

Figura 7.9. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 10 meses (SM_M5_2).

- Identificación de las señales en los análisis ^1H RMN

Centrándose en el espectro de la muestra de alimentación, por considerarlo referencia y el más completo en cuanto a señales detectadas, destacan dos picos preponderantes en la región de los compuestos alifáticos: la primera, con un desplazamiento químico de 0.82 ppm, indica los H unidos a metilos terminales (Francioso *et al.*, 2007) y la situada a 1.2 ppm muestra los metilenos de las cadenas alifáticas (Guillén *et al.*, 2006) (Ver Tabla 7.2 de identificación de señales del espectro de resonancia ^1H NMR). Prosiguiendo en el intervalo de metilenos alifáticos, aparecen las señales localizadas a 1.42 y 1.46 ppm, que se corresponden con hidrógenos ligados al carbono gamma no terminal de un radical carboxilo.

Dentro del grupo de señales emplazado entre 1.9 a 2.0 ppm se puede relacionar el pico situado en torno a 1.96 ppm con metilenos contiguos a insaturaciones (Guillén *et al.*, 2006). Esta propuesta está en concordancia con la intensidad de señal registrada a 2.24 ppm, referida a metilos terminales ligados a insaturaciones y con el pico del intervalo 5.2 a 5.35 ppm referido a los propios protones de la insaturación (Xu *et al.* y Vivas *et al.* 2006).

La señal situada a 2.05 ppm corresponde a los metilenos beta ligados a grupos carboxilo, y por tanto emparentada con la ya mencionada señal a 1.42 - 1.46 ppm, referida a metilenos gamma de grupos carboxilo.

Tabla 7.2 Identificación de señales del espectro de resonancia ^1H RMN.

Señal (ppm)	Estructura molecular relacionada	Referencias
0.6 - 0.84	Metilos terminales de cadenas alifáticas [$-\text{CH}_3$]	Francioso <i>et al.</i> , 2007
1.22 - 1.42	Metilenos de cadenas alifáticas [$(-\text{CH}_2)_n$]	Guillén <i>et al.</i> , 2006
1.42 - 1.46	Metilenos de carbono gamma no terminal de un radical carboxilo	Universidad de Barcelona *
1.6 - 1.68	Protones de radicales sulfhidrilos	Cardonas <i>et al.</i> , 2003
1.94 - 2.14	Metilenos contiguos a insaturaciones	Guillén <i>et al.</i> , 2006
2.05	Metilenos beta ligados a grupos carboxilo	Universidad de Barcelona *
2.24	Metilos ligados a insaturaciones	Universidad de Barcelona *
2.34 - 2.58	DMSO-d6	
3.10 - 3.35	Grupos amino metino o metilenos unidos a amidas	Adani <i>et al.</i> , 2006
3.5 - 3.84	Glicerol	Pionnier <i>et al.</i> , 1997
3.62	Radical etil eter o grupo etilo unido al grupo amida ($-\text{NHCOR}$)	Guimaraes <i>et al.</i> , 2001
3.77 - 3.91	Metilos unidos a grupos $-\text{OR}'$ o $-\text{OCOR}'$ ($\text{R}' = \text{fenol}$)	Guimaraes <i>et al.</i> , 2001
4.02 - 4.2	Metilenos unidos a los grupos $-\text{OCOR}$ (donde R es un radical alkilo), $-\text{OCOR}'$ o $-\text{OR}'$	Guimaraes <i>et al.</i> , 2001
5.04	Grupos metoxi en anillos aromáticos	Larghi & Kauman, 2006
5.2 - 5.35	Protones en insaturaciones	Xu <i>et al.</i> , 2006 y Vivas <i>et al.</i> , 2006
6.4 - 8.6	Protones aromáticos	Xia <i>et al.</i> , 2003; Adani <i>et al.</i> , 2006
7.82	Protones bencénicos	Castillo <i>et al.</i> , 2001

* Sugerencia aportada por el personal de la Unitat de RMN de la Universitat de Barcelona.

Prosiguiendo en la lectura del espectro, aparece la señal del dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-d6) empleado como disolvente, la cual está compuesta por un triplete en las posiciones 2.34, 2.46 y 2.58 ppm.

A 3.15 - 3.20 ppm aparece una señal, que podría relacionarse con grupos amino metino o con metilenos unidos a amidas (Adani *et al.*, 2006).

