

Ensayo potencial bioquímico metanogénico

Una metodología clave para conocer
la energía de las biomasas

Patricia Bres

María Eugenia Beily

Diana Crespo



Ensayo potencial bioquímico metanogénico

Una metodología clave para conocer
la energía de las biomasas

*Patricia Bres
María Eugenia Beily
Diana Crespo*



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

INTA Ediciones
2022

620.91 Bres, Patricia
B75 Ensayo potencial bioquímico metanogénico : una metodología clave para
conocer la energía de las biomasas / Patricia Bres, María Eugenia Beily,
Diana Crespo. – Buenos Aires : Ediciones INTA, 2022.
58 p. : il. (en PDF)

ISBN 978-987-679-321-6 (digital)

i. Beily, María Eugenia. ii. Crespo, Diana. iii. título

BIOMASA – METANO – BACTERIA METANOGENA – ENERGIA – BIOGAS – ANALISIS BIOQUIMICO

DD-INTA

Este documento es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N°26.899.

Este documento ha sido elaborado a través de las adquisición de experiencias, capacitaciones y desarrollos tecnológicos financiados por el Proyecto Específico “Tecnologías y Estrategias de Gestión de Residuos y Efluentes en Sistemas Agropecuarios y Agroindustriales” (PNNAT 1128042) del Programa Nacional de Recursos Naturales, Gestión Ambiental y Ecorregiones (cartera INTA 2013-2019), logrando ser un producto finalizado para su publicación a través del Proyecto Estructural “Bioenergía generada en origen como aporte al desarrollo territorial” (INTA PE-E7-I149-001) del Programa Nacional de Agroindustria, Valor Agregado y Bioenergía (cartera INTA 2019-2023), y a través del proyecto Internacional H2020-FERTIMANURE mediante fondos de la carta acuerdo CA INTA-FA (Fundación ArgenINTA), coordinado por la Ing. Agr. Diana Crespo.

Se agradece al *Dr. Mauricio Passeggi* por su dedicación en la revisión de este trabajo, donde sus aportes y contribuciones brindaron mejoras significativas a este manual técnico. Mauricio es investigador docente de la Universidad de la Republica del Uruguay y tiene una amplia experiencia en investigación aplicada en la ingeniería de reactores de procesos anaeróbicos. También los autores agradecen a todo el grupo BIOPROA y en particular a la *Dra Liliana Borzacconi*, y Mauricio quienes siempre nos han asesorado, capacitado y brindado un apoyo incondicional para el desarrollo metodológico de este ensayo, promoviendo nuestro crecimiento profesional y del laboratorio en esta área temática.

Ilustraciones: Diana Stilinovic

Diseño y diagramación: Julia Gouffier

Revisor: Dr. Mauricio Passeggi. Universidad de la República del Uruguay. Facultad de Ingeniería. Instituto de Ingeniería Química. Área de Biotecnología de Procesos para el Ambiente (BIOPROA)

Este libro
cuenta con licencia:



Autores

Patricia Alina Bres

Doctora en Ciencia y Tecnología, mención Química (UNSAM). Trabaja en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) desde el año 2005. Desde el inicio en su carrera como investigadora participó en proyectos nacionales e internacionales sobre la degradación anaeróbica de residuos agropecuarios y agroindustriales. Su especialización es el análisis integral de la tecnología anaeróbica, mediante la aplicación de herramientas y metodologías que conduzcan a la optimización del proceso y a incrementar la eficiencia de los productos transformados (biogás y digerido).

María Eugenia Beily

Licenciada en Ciencias Ambientales (USAL), Especialista y Magister en Gestión Ambiental (ITBA). Ingresó en el año 2006 al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Desde el inicio de su carrera como investigadora participa en proyectos nacionales e internacionales sobre caracterización y tratamiento de efluentes y residuos agropecuarios y agroindustriales. Se especializa en el análisis y tratamiento de efluentes porcinos, la aplicación de metodologías para la optimización del proceso anaerobio y la evaluación y tratamiento de los digeridos. Ha dirigido tesis de grado y tesis de maestría en la temática y es titular de la cátedra de procesos anaerobios de la Maestría en Ingeniería Sanitaria de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires (FIUBA).

Diana Cristina Crespo

Ingeniera Agrónoma (FAUBA). Trabaja en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) desde el año 1984 y es profesional principal de CONICET. Creó la primera Biofábrica del país para la producción industrial de insectos benéficos destinada al control de la plaga mosca doméstica. Se

especializó en tecnologías para el tratamiento de residuos y efluentes orgánicos mediante el compostaje, la lombricultura y la digestión anaeróbica. Participó en el armado de 8 plantas de tratamiento de residuos sólidos municipales y dirigió la primera planta piloto de digestión anaeróbica en el INTA para el tratamiento de los residuos orgánicos domésticos generados dentro del predio. Crea en el año 2004 el Laboratorio de Transformación de los Residuos (LTR) y es jefa de grupo. Desde sus inicios ha dirigido 10 proyectos nacionales y 6 internacionales. Dirigió más de 80 convenios, cartas acuerdo y CVT I&D con el sector privado, municipios y empresas. Ha ocupado cargos docentes de grado y posgrado en distintas universidades y ha dictado cursos de grado y posgrado nacionales e internacionales.

Índice

Prólogo _____

1

FACTORES, CONDICIONES OPERATIVAS Y AMBIENTALES DEL ENSAYO POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGÉNICO

Sustrato _____

Caracterización del sustrato _____

Preparación y almacenamiento _____

Concentración del sustrato _____

Resumen _____

Inóculo _____

Naturaleza y caracterización del inóculo _____

Preparación y almacenamiento _____

Concentración del inóculo _____

Resumen _____

Condiciones operativas _____

Agitación y temperatura _____

Blanco y control _____

Cámara de gas _____

Nutrientes _____

pH y alcalinidad _____

Relación entre el sustrato y el inóculo _____

Condiciones anaeróbicas _____

Resumen _____

Condiciones experimentales _____

Métodos de medición del biogás _____

Método manométrico _____

Método volumétrico por desplazamiento _____

Método volumétrico por jeringa _____

Caudalímetro _____

Métodos de medición del metano _____

Resumen _____

Frecuencia de muestreo y duración del ensayo _____

Tipos de métodos para la determinación del PBM _____

Métodos experimentales convencionales _____

Métodos experimentales automáticos _____

Método predictivo por espectrofotometría _____

Métodos teóricos _____

Interpretación de los datos e informe _____

2

MODELO EXPERIMENTAL DEL ENSAYO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGENICO

Preparación y diseño experimental _____

Diseño de reactores _____

Disponibilidad del sustrato y del inóculo _____

Sustrato _____

Inóculo _____

Cálculos previos _____

Procedimiento y seguimiento del ensayo

Procedimiento

Seguimiento del ensayo

Análisis y reporte de los resultados

Registro y análisis de datos. Cálculos

Validación del ensayo e informe de los resultados

Bibliografía

Abreviaturas

Prólogo

A nivel mundial, el ensayo del Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM) resulta ser una herramienta clave para definir la factibilidad técnica de una planta de biogás, ya que permite cuantificar la máxima producción de metano para un determinado residuo de interés. A pesar de su importancia, existe una amplia variabilidad metodológica, que genera incertidumbres y complejiza la comparación e interpretación de los resultados. En este documento se volcó la información actualizada sobre los factores, condiciones operativas y ambientales que influyen y deben ser consideradas durante el desarrollo del ensayo. Considerando estos conceptos y en función a lo reportado por los más prestigiosos investigadores que desarrollan este ensayo, el Laboratorio de Transformación de Residuos (LTR) perteneciente al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA-INTA) generó un diseño propio de reactores anaeróbicos y realizó el ajuste metodológico para este ensayo. Actualmente se registran más de 30 ensayos realizados con diferentes tipos de biomásas, sostenidos con reportes científicos, tesis de maestrías y doctorados, enmarcados en los proyectos INTA (PNNAT 1128042 y PE-I149) y el proyecto internacional H2020-FERTIMANURE (Carta Acuerdo INTA- Fundación ArgenINTA (FA), SA 27617).

Durante los últimos años se incrementaron las plantas de biogás en todo el país, debido principalmente a la implementación del Plan RenovAR (Ministerio de Energía). El crecimiento de esta tecnología generó un incremento en la demanda y el interés para la puesta en valor de esta herramienta clave. Esto impulsó a este equipo de trabajo INTA a generar un documento que contiene las consideraciones y recomendaciones que le servirán al lector como una guía para poder cuantificar el PBM y para que, a futuro, las autoridades regulatorias puedan normalizar y estandarizar esta metodología a nivel nacional.

Ing. Agr. Diana Crespo

Jefa de Grupo del LTR
Coord. P H2020-Fertimanure
(CA INTA-FA 27617)
IMYZA- CICVyA- CNIA- INTA

Factores, condiciones operativas y ambientales del ensayo Potencial Bioquímico Metanogénico

El potencial de producción de metano es comúnmente evaluado mediante un ensayo llamado Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM) o en inglés como *Biochemical Methane Potential* (BMP). El PBM permite determinar la máxima cantidad de metano producido por gramo de biomasa y la cinética de producción, bajo condiciones controladas de laboratorio, en reactores en *batch* (Lesteur et al., 2010). El PBM se calcula como la máxima cantidad de metano acumulada en el período ensayado, dividida por la cantidad de masa de sustrato agregada, expresado comúnmente como mL de CH₄/gDQO o gSV.

A partir de este mismo ensayo se puede determinar también la biodegradabilidad, que es una medida de la fracción de la materia orgánica que puede transformarse en biogás en un proceso de digestión anaeróbica. Se puede estimar como la fracción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de la muestra que es metanizada. También se puede expresar la biodegradabilidad como la fracción de los sólidos volátiles (SV) de la muestra que es gasificada (Labatut et al., 2011). Ambas expresiones adquieren valores distintos, por lo que es imprescindible clarificar en cada caso si la biodegradabilidad está expresada en términos de DQO o en términos de SV. Cada expresión de biodegradabilidad tiene una utilidad distinta en el diseño y operación de las plantas de digestión anaeróbica.