El espectro del glicerol presenta una silueta compuesta por un quintuplete seguido de dos cadrupletes donde la característica distorsión en las alturas de sus picos permite identificar inequívocamente esta molécula. Según datos bibliográficos, el glicerol aparece en el intervalo 3.5 - 3.84 ppm (Pionnier *et al.*, 1997). Sin embargo en los análisis aquí expuestos, las tres señales mencionadas aparecen centradas respectivamente a 3.28, 3.32 y 3.37 ppm. Esta variación en el desplazamiento químico se debe sencillamente a la diferente electronegatividad del patrón interno utilizado en el análisis de RMN, ya que en el estudio considerado en la bibliografía se trabajó con N, N-tetrametilurea y en nuestro caso se empleó dimetil sulfóxido.

Guimaraes *et al.*, (2001), llevó a cabo un estudio de caracterización de ácidos húmicos derivados de vermicompostaje mediante espectroscopía de ^1H RMN, utilizando como patrón interno NaOD en agua deuterada. Comparando los espectros resultantes se comprueba que los desplazamientos químicos en las señales detectadas son similares a los aquí obtenidos utilizando DMSO- d_6 . Por tanto se podrá suponer, con cierta cautela, el origen de las señales reflejadas en el intervalo 3.5 a 4.0 ppm,

Así pues, la señal situada a 3.58 ppm podría reflejar los protones de un radical etil éter, aunque dado el elevado contenido en N de la muestra, esta señal también podría estar reflejando un grupo etilo unido al grupo amida ($-\text{NHCOR}$). La señal situada a 3.85 ppm podría reflejar metilos unidos a grupos $-\text{O-R}$ o $-\text{OCO-R}$, donde R sea un radical fenólico. Y por último, las señales situadas entorno a 3.98 ppm pueden reflejar los grupos metilenos unidos a los grupos $-\text{OCO-R}$ (donde R es un radical alquilo), $-\text{OCO-R'}$ o $-\text{O-R'}$ (donde R' es un radical fenólico) (Guimaraes *et al.*, 2001). Todo esto estaría en consonancia con sustituyentes propios de la materia lignocelulósica.

En torno a los 5.04 ppm aparece una ligera perturbación de la línea base del espectro de alimentación, que podríamos relacionar con grupos metoxi en anillos aromáticos (Larghi & Kauman, 2006), los cuales forman parte de los ácidos hidroxicinámicos, constituyentes de la lignina. Otra posibilidad es asociar esta señal a grupos metoxi presentes en la materia

estabilizada, que hubiera podido sintetizarse durante el almacenamiento del purín previo a la recogida.

Dentro de la región de los protones en estructuras aromáticas, tenemos la señal más reseñable en torno a 7.18 ppm que de nuevo se relaciona con unidades de materia lignocelulósica, como pueden ser los radicales siringil y guayacil (Xu *et al.* y Vivas *et al.*, 2006), y también se relacionaría con anillos aromáticos presentes en el coloide de la materia humificada.

- Seguimiento del proceso de estabilización del digerido de SM_M5 mediante espectroscopía de ^1H RMN

En este apartado se analizará la evolución de las estructuras químicas identificadas anteriormente, por lo que se considerará el conjunto de espectros derivados del ensayo SM_M5 estabilizado a temperatura 34 °C

Comenzando en el intervalo de los metilos terminales de cadenas alifáticas (0.6 - 0.8 ppm), se comprueba como la aguda señal detectada en el espectro de la muestra de alimentación se modifica a un conjunto más diverso de señales, cuya intensidad conjunta disminuye durante la digestión y vuelve a expandirse conforme progresa la fase de estabilización. Así pues, la superficie integrada de las señales del intervalo 0.9 - 0.6 se contrae un 13% tras el proceso de digestión, expandiéndose un 61% durante la fase de estabilización. Esto indica que los grupos metilo terminales aumentan su presencia, apareciendo en entornos moleculares más complejos. Observando el incremento de las señales en torno a 0.9 ppm, es de suponer un aumento de los metilos terminales cercanos a sustituyentes electronegativos, como pudieran ser O ó N.