Este tipo de ensayo se lleva a cabo como factibilidad técnica y económica *a priori* de la implementación de plantas de biogás, permitiendo estimar el balance energético, condiciones operativas, el tamaño de los reactores y otros equipamientos (Holliger et al., 2016). Dentro de sus múltiples aplicaciones, el ensayo de PBM comúnmente se utiliza para: a- determinar la biodegradabilidad anaeróbica y la máxima producción de metano (o potencial energético) de residuos orgánicos; b- evaluar el efecto de la codigestión de diferentes sustratos y definir la relación óptima entre el sustrato y el cosustrato; c- determinar la cinética de degradación, que mediante el uso de diferentes modelos matemáticos, permite predecir el funcionamiento de digestores a escala real; d- determinar variables de diseño y parámetros operativos para el escalamiento (*scaling up*); e- Evaluar sustancias inhibitorias del proceso anaeróbico (Tabatabaei & Ghanavati, 2018).

El ensayo consiste en incubar una pequeña cantidad de residuo (sustrato) con un inóculo anaeróbico y medir el volumen de biogás y metano generado en el tiempo. La primera propuesta metodológica fue desarrollada por Owen et al. (1979) y desde entonces fue una metodología ampliamente utilizada, incrementándose su aplicabilidad con los años. En la actualidad existe un gran número de trabajos en la comunidad científica que han desarrollado y adoptado este ensayo para determinar el potencial metanogénico de diferentes sustratos. A pesar de que una gran masa de datos ha sido generada, la comparación entre los datos de biodegradabilidad y rendimientos reportados resulta difícil. Esto es debido a la gran variabilidad de equipamiento y a los diferentes protocolos y condiciones ambientales que son utilizados. Existen protocolos estandarizados de ensayos de biodegradabilidad anaeróbica para compuestos químicos, plásticos y sustratos orgánicos complejos como los son los residuos sólidos (normas ISO 15985 (2004), ASTM D 5511 (1994), VDI 4630 (2016), DIN 38414 TL8 (1985), entre otros), que difieren todos ellos, principalmente, en el diseño experimental. La relación entre el sustrato y el inóculo (S/I), concentración y tipo de inóculo, volumen de espacio de cabeza (*headspace*), nutrientes, sistema de detección del metano, varían entre los diferentes ensayos (Angelidaki et al., 2009; Holliger et al., 2016).

En consideración, se presenta una revisión sobre los factores y condiciones que afectan al desarrollo de este ensayo y que deben ser considerados para protocolizar la metodología.

Sustrato

Caracterización del sustrato

El tratamiento biológico de residuos sólidos orgánicos es altamente complejo. La productividad metanogénica depende de la naturaleza del residuo, donde carbohidratos, proteínas y grasas tienen diferente potencial metanogénico (Tabatabaei & Ghanavati, 2018). Otra característica importante es el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa, debido a que estos compuestos son de baja biodegradabilidad anaeróbica y por lo tanto tienen menor aporte al potencial metanogénico del residuo.

Los complejos compuestos orgánicos mencionados, se encuentran acompañados en los residuos por cantidades variables de agua. El porcentaje en peso de agua en el residuo fresco, habitualmente referida como humedad del residuo, es una variable determinante del rendimiento de metano por metro cúbico o por tonelada de residuo.

Existen diferentes tipos de biomásas que pueden ser usadas como materia prima para la producción de biogás: residuos industriales (efluentes de la industria papelera, frigoríficos y mataderos), residuos agrícolas y forestales (marlo, cachaza), residuos urbanos (lodos cloacales, aguas residuales y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU)) y residuos ganaderos (estiércoles, purines, camas). Estas diversas biomásas tienen potencialidades energéticas y difieren significativamente en sus caracte-

terísticas, las cuales influirán en el proceso degradativo anaeróbico y, consecuentemente, en la producción y rendimiento de biogás y metano. Incluso se encuentran diferencias significativas entre distintos lotes de residuos del mismo tipo, pero con distintas condiciones de generación.

El estiércol animal es una de las materias primas más utilizadas para la digestión anaeróbica. Las producciones ganaderas intensivas generan grandes cantidades de estiércoles, los cuales son sustratos que pueden ser tratados por la digestión anaeróbica. El guano generado por las aves es una mezcla del estiércol sólido con la orina, siendo ambas deyecciones liberadas por el mismo conducto del animal. En los mamíferos (vaca, caballo, oveja y cerdo), el estiércol sale del tracto digestivo al exterior, mientras que la orina, sale por las vías urinarias. El purín es la mezcla de estiércol y orina, donde estas deyecciones caen en fosas comunes de recolección. La composición química, física y microbiológica varía marcadamente en función de la especie (mono o poligástricos) y la dieta consumida por el animal (Jingura & Kamusoko, 2017). El estiércol puede ser rico en fibras, lignocelulosa, polisacáridos, proteínas y otros biomateriales.

En la **Tabla 1** se muestra una comparación porcentual del contenido de proteínas, fibras y lignocelulosas en distintos estiércoles animales y en sus diferentes sistemas y etapas de producción.

Tabla 1

| Composición de proteínas, fibras y lignocelulosa en estiércoles de animales (% en peso seco) | | | | | |
|---|-----------------|--------------------|---------------------|-----------------|----------------|
| | Proteína | Fibra total | Hemicelulosa | Celulosa | Lignina |
| Estiércol vacuno | | | | | |
| Tambo | 18.1 | 52.6 | 12.2 | 27.4 | 13.0 |
| De carne | 12.1 | 51.5 | 17.4 | 21.9 | 12.2 |
| Feedlot | 17.0 | 41.7 | 21.4 | 14.2 | 6.1 |
| Estiércol de cerdo | | | | | |
| Maternidad | 25.1 | 39.2 | 21.9 | 13.2 | 4.1 |
| Recría | 22.7 | 40.8 | 20.5 | 13.9 | 6.4 |
| Terminación | 22.0 | 39.1 | 20.4 | 13.3 | 5.4 |
| Estiércol avícola | | | | | |
| Iniciación | 39.8 | 31.7 | 18.3 | 8.5 | 4.9 |
| Recría | 48.4 | 36.4 | 21.5 | 7.7 | 7.2 |
| Postura (17-40 semanas) | 31.6 | 34.5 | 20.2 | 12.0 | 2.3 |
| Post-muda (desplumaje) | 28 | 31.2 | 16.4 | 10.7 | 4.1 |

Fuente: Jingura & Kamusoko (2017).

Como puede observarse las concentraciones de estos compuestos pueden variar, dependiendo principalmente, de la especie animal, el manejo y el sistema de producción en sus diferentes etapas. La composición del estiércol afecta de forma directa a la producción de biogás y metano debido a la variabilidad que puede existir en cuanto a la composición de compuestos de mayor o menor degradación biológica.

Otra materia prima ampliamente utilizada para la digestión anaeróbica es la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU). La FORSU representa en promedio un 54 % del total en América Latina, donde la fracción predominante son los residuos alimenticios, básicamente restos de comida y residuos de procesamiento de alimentos (frutas, vegetales, huesos, grasas, aceites) (Graziani, 2018; Ye et al., 2015). Debido a su composición, los residuos de alimentos tienen un alto potencial metanogénico (Strong et al., 2016).

Numerosos cultivos han demostrado tener altos potenciales de producción de biogás. Algunos cultivos de cereales, forraje y pasturas perennes, y otros cultivos no alimenticios, muchas veces se utilizan como cosustratos para incrementar el rendimiento de biogás (Braun et al., 2008; Corno et al., 2014; Jingura & Kamusoko, 2017; Navarro-Pineda et al., 2016). Los residuos de varios cultivos (residuos agrícolas) como el algodón, maíz y arroz han mostrado también tener un potencial bioquímico metanogénico y una biodegradabilidad inversamente proporcional a su contenido de lignina. Por ello, puede ser conveniente pretratar los materiales con alto contenido de lignocelulosa para incrementar el rendimiento de la producción de biogás.

Los lodos provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales son otras de las materias primas utilizadas para la generación de energía. Éstos son producidos en grandes cantidades y representan un problema para su manejo y disposición final. Comúnmente, son tratados por digestión anaeróbica debido a su alta biodegradabilidad.

Además de la composición química del sustrato (carbohidratos, proteínas, lípidos, celulosa, hemicelulosa), otras características pueden afectar el potencial rendimiento de biogás y metano, como ser presencia de metales pesados y otras sustancias inhibitorias del proceso. En efecto, la caracterización del sustrato es muy importante porque permite estimar su potencial teórico, ajustar variables operativas del ensayo y prever posibles efectos inhibitorios.

El contenido de la materia orgánica del sustrato puede expresarse técnicamente por los parámetros sólidos volátiles (SV) y demanda química de oxígeno (DQO). En general, cuando la materia prima es líquida o semilíquida se utiliza la DQO y cuando es sólida se utiliza el parámetro SV.

La producción de metano está directamente relacionada con la degradación de los SV (Moody et al., 2009). El rendimiento de metano se incrementa cuanto mayor es el contenido de SV y menor es el contenido de lignina (Gao et al., 2012; Liu et al., 2015).

La DQO es el equivalente de oxígeno, correspondiente a la cantidad de un oxidante químico fuerte, que es demandado para la oxidación del contenido de materia orgánica de una muestra (APHA, 1992). El rendimiento de metano teórico puede ser calculado desde la DQO del sustrato.

La relación entre el carbono y el nitrógeno (C/N) en el sustrato es una variable importante para determinar, ya que puede afectar el desarrollo de las bacterias metanogénicas. El rango óptimo de C/N es entre 20 y 30 (Tabatabaei & Ghanavati, 2018). Una baja relación C/N implica que la materia prima es rica en proteína, resultando en altas concentraciones de amoníaco acuoso, el cual puede causar una inhibición a las metanogénicas. Una alta relación C/N puede resultar en una deficiencia en nitrógeno, el cual puede limitar el crecimiento de la biomasa microbiana y reducir la capacidad *buffer* del sistema, conduciendo al desequilibrio del proceso degradativo anaeróbico y a su colapso.

La disponibilidad de nutrientes y micronutrientes es clave para el desarrollo de la población microbiana y en particular de la población metanogénica (Romero-Güiza et al., 2016). El nitrógeno, fósforo y azufre son los elementos constitutivos más importantes de la biomasa microbiana y por lo tanto deben estar disponibles para su desarrollo. No menos importante, es la disponibilidad de micronutrientes tales como hierro, níquel, molibdeno y cobalto, entre otros, ya que son elementos esenciales para la síntesis de enzimas específicas de la población metanogénica. Generalmente, pero no siempre, los residuos complejos contienen estos micronutrientes en concentraciones suficientes para el desarrollo de los microorganismos.

Las materias primas pueden contener sustancias inhibitorias para la digestión anaeróbica. Los inhibidores principales son el nitrógeno amoniacal (N-NH_3), el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y los metales pesados. El N-NH_3 libre es el principal inhibidor del proceso que afecta a las metanogénicas. El sulfato es usado como aceptor de electrones de las bacterias sulfato reductoras y debido a que la reducción de sulfato es energéticamente más favorable que la producción de metano, las bacterias sulfato reductoras compiten con las metanogénicas por sustratos. Además, el sulfato es convertido a sulfuro de hidrógeno, el cual es tóxico para las metanogénicas (Shayegan et al., 2005). Sustancias tóxicas tales como productos agroquímicos, desinfectantes y antibióticos podrían causar efectos inhibitorios, debido a la presencia de altas concentraciones de metales pesados o compuestos orgánicos (Jingura & Kamusoko, 2017).

Otro análisis que se utiliza para la caracterización de los residuos es la determinación de la composición elemental del residuo: contenido de carbono (C), oxígeno (O), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y azufre (S). Esta información puede ser utilizada para estimar el potencial bioquímico metanogénico teórico (Angelidaki et al., 2011).

Preparación y almacenamiento

La preparación del sustrato debe ser mínima para evitar cualquier tipo de alteración de sus propiedades.

El tamaño del material puede afectar la cinética y la velocidad de producción del biogás, debido a que influye en la superficie del sustrato disponible para la acción de los microorganismos hidrolíticos, responsables de la solubilización del sustrato. Por eso, el tamaño de la muestra es un parámetro muy importante que afecta, principalmente, la velocidad de producción más que la determinación del máximo potencial de biogás.

Si bien esta variable no afecta directamente a la máxima producción de biogás o metano, es importante asegurar un tamaño de partícula pequeño para una mayor homogeneidad del sustrato y una mayor reproducibilidad del ensayo de PBM (Angelidaki et al., 2009). Además, los compuestos complejos con alta masa molecular necesitan ser hidrolizados para una mayor accesibilidad. El ataque enzimático en la etapa hidrolítica se ve favorecido cuanto mayor área superficial tenga la partícula (Lesteur et al., 2010)

Holliger et al. (2016) recomienda que las partículas tengan menos de 10 mm (como diámetro o longitud). Sin embargo, a los efectos del ensayo del PBM el máximo tamaño debe asegurar la representatividad de la muestra, la cual se manifestará en la reproducibilidad de los resultados. Por lo tanto, el tamaño de partícula máximo dependerá en cada caso de la heterogeneidad del residuo y del volumen de la muestra a procesar. Si no es posible lograr una reproducibilidad aceptable con la muestra sin procesar, esta deberá triturarse hasta obtener un tamaño de partícula máxima que garantice la reproducibilidad del muestreo, y por lo tanto resultados reproducibles.

El ensayo debería describir en detalle los pretratamientos o los pasos de preparación de la muestra, como así también el tamaño del sustrato que se utilizará en el ensayo.

El sustrato debería ser utilizado lo más fresco posible. Si no será evaluado dentro de las 24 horas, puede ser almacenado a 4 °C por un tiempo no mayor a 5 días. Se recomienda que se incremente de forma gradual la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiental en la muestra, *a priori* de ser utilizada en el ensayo de PBM (Holliger et al., 2016).

Concentración del sustrato

La concentración del sustrato es uno de los parámetros más importantes para el diseño de un ensayo de PBM. Algunos ensayos de PBM establecen una concentración de sustrato entre el 2 y el 10 % de sólidos totales (ST) en el reactor para asegurar una adecuada transferencia de masa (Raposo et al., 2012; V.D.I., 2006).

Un estudio realizado por Raposo et al. (2006) que evaluó diferentes concentraciones de sustrato (maíz, a 5-15 gSV/L), mostró que el máximo potencial de metano se logró con la concentración de 15 gSV/L. En esa misma línea de investigación, Wang et al. (2015) sugirieron que existe una correlación entre la concentración del sustrato y el potencial de metano en ensayos de PBM. Estos autores observaron que el PBM puede ser subestimado si se usan concentraciones de sustrato bajas, recomendando que, para obtener resultados más precisos, la concentración del sustrato debe mantenerse alta y

evitarse la dilución cuando la concentración es inferior a 10 g VS/L. Bajas concentraciones de sustrato, están asociadas a una baja actividad metabólica de los microorganismos y, consecuentemente, a bajas cantidades de biogás. Por el contrario, altas concentraciones de sustrato pueden conducir a situaciones de sobrecarga, debido a que los compuestos intermedios como los ácidos grasos volátiles (AGV) pueden acumularse y conducir a una inhibición en el proceso (Tanimu et al., 2014).

La mayoría de los ensayos de PBM son llevados a cabo fijando la relación entre el sustrato y el inóculo (S/I), por lo que la cantidad de sustrato a agregar dependerá de esta relación más que de la concentración.

Resumen

En el **Diagrama 1**, se muestra un resumen de todo lo expuesto anteriormente, relacionado al sustrato: sus características, preparación y almacenamiento y sobre su concentración.

Diagrama 1

Resumen sobre la caracterización, la preparación, el almacenamiento y la concentración del sustrato en un ensayo PBM

CARACTERIZACIÓN

- Materia seca o sólidos totales y contenido de humedad
- Sólidos volátiles, contenido de materia orgánica y de carbono
- Demanda Química de Oxígeno (DQO)
- Sustancias orgánicas (lípidos, proteínas, carbohidratos, lignina)
- Análisis elemental: carbono (C), oxígeno (O), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y azufre (S)
- Nutrientes: fósforo magnesio y potasio
- Micronutrientes: hierro, níquel, molibdeno, cobalto, etc.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- Trituración y molienda para alcanzar un tamaño <10mm
- Almacenamiento del sustrato: a 4°C, no superior a 5 días

CANTIDAD O CONCENTRACIÓN

- < 10% de ST dentro del reactor
- Entre 10 y 15 gSV/L
- La cantidad de sustrato a agregar puede depender de la relación sustrato/inóculo

Inóculo

Naturaleza y caracterización del inóculo

La naturaleza del inóculo es una variable que puede afectar la determinación del PBM. Los lodos anaeróbicos de plantas de tratamiento de aguas residuales son los

más recomendados y reportados como fuente de inóculo para este ensayo. También pueden utilizarse los lodos de plantas de tratamiento de residuos agroindustriales y de estiércoles (Angelidaki et al., 2011; Filer et al., 2019; Holliger et al., 2016; Raposo et al., 2012). Sin embargo, se recomienda que el inóculo provenga de una planta de biogás que procesa similares sustratos al residuo a evaluar (V.D.I., 2006). Si el residuo a evaluar es estiércol vacuno, entonces el inóculo deberá proceder de un reactor anaeróbico que trate efluentes o estiércoles vacunos. De Vrieze et al. (2015) mostraron que los lodos granulares maximizan el valor del PBM debido a que presentan mayor abundancia metanogénica y una alta capacidad amortiguadora comparado con otros inóculos. Los más utilizados son los lodos granulares provenientes de plantas de tratamiento de cervecería (Koch et al., 2017).

Una forma de asegurar la actividad de las bacterias metanogénicas en el inóculo es midiendo la actividad metanogénica específica (AME). Se considera una actividad aceptable para un ensayo de PBM, utilizando acetato como sustrato patrón, superior a 0,1 gDQO/gSSV.d para lodos granulares. Si se utilizan lodos de tipo floculento o suspendidos, la actividad puede ser más baja (Angelidaki et al., 2009; Holliger et al., 2016).

Además de conocer su capacidad de producción, el inóculo debe ser caracterizado en términos de biomasa la cual se determina mediante los análisis de SV o sólidos suspendidos volátiles (SSV). La diferencia entre SV y SSV corresponde a los SV disueltos, que pueden ser despreciables si se trata de un inóculo de alta concentración, como habitualmente ocurre. Si no fueran despreciables los SV disueltos, sería más adecuada para la caracterización, la determinación de SSV mediante centrifugación o filtrado.

El valor de SV no representa sólo el contenido de microorganismos, ya que no permite diferenciar entre la biomasa microbiana y el material orgánico particulado en el reactor. En especial, esto es evidente en los lodos provenientes de estiércoles, donde el contenido de SV podría estar representado, en su mayor parte, por residuos lignocelulolíticos recalcitrantes y no por biomasa microbiana activa, mientras que en los lodos granulares, los SV consisten en la biomasa microbiana. Por otro lado, ambas metodologías (SSV o SV) no permiten distinguir entre la biomasa viva o muerta (Angelidaki et al., 2009; Raposo et al., 2012).

Para que un inóculo sea considerado de buena calidad y pueda utilizarse en un ensayo de PBM, se recomienda los siguientes valores de parámetros operacionales (**Tabla 2**).

Además, existen disponibles diferentes metodologías avanzadas que permiten evaluar los consorcios microbianos en los inóculos anaeróbicos: hibridación fluorescente in situ (*FISH*, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (*DGGE*, por sus siglas en inglés), reacción en cadena de polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés), entre las más importantes (Khan et al., 2018).