Al comparar los espectros de SM_M5_Alim y SM_M5_0 en el intervalo de los metilenos en cadenas alifáticas (1.22 - 1.42 ppm) se aprecia una clara destrucción de estas estructuras durante el proceso de digestión, reduciéndose la superficie de la señal un 90%. A los 3 y 10 meses de haber comenzado el proceso de estabilización, la intensidad y perfil de las señales en este intervalo disminuye de nuevo un 12 y 14% respecto a la señal detectada en SM_M5_0. Todo esto sugiere que las cadenas alifáticas se deterioran en un

porcentaje amplio durante la digestión, frenándose esta degradación durante el proceso de estabilización

Las señales localizadas a 1.42 y 1.46 ppm en el espectro de alimentación se han relacionado con hidrógenos ligados al carbono gamma no terminal de un radical carboxilo, pudiendo presentar dos picos por dos entornos de diferente electronegatividad. Ambas señales estarán relacionadas con la situada a 2.05 ppm, asimilada al carbono beta no terminal de dichos radicales carboxilos. Considerando la condición del carbono γ aquí tratado, se entiende que al menos debe existir un mismo número de Carbonos β no terminales formando parte de dicho radical carboxilo. Esta premisa puede contrastarse analizando el área de las señales implicadas, resultando que el sumatorio de las señales a 1.42 y 1.46 ppm es superior a la intensidad registrada a 2.05 ppm, y únicamente la señal situada a 1.42 ppm presenta un área similar al de la señal a 2.05 ppm (1:0,93), motivo por lo que se considerará que esta señal representa a los carbonos γ aquí mencionados. Analizando la evolución de estas señales en la serie de espectros, se observa que únicamente están presentes en SM_M5_Alím, degradándose estas estructuras durante el proceso de digestión. Una última cuestión relativa a esta estructura carboxílica es localizar el propio grupo carboxílico que debe aparecer de 10 a 13 ppm. Dicho intervalo está vacío de señales, sin embargo se tiene la certeza de la existencia de grupos carboxílicos en las muestras, ya que los análisis de cromatografía indican un contenido en AGVs C2 - C7 de $6,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $3,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en las muestras SM_M5_Alím y SM_M5_0 y estos AGVs deberían estar disueltos en la fracción extraída por el DMSO- d_6 . Por lo tanto se sugiere que los protones ligados a los grupos carboxílicos se encuentran sustituidos.

La señal emplazada en el intervalo 1.6 - 1.68 ppm no está presente en las muestras de alimentación, correspondiéndose probablemente con protones de grupos sulfhidrilos sintetizados durante la digestión - estabilización.

Analizando las señales relativas a las insaturaciones (1.96, 2.24 y 5.27 ppm), se observa una disminución de protones de 84% durante el proceso de digestión, lo que sugiere una casi completa destrucción de estos dobles enlaces, permaneciendo su abundancia invariable durante el proceso de estabilización.

La señal asimilada a grupos amino metino o metilenos unidos a amidas (3.15 - 3.20 ppm), presenta una ligera variación en su desplazamiento químico a lo largo del experimento, lo que sugiere algún cambio en el entorno molecular de estos protones. A su vez, el incremento en la intensidad de la señal indica una densificación de estas estructuras, lo que podría representar un almacenamiento de nitrógeno durante el proceso de estabilización del digerido.

La evolución de la señal del glicerol refleja la rápida degradación de este co-substrato durante la fase de digestión, de manera que apenas se aprecian los multipletes en el espectro SM_M5_0. Hay que considerar que pese a la interferencia ocasionada por los restos de agua, dado el efecto sumatorio de las señales, en caso de persistir resto de glicerol durante la estabilización, se vería reflejado sobre la base de la señal del agua.

Del mismo modo las señales situadas en el intervalo 3.5 - 4.0 ppm identificadas con protones de radicales metilo, etilo y metilenos unidos a amidas, éter, $-O-R'$, $-OCO R'$ y $-OCO-R$ (donde R es un radical alkilo y $R' =$ fenol) desaparecen de los espectros tras el proceso de digestión, a excepción de una débil señal registrada a 3.82 ppm (relacionada con metilos ligados a grupos $-O-R$ o $-OCO-R$, donde R sea un radical fenólico), que permanece invariable en los tres espectros de digerido.