Tabla 2

| Características recomendadas del inóculo | | |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Parámetro | Unidad | Rango recomendado |
| Actividad (AME) | gDQO/gSSV.d | >0,1 |
| pH | upH | 7-8,5 |
| AGV | gCH ₃ COOH/L | <1 |
| N-NH ₄ | gN-NH ₄ /L | <2,5 |
| Alcalinidad | gCaCO ₃ /L | >1,5 |
| Concentración | gSV/L | 15-20 |

Holliger et al., 2016

Preparación y almacenamiento

El inóculo debe ser utilizado lo antes posible luego del muestreo para evitar alterar sus propiedades. Sin embargo, algunos inóculos pueden requerir una preparación previa, como ser tamizado, dilución o preincubación. El tamizado por malla de 1-5 mm se recomienda cuando existen ciertos materiales más gruesos e inertes. La dilución del inóculo sólo deberá realizarse cuando el contenido de SV es muy alto, superior a 100 g/L.

La preincubación permite “desgasificar” el inóculo, eliminando la materia orgánica biodegradable residual que pudiera existir (Angelidaki et al., 2009). Se recomienda que la preincubación del inóculo se realice a la misma temperatura del ensayo de PBM por un período no mayor a 4 días, debido a que un tiempo mayor de preincubación puede afectar la tasa inicial de producción de metano y desestimar el valor del PBM, principalmente cuando las relaciones S/I de trabajo son bajas (Elbeshbishy et al., 2012; Koch et al., 2019).

Elbeshbishy et al. (2012) estudió el efecto de la preincubación, utilizando inóculos preincubados y no incubados. La preincubación de inóculos hasta que la tasa diaria es inferior al 1 % de metano acumulado, produce la estabilización completa del inóculo, reduciéndose significativamente las concentraciones de la biomasa activa (patogénica y no patogénica). En este caso, cuando se adiciona el sustrato soluble y particulado al estudio de PBM, las tasas de biodegradación al inicio del ensayo serán muy diferentes entre un inóculo preincubado y uno sin incubación. Esto se debe a que durante la preincubación los microorganismos que degradan los sustratos solubles (principalmente las acetogénicas y metanogénicas) proliferarán, mientras que los otros grupos que hidrolizan y absorben sustratos particulados se descomponen, afectando el equilibrio del consorcio microbiano. Sin embargo, cuando se realiza la adición de sustratos particulados y solubles en los lodos no incubados, todos los grupos de microorganismos funcionan simultáneamente como un digestor, aprovechando las sinergias entre los distintos grupos microbianos para mantener el consorcio en equilibrio. Elbeshbishy y colaboradores concluyen que la

preincubación no presenta ventajas frente a correr un blanco (inóculo solamente) en el ensayo. Por otro lado, la preincubación del inóculo puede incrementar las concentraciones de amonio entre un 30-40 % más que el inoculo sin incubación previa.

El tiempo y temperatura de almacenamiento del inóculo también puede afectar los resultados del ensayo PBM. Koch et al. (2019) evaluaron un inóculo fresco (dentro de la hora de recolección) y el mismo inóculo almacenado durante 2 semanas a 4 °C y a 38 °C (temperatura de trabajo del ensayo de PBM). Los resultados mostraron que las condiciones de almacenamiento tuvieron un impacto menor sobre las curvas del PBM del sustrato. Sin embargo, sugirieron que mayores temperaturas y tiempos de almacenamiento podrían tener un comportamiento diferente. Li et al. (2014) también estudiaron el efecto del almacenamiento en el inóculo, utilizando diferentes sustratos. Sus resultados demostraron que el inóculo fresco tuvo el mayor rendimiento de metano (498,3 mL/gSV) y biodegradabilidad (87,7 %) con residuos de comida, comparado con el inóculo almacenado a 2 meses (425 mL/gSV y 74,8 %) y 4 meses (394,6 mL/gSV y 69,4 %) a temperatura ambiente. Hagen et al. (2015) almacenaron el inóculo a 20 °C por 11 meses y encontraron una pérdida significativa de la performance con la celulosa.

Astals et al. (2020) estudiaron el impacto del efecto de la temperatura y tiempos de almacenamiento en la actividad metanogénica específica (AME) del inóculo. Se demostró que la actividad puede disminuir con el tiempo independientemente de las condiciones de almacenaje (temperatura, humedad, etc.). Sin embargo, la velocidad con la cual la actividad decreció fue dependiente de la temperatura, siendo más baja a temperaturas menores (4 °C). Los inóculos almacenados a 4 °C y a temperatura ambiente (22 °C) mantuvieron la actividad metanogénica cercana a la de un inóculo fresco por un lapso de hasta 14 días de almacenaje, mientras que el inóculo almacenado a 37 °C mostró un significativo decaimiento en la actividad luego de los 7 días de almacenamiento.

Con estos antecedentes científicos, se recomienda almacenar el inóculo a la misma temperatura que se realizará el ensayo o a temperatura ambiente (20-25 °C) por períodos cortos, preferentemente no superiores a 5 días (Holliger et al., 2016). Por otro lado, el inóculo podría conservarse a temperaturas bajas (4 °C) también por períodos cortos, no superiores a 14 días para evitar una disminución de su actividad metanogénica.

En el **Diagrama 2**, se muestra un resumen de las diferentes recomendaciones y opciones para el preparación y almacenamiento del inóculo.

La segunda opción sería la más recomendable, cuando se sospecha que el inóculo puede contener materia orgánica residual. Las recomendaciones sobre el período de almacenamiento a 20-25 °C o a la misma temperatura del ensayo pueden ser variables entre los diferentes autores.

La incubación previa del inóculo con el sustrato conduce a la inducción de vías metabólicas para la degradación, a un incremento de la afinidad por el sustrato y a un incremento en la cantidad de microorganismos degradadores específicos de ese sustrato.

Diagrama 2

Opciones de acondicionamiento y almacenamiento del inóculo, ordenadas en orden de preferencias



Si bien la idea de adaptación/aclimatación es extensamente aceptada en la comunidad científica, existen pocos antecedentes en el uso de inóculos adaptados, utilizándose comúnmente inóculos no adaptados en el ensayo de PBM (Raposo et al., 2011). Un estudio realizado por Bres P.A. (2019), comparó el rendimiento de metano en un ensayo de PBM, utilizando un inóculo adaptado al sustrato guano (AME= 0,05 gDQO/gSSV.d) y otro inóculo del tipo granular, sin adaptación al sustrato y con mayor actividad (AME= 0,13 gDQO/gSSV.d). Los resultados mostraron que el inóculo granular obtuvo un mayor rendimiento de biogás y metano comparado con el inóculo adaptado al sustrato. Para un ensayo de PBM, donde se optimizan las condiciones, es recomendable utilizar lodos con alta actividad y del tipo granular.

Concentración del inóculo

La naturaleza (origen) y la concentración del inóculo son los factores que más difieren en la protocolización de los ensayos de PBM. Normalmente, cuanto mayor sea la concentración del inóculo, mayor será la conversión anaeróbica del sustrato y más rápido finalizará el ensayo de PBM, ya que afecta la tasa de biodegradación (Raposo et al., 2011).

Existen diversas concentraciones de inóculo e incluso diferentes formas de expresión reportadas. Puede encontrarse como porcentaje de volumen con rango desde 10 a 80 %. Sin embargo, la forma de expresión más significativa es como SV o SSV, ya que representa el contenido de biomasa en el lodo. Se reportan rangos entre 1 a 37 gSV/L (Raposo et al., 2011; Cárdenas Cleves et al., 2016), entre 15 a 20 gSV/L (V.D.I., 2006) y entre 2 a 8 gSSV/L (Rozzi & Remigi, 2004).

La relación S/I es uno de los parámetros más importantes en el ensayo de PBM. A pesar de ello, muchos investigadores no reportan este valor en el diseño experimental. Esta variable puede encontrarse expresada de diferentes formas como: gSV/gSV, gSV/gSSV o gSV/gDQO; incluso esta relación puede utilizarse en el orden inverso como inóculo/sustrato (I/S).

Resumen

En el **Diagrama 3**, se muestra un resumen de todo lo expuesto anteriormente, relacionado al inóculo: su caracterización, preparación, almacenamiento y concentración.

Diagrama 3

Resumen sobre la caracterización, la preparación, almacenamiento y la concentración del inóculo en un ensayo PBM

CARACTERIZACIÓN

- Materia seca o sólidos totales
- Sólidos volátiles, contenido de materia orgánica y de carbono
- Sólidos suspendidos volátiles
- Actividad Metanogénica Específica (AME)
- Criterios de calidad del inóculo: pH, AGV, alcalinidad y $N-NH_4$ (Tabla 2)

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- Tamizado y dilución en caso de ser necesario
- Preincubación < a 4 días
- Inóculo sin almacenamiento preferentemente, lo más fresco posible (ver diagrama 2)

CANTIDAD O CONCENTRACIÓN

- Se reportan diferentes concentraciones (2-8 gSSV/L o 1-37 gSV/L)
- Tener en cuenta la relación sustrato/inóculo

Condiciones operativas

Agitación y temperatura

La agitación del medio facilita el contacto entre los microorganismos y el sustrato, previniendo la acumulación de metabolitos intermedios (como lo son los AGV) y garantizando las condiciones de homogeneidad en el sistema. La agitación puede realizarse en forma continua o intermitente, según el tipo de sistema de agitación: mediante el movimiento del reactor (manual, orbital o axial) o mediante el movimiento de un agitador interno. En este último caso, la agitación puede ser unidireccional o bidireccional (por ejemplo, equipo automático para el ensayo de PBM modelo AMPTS).

Souto et al. (2010) estudiaron la influencia del tipo de agitación y demostraron que la agitación manual intermitente tuvo similares rendimientos en un ensayo de AME, comparado con la agitación orbital continua y que, la agitación axial debería ser evitada cuando se utilizan volúmenes pequeños de frascos, para evitar la ruptura de los agregados microbianos (flóculos).

Un estudio realizado recientemente (Wang et al., 2017) demostró que el tipo y velocidad de mezclado óptimo puede depender del tipo de muestra y la viscosidad generada en el líquido del digestor. Para muestras con mayor viscosidad (lodos de aguas residuales), la agitación continua unidireccional y bidireccional a 160 rpm, permitió la mayor producción de metano. Sin embargo, la remoción de la materia orgánica no fue afectada, por lo que la agitación podría estar relacionada a la liberación de burbujas de gases atrapadas en el líquido. Para las muestras que no presentan una alta viscosidad (cuando el contenido del digestor está lo bastante diluido o el sustrato es fácilmente degradado), el mezclado con agitación manual, una vez al día, podría ser suficiente para el ensayo de PBM.

Cuando la intensidad de mezclado es baja, puede verse limitada la transferencia de masa, mientras que, cuando ésta es alta, los agregados microbianos pueden romperse. En ambas situaciones, puede reflejarse una disminución del valor de la producción de metano en el ensayo de PBM. Antecedentes científicos mostraron que las velocidades de 360 rpm, 400 rpm y 700 rpm provocaron una disminución en la producción de metano (Cho et al., 2005; Souto et al., 2010). La intensidad de mezclado más utilizada y reportada varía entre 150 y 200 rpm.

Con respecto a la temperatura, esta variable influye en la tasa de crecimiento, el metabolismo y la dinámica poblacional de los microorganismos dentro del reactor anaeróbico. Además, afecta factores tales como la tasa de transferencia del gas y las características de sedimentación de los lodos biológicos (Filer et al., 2019).

El ensayo de PBM se realiza a 30-35 °C, debido a que las condiciones mesófilas son favorables para el desarrollo de los microorganismos metanogénicos. Las temperaturas termófilas (45-60 °C) en este tipo de ensayos son poco usuales, ya que la operación en este rango de temperatura implica mayores requerimientos energéticos y mayor sensibilidad a las sustancias tóxicas como el amonio y los ácidos grasos de cadena larga (Fernández Rodríguez et al., 2012; Raposo et al., 2011). Es conveniente que la temperatura utilizada durante el ensayo sea la misma que la temperatura de origen del inóculo. Por otro lado, la temperatura de incubación debería estar bajo condiciones ambientales controladas, con variaciones máximas de ± 2 °C (Holliger et al., 2016).

Blanco y control

Deberá incluirse un blanco y un control en el ensayo de PBM. El blanco consiste en incubar el inóculo sin el agregado de sustrato y el control consiste en incubar el inóculo con un sustrato estándar, el cual se conoce su rendimiento teórico. Tanto el control

como el blanco son expuestos bajo las mismas condiciones ambientales y operativas que se desarrollará el ensayo.

El blanco se utiliza para considerar la materia orgánica residual que puede contener el inóculo, por lo que la producción de metano generada por el inóculo al final del ensayo debe ser restada de la producción de metano generada por el sustrato (Angelidaki et al., 2009; Filer et al., 2019).

Cuando la producción total de metano del blanco contribuye más del 20 % de la producción total de metano del sustrato de análisis, se recomienda realizar la preincubación del inóculo y repetir el ensayo (Holliger et al., 2016).

El control evalúa la precisión del ensayo de PBM y permite validar el procedimiento de medición del gas. La celulosa y la gelatina son los sustratos estándares más utilizados como control. La celulosa es recomendada para los residuos agrícolas, agroindustriales, agropecuarios y municipales, mientras que, la gelatina es recomendada para residuos cárnicos, pescados y otros residuos similares (Angelidaki et al., 2009). Cuando la celulosa es digerida debe producir un mínimo del 80 % del máximo rendimiento teórico de metano (V.D.I. 4630; 2006). Según Holliger et al. (2016), el rendimiento de metano experimental del control debe estar comprendido entre el 85 % y el 100 % del valor teórico (celulosa: 352 - 414 LCH₄/kgSV, en condiciones estándares 0 °C y 1 atm). Si bien los controles son necesarios porque verifican la precisión de la metodología, es poco usual su reporte en los trabajos científicos (Raposo et al., 2012). En la **Tabla 3** se muestran los rendimientos de los sustratos estándares más utilizados como control y sus respectivos rendimientos teóricos de metano.

Tabla 3

| Rendimiento teórico de metano para los diferentes sustratos | | |
|--|-----------------------------------|--|
| Sustrato control | RTM (mLCH₄/gSV) | Sustrato de análisis |
| Celulosa | 414 | Residuos agrícolas, agroindustriales y municipales |
| Gelatina | 433 | Residuos cárnicos, pescados |

Referencia. RTM: rendimiento teórico de metano

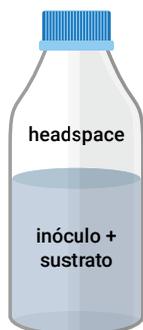
Generalmente, para el control se utiliza la misma relación S/I que aquella para la muestra de interés. El interlaboratorio coordinado por Raposo et al. (2011) mostró que, tomando los 13 de 16 laboratorios participantes, el promedio del rendimiento de metano para la celulosa fue de 350 LCH₄/kgSV, con una alta precisión y un 85 % de rendimiento de metano con respecto al teórico (relación entre el valor experimental y el teórico).

Cámara de gas

El volumen de la cámara de gas o espacio de cabeza (*headspace*) puede afectar el rendimiento de biogás y metano en un ensayo de PBM (**Figura 1**).

Figura 1

Volumen de cámara de gas o espacio de cabeza (*headspace*)



Reactor

Cuando se utiliza el método manométrico, el *headspace* influirá en la presión generada por el gas, en la duración del ensayo y en la frecuencia de muestreo del gas. Se reportan diferentes proporciones de *headspace*, respecto al volumen total del reactor, siendo entre el 20 % y el 60 %, los volúmenes del *headspace* más utilizados. Si bien esta variable es de gran importancia para el ensayo de PBM, muchos autores no la reportan en su diseño experimental (Raposo et al., 2012).

Algunos trabajos han estudiado la influencia de la sobrepresión en el *headspace* sobre el rendimiento de biogás y metano. La presión generada por el gas dependerá de diversas variables como ser el volumen del *headspace*, frecuencia de medi-

ción, frecuencia de liberación del gas acumulado y tamaño de la botella de incubación, entre otras. Himanshu et al. (2017) evaluaron la influencia en la frecuencia de medición y liberación de la presión (diaria, cada tres días, semanalmente y luego de los 35 días de incubación) en diferentes volúmenes de *headspace* (50 mL (42 %), 90 mL (56 %) and 180 mL (72 %)). Se evidenció un impacto negativo en el rendimiento de biogás, debido a la sobrepresión en el *headspace*, atribuyéndole este fenómeno a la solubilización en el medio del CO₂, al incrementarse la presión en el *headspace*. De acuerdo con la ley de Henry, cuando la presión parcial del CO₂ se incrementa en el *headspace*, se produce una mayor disolución de ese gas en el medio líquido, conduciendo a una disminución de la presión en el momento de su determinación. Asimismo, un incremento de la concentración de CO₂ en el medio líquido, conlleva a una reducción del pH, provocando una perturbación en la actividad de algunos microorganismos. Por otro lado, un incremento del volumen del *headspace* puede conducir a un incremento del rendimiento de metano. Similares resultados fueron encontrados Yilmaz (2015) quien evaluó el efecto de la presión para diferentes *headspace* (80 %, 60 %, 40 % y 20 %) sobre la producción de biogás en un ensayo de PBM con glucosa como sustrato. Este trabajo mostró que la producción de biogás se ve favorecida cuanto menor es la presión en el *headspace* (mayor volumen del *headspace*).

Nutrientes

La operación de plantas de biogás requiere de concentraciones balanceadas de C:N:P:S (~ 600:15:5:1), de macronutrientes como potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg) y calcio (Ca), de micronutrientes como hierro (Fe), manganeso (Mn), selenio (Se), aluminio (Al), níquel (Ni), cobalto (Co), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y Zinc (Zn) y de

complejos vitamínicos (biotina, ácido fólico, riboflavina, tiamina, nicotinida) para favorecer el crecimiento y desarrollo de los microorganismos (Filer et al., 2019).

En un ensayo de PBM, la falta de estos nutrientes puede causar efectos inhibitorios (Angelidaki et al., 2009). Las soluciones de nutrientes más utilizadas son descritas por Rozzi y Remigi (2004), Owen et al. (1979) y Angelidaki et al. (2009).

Además de los nutrientes, se requiere el agregado de soluciones amortiguadoras (*buffers*) como los carbonatos y fosfatos y un agente reductor, como lo es el sulfuro de sodio. También puede incluirse en el medio nutritivo la resazurina que es un agente indicador de óxido-reducción. En algunos casos, por ejemplo, cuando se utilizan como inóculo los lodos de aguas residuales, el suministro de nutrientes podría evitarse, debido a que intrínsecamente estos lodos son ricos en dichos elementos (Aquino et al., 2007; Filer et al., 2019).

pH y alcalinidad

Para el ensayo de PBM el pH debe estar cercano a la neutralidad, a fin de garantizar la actividad metabólica de los microorganismos anaeróbicos. Un pH bajo puede conducir a una acumulación de los AGV y un pH alto a concentraciones altas de nitrógeno amoniacal libre. En ambos casos, el proceso de degradación se ve afectado debido a la inhibición de las bacterias metanogénicas. Por eso, antes del inicio del ensayo, la mezcla deberá ser ajustada hasta pH neutro mediante el agregado de soluciones alcalinas o acidificantes, dependiendo el caso. Para que el sistema tenga la suficiente capacidad *buffer* y garantizar la neutralización de los AGV, el inóculo debe contener al menos 1,5 g CaCO_3/L , y así asegurar las condiciones óptimas de desarrollo de las bacterias y del proceso degradativo (Angelidaki et al., 2009; Holliger et al., 2016).

Relación entre el sustrato y el inóculo

La mineralización de un residuo sólido a través del proceso de digestión anaeróbica requiere de la acción coordinada de diferentes grupos de bacterias, como así también de prevenir la acumulación de metabolitos intermediarios y productos que son potencialmente inhibidores del proceso (AGV y N-NH_3). En efecto, el balance entre los microorganismos y el sustrato asegura la eficiente biodegradabilidad anaeróbica. Si la carga de sustrato es demasiado baja, los microorganismos exhibirán una baja actividad metabólica y, consecuentemente, se reflejará baja producción de biogás. Si la carga de sustrato es demasiado alta, la medición del biogás será más confiable pero puede resultar en una inhibición de la producción de biogás por acumulación de potenciales inhibidores (Angelidaki and Sanders, 2004; Raposo et al., 2011). Por eso, uno de los parámetros claves es encontrar la mejor relación entre el sustrato y el inóculo que mantenga el equilibrio en el sistema.