Los grupos metoxi en anillos aromáticos identificados a 5.04 ppm aparecen ampliamente en la naturaleza constituyendo ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico o el sinapínico, que aparecen repetidamente en la materia lignocelulósica (Seca *et al.*, 2000). Considerando el carácter recalcitrante de esta materia, sería esperable una amplia presencia en los espectros desde el inicio del seguimiento. Sin embargo, los análisis RMN apenas detectan señal en la muestra de alimentación, incrementándose durante los procesos de digestión y de estabilización. Este resultado sugiere el enmascaramiento de estos protones propios de la lignina, ocasionado por ejemplo por un alto grado de sustitución (Adani *et al.*, 2006). Por contra, su aparición conforme avanza el experimento podría explicarse por el propio proceso de maduración ligado a la estabilización, ya que este tipo de estructuras son frecuentes en los coloides de la materia humificada.

Esta señal a 5.04 ppm estará ligada a la evolución de las señales en la región de los aromáticos (6.4 - 8.6 ppm). Así pues, la señal detectada en torno a 7.18 ppm, asimilada a

protones aromáticos presentes en la lignina o en sustancias húmicas, aparece en los cuatro espectros, presentando un incremento en la intensidad de señal, con respecto a la muestra de alimentación de 18% durante el proceso de digestión, 42% a los tres meses de estabilización y 110% al finalizar la estabilización. De forma análoga a lo comentado en los grupos metoxi identificados previamente, este resultado sugiere una amplia sustitución de los protones de la materia lignocelulósica, debiéndose el incremento de la señal a la formación de estructuras aromáticas durante la estabilización. Finalmente dentro de esta región de los protones aromáticos, aparece la señal de los protones bencénicos (7.82 ppm), la cual aumenta su intensidad conforme a lo explicado.

7.4.2.2. Evolución del proceso de estabilización en régimen térmico ambiental

Al analizar los espectros de las Figuras 7.10, 7.11, 7.12 y 7.13 se pueden identificar las principales señales descritas en el experimento anterior, mostrando así mismo una similitud en la evolución detectada mediante ^1H RMN.

Figura 7.10. Espectro ^1H RMN de la alimentación introducida en el reactor (SM_M8_Alim).

Figura 7.11. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido (SM_M8_0).

Figura 7.12. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 3 meses (SM_M8_1).

Figura 7.13. Espectro ^1H RMN de la muestra de digerido estabilizado durante 10 meses (SM_M8_2).

- Identificación de las señales en los análisis ^1H RMN

La identificación de las señales de los espectros SM_M8 es análoga a la descrita para el caso SM_M5, por lo que sólo se citarán las diferencias con respecto a este último.

Así pues, a 1.42 ppm aparece una señal aislada, sin detectarse ningún pico a 1.46 ppm (como en el caso de SM_M5), lo que confirmaría nuevamente su equivalencia con los carbonos gamma no terminales de radicales carboxílicos. Esta señal estará por tanto relacionada con la situada a 2.04 ppm identificada con los metilenos beta ligados a grupos carboxilo

- Seguimiento del proceso de estabilización del digerido de SM_M8 mediante espectroscopía de ^1H RMN

Analizando la evolución de las estructuras químicas identificadas en este conjunto de espectros de SM_M8, se comprueba como la afilada señal de los metilos alifáticos terminales (0.82 ppm) desaparece, dando lugar a un conjunto de señales distribuidas en el intervalo 0.55 - 0.95 ppm. El área de esta señal retrocede respecto a SM_M8_Alim tras el proceso de digestión, posteriormente la señal se incrementa conforme avanza la estabilización.

La señal a 1.22 ppm (relativa a los metilenos alifáticos), disminuye un 95% durante el proceso de digestión, y un 2% adicional durante la estabilización.

La señal situada a 1.42 ppm y relacionada con los carbonos gamma no terminales, está en sintonía con la detectada a 2.04 ppm (1:0,97 respectivamente), con lo que de nuevo se cumple la premisa apuntada en el apartado homólogo del reactor SM_M5. Sin embargo, en contraposición de este no aparece la señal indeterminada a 1.46 ppm.

Estas estructuras carboxílicas aparecen solo en el espectro SM_M8_Alim, sugiriendo su degradación durante la digestión.