En teoría, el rendimiento de metano no debería ser afectado por esta relación, ya que solo influye en la cinética del proceso (Lesteur et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que esta relación puede afectar, tanto la tasa como el grado de la degradación anaeróbica (Holliger et al., 2016; Raposo et al., 2011).

Comúnmente, se utilizan las relaciones S/I entre 0,25 y 1 (como gSV/gSV), recomendándose una mayor cantidad de inóculo que de sustrato para minimizar los posibles problemas de inhibición o acidificación en el sistema (Holliger et al., 2016). Esta relación no debería estandarizarse, ya que depende del tipo de sustrato y de las características del inóculo. Deberá evaluarse cada caso en particular, dado que cada combinación sustrato-inóculo tiene una relación óptima, considerando su potencial producción de los AGV y su capacidad de amortiguamiento (Elbeshbishy et al., 2012; Lesteur et al., 2010). Para sustratos desconocidos o que se sospecha una inhibición del proceso, se recomienda utilizar relaciones S/I bajas, entre 0,25 a 0,35 (Holliger et al., 2016).

Condiciones anaeróbicas

El volumen del *headspace* es burbujeado para desplazar el aire presente y asegurar las condiciones anaeróbicas antes de cerrar el reactor (Cárdenas Cleves et al., 2016), aunque no hay consenso sobre el flujo de gases y la duración de este procedimiento. Los gases más utilizados para hacer este barrido son el nitrógeno molecular (N_2), el dióxido de carbono (CO_2), Helio (He) y sus combinaciones como ser $N_2:CO_2$ (70:30 % o 80:20 % v/v). Koch et al. (2015) encontraron que el barrido del *headspace* con la mezcla de gas (80 % de N_2 y 20 % de CO_2) produce un incremento del 20 % en la producción de metano comparado con el barrido con N_2 puro. Sin embargo, se requieren mayores estudios para determinar el efecto del CO_2 en la mezcla del gas sobre la formación del metano en el ensayo de PBM.

Para asegurar las condiciones anaeróbicas durante todo el período del ensayo se recomienda realizar una prueba de estanqueidad. Un método sencillo pero eficaz es generar una sobrepresión en el *headspace* y luego sumergir el reactor en un recipiente con agua. Si el reactor tiene fugas se observarán burbujas de gas en el agua. Si el reactor no tiene fugas, significa que superó la prueba de estanqueidad y podrá utilizarse para el ensayo.

Resumen

En el **Diagrama 4**, se muestra un resumen de todo lo expuesto anteriormente, relacionado a las condiciones operativas del ensayo PBM.

Diagrama 4

Resumen sobre los parámetros y factores operativos que pueden influir en el ensayo de PBM

AGITACIÓN Y TEMPERATURA

- Puede ser manual, orbital o axial; intermitente o continua
- Velocidad de agitación recomendada <160 rpm, aunque dependerá del tipo de sustrato
- Temperatura: mesofílica preferentemente

BLANCO Y CONTROL

- Blanco: inóculo sin el agregado de sustrato
- Control: celulosa y/o gelatina. El PBM debe estar entre el 80-100 % del PBM teórico

HEADSPACE

- Dependerá del sistema de medición, pero entre 20-60 % del volumen total es lo más utilizado

NUTRIENTES

- Recomendado para asegurar el crecimiento y el desarrollo de los microorganismos. Existen varios formulados de nutrientes

PH Y ALCALINIDAD

- Ajustar a pH 7, antes de iniciar el ensayo
- Alcalinidad > 1,5 g CaCO₃/L, sino agregar

RELACIÓN SUSTRATO/INÓCULO (S/I)

- S/I entre 0,25 y 1 (recomendadas). Sin embargo, si se sospecha presencia de inhibidores incluir al menos dos relaciones S/I más bajas
- Dependerá de cada sustrato e inóculo a utilizar. Se recomienda probar al menos 2 relaciones de S/I

CONDICIONES ANAERÓBICAS

- Pasar una corriente de gas (N₂; He, N₂:CO₂) para desplazar el aire en el *headspace*
- Realizar una prueba de estanqueidad

Condiciones experimentales

Métodos de medición del biogás

El ensayo de PBM es llevado a cabo en reactores que aseguren la hermeticidad del sistema durante todo el período del ensayo. La bibliografía reporta diferentes metodologías e instrumentos que permiten cuantificar el volumen de metano y biogás generado para el desarrollo de este ensayo. En general, según la forma de medición, pueden clasifi-

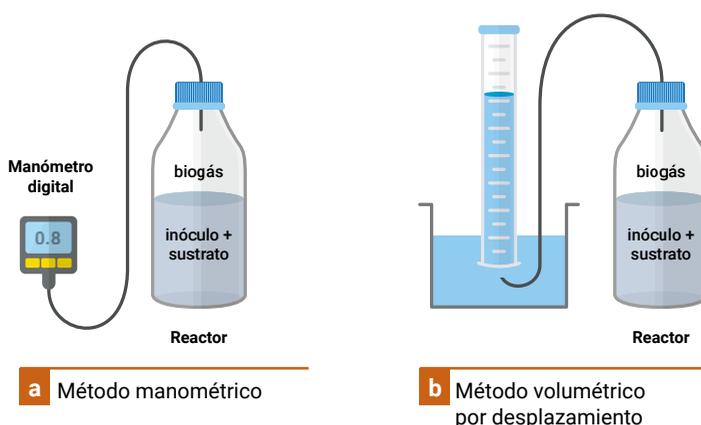
carse en método manométrico, por jeringa o por desplazamiento del líquido. La elección del método define el diseño del sistema de reactor a utilizar.

Método manométrico

Se basa en la medición de la presión ejercida por el volumen de biogás acumulado en el *headspace* del reactor. La medición de la presión se realiza acoplando un sensor (membrana transductora de presión), el cual detecta la presión ejercida y la traduce en unidades de presión (bar, atm). Esto se realiza con un equipo medidor de presión llamado transductor o manómetro. El volumen de biogás generado es calculado a través de la sobrepresión medida por el transductor, utilizando la ley de gases ideales donde el volumen en el *headspace* y la temperatura son constantes y conocidos (**Figura 2 a**). Una vez medida la presión se recomienda ventear y liberar el gas acumulado para reducir la presión hasta alcanzar la presión atmosférica dentro del reactor. Luego, el sistema queda listo para una próxima medición de biogás. Según Holliger et al. (2016) la presión en el *headspace* no debe ser superior a 3 bares para evitar elevadas concentraciones de CO₂ disuelto y la ruptura del reactor. Se debe evitar sobrepresiones altas, ya que afecta a la disolución del CO₂ y el pH en el medio, así como también el crecimiento bacteriano (Himanshu et al., 2017; Yilmaz, 2015).

Figura 2

Sistemas de medición de biogás (manométrico y por desplazamiento) basados en el protocolo VDI 4630 (2006)



Existen pocos estudios que evalúen el efecto de la sobrepresión en los microorganismos anaeróbicos o en el proceso degradativo. Valero et al. (2016) estudiaron el efecto de la acumulación de la presión en el *headspace* y encontraron que cuando las presiones fueron superiores a 0,6 bares la producción de metano fue afectada para el sustrato de residuos de café molido; pero cuando las presiones estuvieron entre 0,6 y 1 bar no se observaron

estos efectos para los sustratos de estiércol de tambo y el residuo de cáscara de cacao. El efecto de la sobrepresión puede depender del tipo de sustrato en un ensayo de PBM.

Método volumétrico por desplazamiento

El biogás producido puede desplazar una solución contenida en un sistema colector externo al reactor. Se llena el colector con una solución barredora y se invierte en un recipiente reservorio. El biogás pasa a través de la solución y el volumen desplazado es igual al volumen de biogás generado. La solución barredora puede ser agua de red, aceite, agua acidificada y agua carbonatada (**Figura 2 b**). La desventaja que presenta este método es la posible disolución del CO_2 en la solución barredora, conduciendo a una subestimación del biogás generado (Filer et al., 2019). La solubilidad del CO_2 en agua a 25°C es 25 veces más alta comparada con el CH_4 bajo las mismas condiciones de pH y presión (Strömberg et al., 2014). Su solubilidad puede reducirse decreciendo el pH o incrementando la salinidad en la solución barredora (Strömberg et al., 2014; Zaman, 2010). Por otro lado, además de ajustar el volumen de biogás generado en condiciones estándares de presión y temperatura, es necesario considerar el contenido de vapor de agua y corregir por la presión hidrostática sobre el gas, cuando se utiliza este método (Filer et al., 2019; Strömberg et al., 2014). Esta técnica es sencilla y de bajo costo para su implementación en el laboratorio, pero presenta como desventaja la posibilidad de tener fugas del biogás mediante el sistema de conexión y medición (agujas, mangueras). Debe considerarse el uso de jeringas esmeriladas y mangueras impermeables para gases, a fin de asegurar la hermeticidad del sistema y las condiciones anaeróbicas (Aquino et al., 2007).

Figura 3

Método volumétrico de medición de biogás por jeringa



Método volumétrico por jeringa

Consiste en conectar una jeringa invertida en la tapa del reactor (**Figura 3**). La presión generada en la *headspace* desplazará el émbolo de la jeringa, equilibrando la presión interna del reactor hasta alcanzar la presión atmosférica (Zaman, 2010).

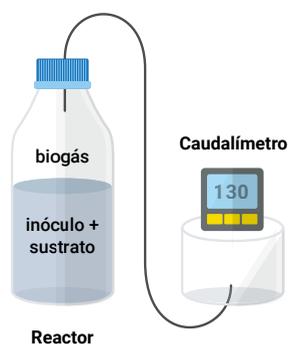
La medida del desplazamiento del émbolo de la jeringa es igual al volumen de biogás generado. Es un método relativamente sencillo, en el cual se minimiza las presiones altas dentro del reactor, evitándose la solubilización del CO_2 . La desventaja es que el error humano puede ser importante debido a que es una operación manual. Por otro lado, para realizar la medición, es necesario retirar el reactor de la incubación, donde el cambio de la tempera-

tura podría influir significativamente en la medición del biogás (Filer et al., 2019). Otro problema de este método es que no puede haber pérdidas entre la pared de la jeringa y el émbolo, pero tampoco fricción, porque ésta impediría el desplazamiento del émbolo generando una presión superior a la atmosférica en el reactor.

Caudalímetro

Figura 4

Medición de biogás por conexión a un caudalímetro



El caudalímetro es un equipo que permite medir el volumen del gas con alta precisión (**Figura 4**). Los caudalímetros utilizados para el ensayo de PBM, deben ser capaces de medir caudales de flujo ul-trabajos, medir en forma continua y liberar el gas para evitar las sobrepresiones en el *headspace*. El dispositivo de medición funciona de acuerdo con el principio de desplazamiento de líquido y flotabilidad. Se genera un pulso digital cuando un volumen definido de gas fluye a través del dispositivo. Luego, por un sistema de adquisición de datos integrado se registra y se muestra el resultado. Existen en el mercado los modelos MilliGascounters RITTER (de origen alemán) y el μ Flow Bioprocess Control (de origen sueco), entre otros, que están diseñados para medir biogás y metano.

Métodos de medición del metano

La producción de metano es uno de los indicadores más sensibles que está relacionado directamente con la degradación de la materia orgánica. Los valores típicos del porcentaje de metano en el biogás se encuentran entre el 60 % y el 75 %. Un desequilibrio entre las etapas de la degradación conduce a una reducción del porcentaje de CH_4 y a un incremento del porcentaje de CO_2 (Tabatabaei & Ghanavati, 2018).

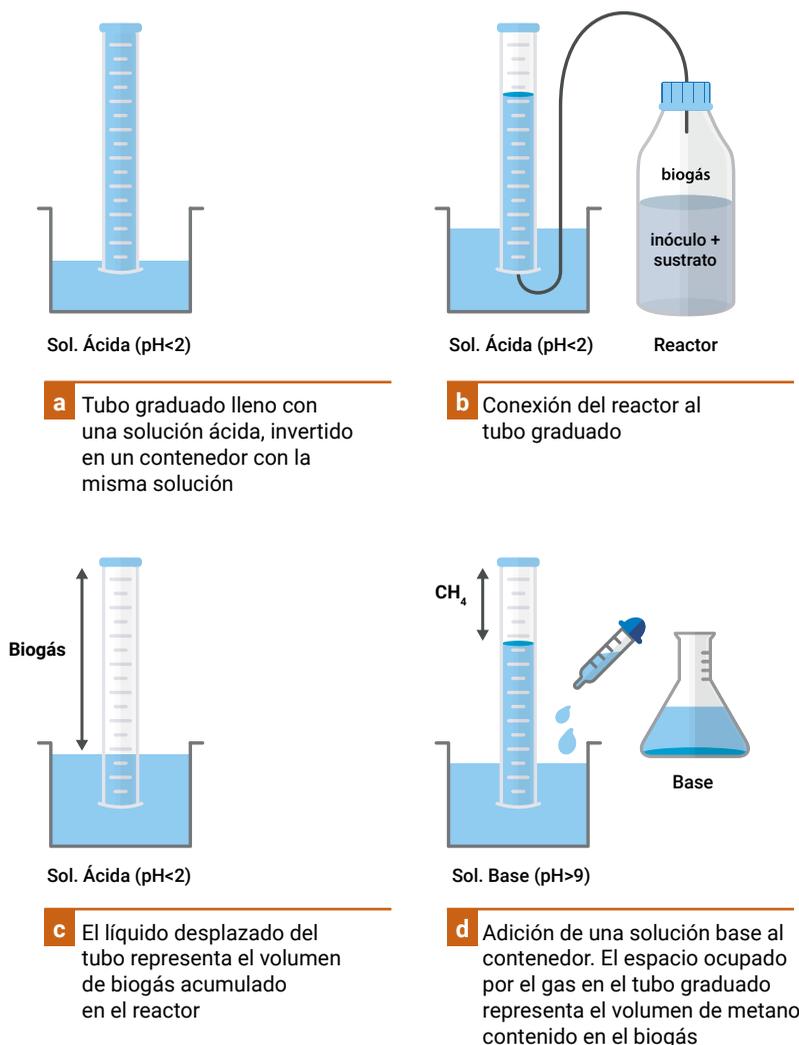
Existen diferentes métodos para medir el metano. La cromatografía gaseosa permite la identificación y cuantificación del CH_4 y CO_2 con mayor resolución y sensibilidad comparada con otros métodos, generando resultados altamente fiables (Strömberg et al., 2014).

Otra alternativa para medir CH_4 es mediante la adsorción del CO_2 con solución alcalina. Se utiliza un tubo graduado con una solución ácida (0,5 M HCl) que es invertido y sumergido en un recipiente con la misma solución. El tubo graduado se conecta desde la parte inferior con el *headspace* del reactor mediante una manguera (**Figura 5 a y b**). El biogás producido fluirá hacia el tubo graduado y desplazará el líquido. El volumen de líquido desplazado representa el volumen de biogás producido (**Figura 5 c**). Una vez medido el biogás, se adiciona una solución básica (NaOH, KOH, LiOH) en el recipiente

para lograr un pH > 9, y la captura del CO₂. El volumen del líquido desplazado en el tubo representa el volumen de CH₄ generado (**Figura 5 d**). La diferencia entre el volumen de biogás y el volumen de CH₄ representa el volumen de CO₂ producido, considerando que la producción de H₂S es despreciable en el biogás (Pham et al., 2013).

Figura 5

Métodos e instrumentos usados para medir el volumen de metano basado sobre el método volumétrico por adsorción del CO₂

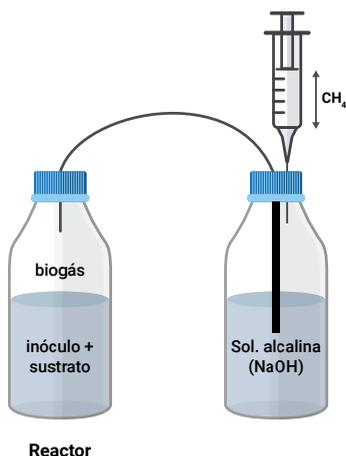


Adaptado de: Tabatabaei & Ghanavati, 2018

En este método, el barrido del aire en el *headpace* debe realizarse con una mezcla de N₂: CO₂, donde el % de CO₂ sea igual al biogás producido (entre 30-40 %). De este modo el N₂ que será transferido al tubo graduado, compensará al volumen de CH₄ en el *headspace* al final del ensayo.

Figura 6

Método volumétrico de medición del metano por jeringa



Otro método volumétrico para medir el CH₄ es haciendo pasar el biogás por una solución alcalina contenida en un recipiente. Se conecta la jeringa en el *headspace* del recipiente, causando la despresurización del sistema (método volumétrico por jeringa). El volumen desplazado por el émbolo de la jeringa representa el volumen de metano producido (**Figura 6**).

Algunos sistemas de reactores miden el metano producido por el método manométrico. Para ello, acoplan en el *headspace* del reactor un sistema adsorbedor de CO₂, el cual utiliza una base (NaOH o LiOH) en estado sólido (perlas, polvo). De esta forma, la presión medida por el trans-

ductor de presión representa el volumen de metano acumulado en el *headspace* (método manométrico por captura del CO₂ con álcali sólido).

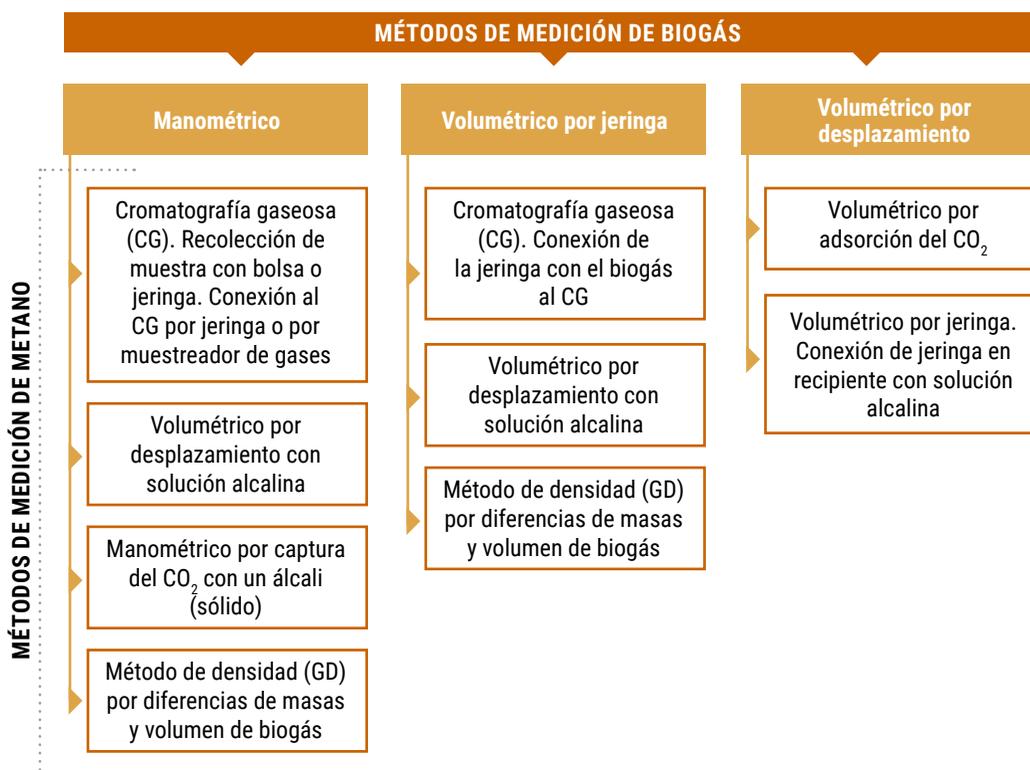
Actualmente, ha tomado gran importancia el método de la densidad para medir metano, conocido como GD-BMP (*gas density- biochemical methane potential*) debido a su practicidad y su bajo costo de medición. Este método requiere conocer dos variables: la pérdida de masa de los reactores y el volumen de biogás producido durante cada evento de muestreo a lo largo del ensayo PBM. Con estas mediciones, es posible determinar la densidad del biogás y, a partir de ello, la composición del biogás. Justesen et al. (2019) demostraron mediante una serie de cálculos la relación entre la composición y la densidad del biogás, el cual es el resultado de la diferencia de las masas molares entre el CH₄ y el CO₂. Mediante la estimación basada en la densidad de la fracción molar del CH₄ y medición del volumen (o masa) del biogás, el cálculo de la producción de CH₄ resulta ser simple. De esta forma, el método GD elimina la necesidad de la cromatografía gaseosa u otros análisis que son altamente costosos para la determinación del PBM.