De forma análoga al caso anterior, la señal del propio grupo carboxílico (10 - 13 ppm), no es detectada, teniendo seguridad en la presencia de estos grupos en las muestras, ya que

los análisis de AGVs C2 - C7 indican un contenido de $5,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $3,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en las muestras SM_M8_Alim y SM_M8_0.

La señal de los metilenos contiguos a insaturaciones (1.9 ppm) está únicamente visible en el espectro de SM_M8_Alim. A su vez, la intensidad de señal de los propios protones de la insaturación (5.2 a 5.35 ppm) disminuye un 88% durante la digestión, permaneciendo el remanente estable durante el proceso de estabilización.

La señal relacionada con grupos amino metino o con metilenos unidos a amidas (3.15 - 3.20 ppm), se incrementa conforme evoluciona el proceso digestión - fermentación, lo que de modo similar a lo comentado en el reactor SM_M5, podría ser un reflejo del almacenamiento de N en el digerido.

La señal de glicerol obtenida en la muestra SM_M8_Alim, presenta una intensidad muy inferior a la detectada en su homólogo SM_M5_Alim. Esta diferencia se debe a una pérdida de la muestra original, que obligó a tomar una segunda muestra del lote de alimentación del SM_M8 varios meses después, lo que explica esta degradación del glicerol detectada en el espectro. En los análisis aplicados al digerido, apenas puede apreciarse la señal, lo que evidencia la rápida degradación del glicerol durante la digestión.

La señal vinculada a metilos unidos a grupos $-\text{O}-\text{R}'$ o $-\text{OCO}-\text{R}'$, donde R' sea un radical fenólico (3.82 ppm) parece incrementarse durante la digestión, permaneciendo invariable durante la estabilización. De forma general el intervalo 3.5 - 4.0 ppm presenta una menor densificación de señales con respecto a SM_M5_Alim, lo cual pudiera relacionarse con una degradación del lote de alimentación posterior al ensayo.

Las señales relacionadas con grupos metoxi en anillos aromáticos (4.95 - 5.15 ppm) podrían corresponder a los ácidos hidroxicinámicos constituyentes de la lignina, sin embargo, dado el aumento continuo en la intensidad de señal a lo largo del seguimiento, podría reflejar el incremento en estructuras aromáticas durante la maduración, sugiriéndose así mismo, un enmascaramiento de los protones de la materia lignocelulósica.

Del mismo modo las señales identificadas como protones en estructuras aromáticas (7.05 - 7.30 ppm) y los protones bencénicos (7.82 ppm) se incrementan un 5% durante el proceso de digestión y un 15 y 16% a los 3 y 10 meses de comenzar la estabilización.

7.5. CONCLUSIONES

- La producción residual de biogás disminuye hasta anularse durante el ensayo de estabilización.
- En base a la evolución del N-amoniaco registrada durante el proceso completo, puede considerarse la conservación del contenido en nitrógeno orgánico durante el almacenamiento.
- El **periodo mínimo de estabilización** considerado para este residuo es de **2 meses**, ya que los **parámetros físico – químicos** analizados durante el seguimiento del ensayo consiguen estabilizarse en torno a este periodo de proceso.
- El seguimiento de la evolución del digerido mediante ^1H RMN, evidencia la degradación de los compuestos alifáticos durante la digestión y la posterior **formación y densificación de estructuras aromáticas** durante la estabilización.
- **La maduración del digerido** registrada mediante ^1H RMN es **superior en el reactor mesofílico** frente al estabilizado en condiciones térmicas ambientales, lo que demuestra la idoneidad de la primera técnica al menos en estaciones frías.

AGRADECIMIENTOS

Se desea agradecer la colaboración de la Unitat de RMN del Parc Científic de Barcelona por el acceso al espectrómetro de RMN Bruker Avance 600 MHz, y de manera especial a Dr Margarida Gairí.

7.6. BIBLIOGRAFÍA

- Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E., 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study, *Chemosphere* 65 - 8, 1414 - 1418.
- Bartoszek, M., Polak, J., Sułkowski, W.W., 2008. NMR study of the humification process during sewage sludge treatment, *Chemosphere* 73 - 9, 1465 - 1470.
- Cardonas, D.P., Castaño, E.D., Saldarriaga, N., Quiñones, W.W., Torres, L.F., Echeverri, L.F., 2003. Aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) en el análisis de medicamentos. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 10 - 2, 80 - 88.
- Castillo, P., Gómez, A., Márquez, H., Plutín, A.M., Morales, M., Pomés, R., Rodríguez, Y.I., Punte, G., Echeverría, G., 2001. Synthesis, crystal and molecular structure of methyl[(4-acetamidophenyl)sulfonyl]carbamate, precursor of herbicide Asulam. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 33 - 2, 77 - 81.
- Chen, Y.N., 2003. Nuclear magnetic resonance, infra-red and pyrolysis: application of spectroscopic methodologies to maturity determination of composts. *Compost Science and Utilization* 11, 152 - 68.
- Dell' Abate, M.T., Canali, S., Trinchera, A., Benedetti, A., Sequi, P., 1998. Thermal Analysis in the evaluation of compost stability: a comparison with humification parameters. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 51, 217 - 224.
- Fernández, J.M., Hockaday, W.C., Plaza, C., Polo, A., Hatcher, P.T., 2008. Effects of long-term soil amendment with sewage sludges on soil humic acid thermal and molecular properties. *Chemosphere* 73, 1838 - 1844.
- Font, R., Fullana, A., Conesa, J.A., Llavador, F., 2001. Analysis of the pyrolysis and combustion of different sewage sludges by TG. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58 - 59, 927 - 941.
- Francioso, O., Ferrari, E., Saladini, M., Montecchio, D., Gioacchini, P., Ciavatta, C., 2007. FG-DTA, DRIFT and NMR characterisation of humic-like fractions from olive wastes and amended soil. *Journal of Hazardous Materials*. 149, 408 - 417.
- Gómez, X., Blanco, D., Lobato, A., Calleja, A., Martínez-Núñez, F., Martín-Villacorta, J., 2011. Study of organic matter degradation under anaerobic digestion of cattle manure. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 102, 3404 - 3410.
- Gómez-Rico, F., Font, R., Fullana A., Martín-Gullón, I., 2005. Thermogravimetric study of different sewage sludges and their relationship with the nitrogen content. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74, 421 - 428.
- Guillén, M.D., Ruiz, A., 2006. Study by means of ^1H nuclear magnetic resonance of the oxidation process undergone by edible oils of different natures submitted to

microwave action. *Food Chemistry* 96, 1323 - 1329.

Guimaraes, E., Mangrich, A.S., Machado, V.G., Traghetta, D.G., Lobo, M.A., 2001. Criterious preparation and characterization of earthworm-compost in view of animal waste recycling. Part II. A synergistic utilization of EPR and ¹H NMR spectroscopies on the characterization of humic acids from vermicomposts. *Journal of Brazilian Chemical Society* 12 - 6, 734 - 741.

Lay, J., Li, Y., Noike, T., 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Research* 31 - 6, 1518 - 1524.

Otero, M., Calvo, L.F., Estrada, B., García, A.I., Morán, A., 2002. Thermogravimetry as a technique for establishing the stabilization progress of sludge from wastewater treatment plants. *Thermochimica Acta* 389 (1 - 2), 121 - 132.

Pietro, M., Paola, C., 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process, *Thermochimica Acta* 413 (1-2), 209 - 214.

Said-Pullicino, D., Gigliotti, G., 2007. Oxidative biodegradation of dissolved organic matter during composting. *Chemosphere* 68 - 6, 1030 - 1040.

Seca A.M.L., Cavaleiro, J.A.S., Domingues, F.M.J., Silvestre, A.J.D., Evtuguin, D., Neto, C.P., 2000. Structural characterization of the lignin from the nodes and internodes of *Arundo donax* reed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 817 - 824.

Utsunomiya, A., Watanuki, T., Matsushita, K., Tomita, I., 1997. Toxic effects of linear alkylbenzenesulfonate and quaternary alkylammonium chloride on *Dunaliella* sp. as measured by ¹H RMN analysis of glycerol. *Chemosphere* 35, 1215 - 1226.

Vivas, N., Nonier, M.F., Pianet, I., Vivas de Gaulejac, N., Bouquet, É., 2006. Structure of extracted lignins from oak heartwood (*Quercus petraea* Liebl., *Q. Robur* L.) *Comptes Rendus Chimie* 9, 1221 - 1233.

Xia, Z., Yoshida, T., Funaoka, M., 2003. Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols). *European Polymer Journal* 39, 909 - 914.

Xu, F., Sun, J.X., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2006. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products* 23, 180 - 193.

ANEXO 7.1.

(Gráfico de temperatura media diaria del periodo de estabilización de SM_M8)

8. Conclusiones generales

La realización del trabajo experimental de digestión y co-digestión de residuos agroindustriales permite extraer las siguientes conclusiones:

8.1. RESPECTO A LOS ENSAYOS DE DIGESTIÓN EN DISCONTINUO Y LOS CO-SUBSTRATOS EMPLEADOS.

- Dentro de los residuos ganaderos analizados en este trabajo y bajo condiciones mesofílicas, el purín porcino presentó el mayor potencial de producción de metano, obteniéndose en el caso del lote SM_M un rendimiento de $512 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$, frente a los $308 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$ del estiércol ovino y los $234 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$ del estiércol vacuno.
- La peladura de patata, la patata frita residual y la glicerina utilizadas, son co-substratos aptos para la digestión de residuos ganaderos en cuanto a producción de metano y estabilidad del proceso, además, una fermentación unitaria de estos subproductos agroindustriales puede ser inestable o inviable.

8.2. RESPECTO A LOS ENSAYOS DE DIGESTIÓN Y CO-DIGESTIÓN EN SEMICONTINUO DE ESTIÉRCOL OVINO - RESIDUO DE PATATA.

- La digestión anaerobia del estiércol ovino y su co-digestión con peladuras de patata y patata frita residual, se llevaron a cabo satisfactoriamente con aportes de carga orgánica comprendidos entre 2,5 y 4 $\text{KgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, consiguiendo rendimientos de producción de metano de $135,8 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$ en el sistema de estiércol y valores comprendidos entre 277,6 y $384,4 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$ en los sistemas de co-digestión. Paralelamente al incremento en la metanización, la co-digestión mejoró el proceso de degradación aumentando la destrucción de SV y la DQO eliminada.
- Aunque el incremento en la carga orgánica aportada al reactor aumenta la producción de metano, la eficiencia de la biometanización depende del sinergismo derivado de la naturaleza de los substratos-mezcla.
- En base a los resultados experimentales se considera como carga orgánica óptima $3,5 \text{ kgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ para la mezcla estiércol ovino - patata frita residual y $2,5 \text{ kgSV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ en el caso de emplear la mezcla estiércol ovino - peladura de patata.

8.3. RESPECTO A LOS ENSAYOS DE CO-DIGESTIÓN EN SEMICONTINUO DE PURÍN PORCINO - GLICERINA.

- La co-digestión anaerobia ha probado ser una opción adecuada para incrementar la producción de biogás, apreciándose un incremento en el rendimiento conforme aumenta el contenido en glicerina de la mezcla aportada. Los reactores suplementados con un 2, 5, y 8% presentaron una producción de metano de 249,2, 332,8 y $396,6 \text{ l CH}_4 \cdot \text{kgSV}^{-1}$ respectivamente (equivalentes a 0,10, 0,14 y $0,17 \text{ l CH}_4 \cdot \text{gCOD}^{-1}$).
- Pese a la mejora en la relación C/N conseguida con el aporte de glicerina, el contenido de amoníaco libre superó los valores considerados inhibitorios, contribuyendo a la incapacidad de los sistemas para lograr condiciones estables durante el periodo de estudio.

- A parte del rendimiento de metanización, en la determinación de la relación de mezcla óptima deben considerarse aspectos relativos a la estabilidad del proceso de digestión que minimice los costes de operación. El aumento del contenido en glicerina supuso un incremento en la producción de metano pero también en la concentración de AGVs del lecho de digestión.

8.4. RESPECTO A LOS ENSAYOS DE ESTABILIZACIÓN DE EFLUENTES DE DIGESTIÓN ANAEROBIA.

- El análisis termogravimétrico y la espectrometría de RMN aplicada a los digestatos de estiércol vacuno y purín-glicerina permitieron comprobar la degradación inicial de los componentes fácilmente oxidables y su posterior transformación en materiales estables. Conforme avanza el proceso de estabilización o degradación-estabilización se produce un incremento en la calidad de la materia orgánica, caracterizado por la formación y densificación de componentes termoestables, complejos nitrogenados y estructuras aromáticas.