Resumen

En resumen, existen diferentes alternativas para medir el biogás y metano, con una gran variedad de combinaciones posibles. En el **Diagrama 5** se muestran los métodos más utilizados para medir el biogás y el metano.

Diagrama 5

Métodos de medición de biogás y metano



Frecuencia de muestreo y duración del ensayo

En cuanto a la frecuencia de muestreo, se recomienda realizar una medición diaria durante la primera semana, si se desea conocer la cinética de producción. Luego, se puede ir reduciendo la frecuencia de muestreo a dos veces o una vez por semana. La frecuencia de muestreo dependerá del tipo de método de medición de biogás y metano utilizado. Si el método es manométrico, la frecuencia dependerá de la presión generada en el *headspace* (Holliger et al., 2016).

En cuanto al tiempo de incubación, no está fijado, ya que depende de la biodegradabilidad del sustrato, pero comúnmente la duración es de 30 a 60 días. La degradación completa de la materia orgánica biodegradable se lleva a cabo en 30 días. Sin embargo, para compuestos de lenta degradación puede prolongarse hasta 50 días dependiendo de la calidad del inóculo, de la naturaleza del sustrato y de la relación S/I (Raposo et al., 2012; Tabatabaei & Ghanavati, 2018).

El ensayo finaliza cuando la producción de metano diaria durante tres días consecutivos sea menor al 1 % del volumen total de metano acumulado (Filer et al., 2019; Holliger

et al., 2016; V.D.I., 2006). Es importante que el tiempo de incubación sea idéntico para el blanco (inóculo solamente) y para el inóculo + sustrato para luego realizar el cálculo de BMP (Hafner et al., 2020).

Tipos de métodos para la determinación del PBM

Métodos experimentales convencionales

La configuración del reactor dependerá del sistema de medición de biogás y metano seleccionado. Los métodos experimentales más utilizados son el método V.D.I. 4630 (2006), el método de Møller et al. (2004) y el método de Hansen et al. (2004), los cuales consideran las variables operacionales y los métodos de medición de biogás y metano descriptos anteriormente.

Métodos experimentales automáticos

Existen en el mercado equipos automáticos que permiten determinar el PBM experimentalmente. Los instrumentos automatizados han tomado una gran popularidad en los últimos años, debido a que permiten determinar la biodegradabilidad anaeróbica, midiendo y registrando automáticamente y en tiempo real la producción de biogás y metano (Badshah et al., 2012; Himanshu et al., 2017; Koch et al., 2017; Li et al., 2017; Wang et al., 2017). Estos equipos minimizan los errores humanos y el tiempo de trabajo, tienen una gran precisión analítica y la interpretación de los datos es estandarizada (Strömberg et al., 2014).

Uno de los equipos existentes en el mercado, se basa en la medición del caudal de biogás por el método volumétrico, mientras que la cantidad de metano es determinado por el método de desplazamiento con solución alcalina. Los datos son registrados mediante un *software* que traduce la señal y la expresa como $\text{NmLCH}_4/\text{gSV}$ (273K, 101.325 kPa, condiciones secas).

Otro de los equipos automáticos, utiliza un caudalímetro automático y un sensor de metano en cada reactor, permitiendo contabilizar el volumen de biogás y metano generado, respectivamente. Los cálculos de biogás y metano producido son acordes a la norma V.D.I. 4630 (2006).

También existen equipos automáticos que utilizan el método manométrico para la determinación del metano. Cada reactor tiene un capuchón en el *headspace* que contiene un álcali en estado sólido para capturar el CO_2 . La presión acumulada en el *headspace* es medida por un sensor de presión y se traduce como volumen de CH_4 producido.

Método predictivo por espectrofotometría

Este método es predictivo y se basa en un método analítico no destructivo. La espectrofotometría es la ciencia que estudia la interacción entre la energía fotónica y la materia,

la cual se mide mediante la absorbancia, transmitancia, difusión o fluorescencia de radiación en el rango del ultravioleta, visible e infrarrojo (IR). Las técnicas espectroscópicas incluyen la espectroscopía atómica, la cual mide sustancias en la fase gaseosa luego de la volatilización y la espectroscopía molecular, la cual mide directamente las sustancias en la fase líquida (Jingura & Kamusoko, 2017; Lesteur et al., 2010). Los métodos de espectroscopía IR contienen información sobre la estructura de los componentes disueltos e identifican los componentes por comparación con un espectro de referencia; puede usar los instrumentos de IR cercano (NIR) y la espectroscopía IR de transformada de Fourier (FTIR). Estos métodos pueden monitorear hidrocarburos aromáticos, alifáticos y clorados (Jingura & Kamusoko, 2017).

Métodos teóricos

El potencial metanogénico teórico puede ser determinado conociendo la composición elemental, la composición química o la DQO de la muestra. Estos métodos teóricos asumen que el sustrato es completamente degradado y que es despreciable el uso del sustrato por los microorganismos como fuente de energía (Jingura & Kamusoko, 2017). Son predictivos (valor teórico) y deberán ser ajustados con el ensayo experimental del PBM (Nielfa et al., 2015).

El PBM teórico (PBMT) basado en la composición elemental (C, H, O, S y N) de una muestra puede ser calculado mediante la ecuación Symons and Buswell (1933):

$$C_nH_aO_b + \left(n - \frac{a}{4} - \frac{b}{2}\right) H_2O \rightarrow \left(\frac{n}{2} - \frac{a}{8} + \frac{b}{4}\right) CO_2 + \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) CH_4$$

$$PBMT = \frac{(a/2 + a/8 - b/4) \times 22,4}{(12n + a + 16b)}$$

Cuando las proteínas están presentes en el sustrato, el NH_3 es liberado y debe ser considerado para calcular el PBMT, acorde a la ecuación de Boyle (Nielfa et al., 2015; Raposo et al., 2011; Tabatabaei & Ghanavati, 2018):

$$C_nH_aO_bN_c + \left(n - \frac{a}{4} - \frac{b}{2} + \frac{3c}{4}\right) H_2O$$

$$\rightarrow \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8}\right) CH_4 + \left(\frac{n}{2} - \frac{a}{8} + \frac{b}{4} + \frac{3c}{8}\right) CO_2 + cNH_3$$

$$PBMT = \frac{(n/2 + a/8 - b/4 - 3c/8) \times 22,4}{(12n + a + 16b + 14c)}$$

Otra forma de determinar el PBMT es mediante la composición química de la muestra, determinando el porcentaje de proteínas, carbohidratos, lípidos y AGV y considerando los PBMT de estos componentes. En la **Tabla 4**, se muestran los PBMT de los sustratos más comunes.

Tabla 4

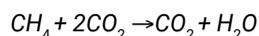
| Rendimientos teóricos de los sustratos comunmente utilizados | | |
|--|---|-------------------------------|
| Sustrato | Composición | PBMT (mLCH ₄ /gSV) |
| Carbohidratos | (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n | 415 |
| Proteínas | C ₅ H ₇ NO ₂ | 496 |
| Lípidos | C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆ | 1014 |
| Etanol | C ₂ H ₆ O | 730 |
| Acetato | C ₂ H ₄ O ₂ | 373 |
| Propionato | C ₃ H ₆ O ₂ | 530 |

El PBMT está expresado en condiciones normales (1 atm, 273 K)

El PBMT de la muestra sustrato se calcula mediante la siguiente ecuación (Jingura & Kamusoko, 2017; Tabatabaei & Ghanavati, 2018):

$$PBMT=415 (\% \text{ carbohidratos})+496 (\% \text{ proteínas})+1014 (\% \text{ lípidos})+370 (\% \text{ AGV})$$

Por último, el PBMT puede ser calculado conociendo la concentración de la DQO de la muestra. Este método asume que 1 mol de CH₄ requiere 2 moles de O₂ para oxidar el C a CO₂ con producción simultánea de un mol de H₂O. Cada g de CH₄ equivale a 4 g de DQO (Jingura & Kamusoko, 2017):



El volumen de CH₄ producido teóricamente en condiciones estándares de presión y temperatura (1 atm, 273 K) por cada g de DQO puede ser calculado, a través de la siguiente expresión (Tabatabaei & Ghanavati, 2018):

$$V (\text{mLCH}_4) = \frac{n_{\text{CH}_4} \times R \times T}{P}$$

$$n_{\text{CH}_4} = \frac{\text{DQO (g)}}{64 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}$$

Por lo tanto:

$$1 \text{ g DQO} = 350 \text{ mLCH}_4 \text{ (1 atm, 273 K)}$$

Donde:

R = la constante de los gases ideales (82,0576 atm.mL/mol.K)

T = la temperatura (K)

P = la presión atmosférica (atm)

Conociendo la masa de DQO y de SV agregados al reactor puede calcularse el PBMT (mL CH₄/gSV) de la muestra utilizando esta equivalencia.

Si bien el PBMT da una idea de la calidad del sustrato y su potencial producción de metano, en PBM o rendimiento de metano obtenido experimentalmente siempre será inferior debido a numerosos factores (Angelidaki & Sanders, 2004):

- Una fracción del sustrato es utilizado para síntesis de la biomasa, entre un 5 a 10 % de la materia orgánica degradada.
- Una fracción de la materia orgánica se perderá en el efluente en un tiempo de retención finita.
- La lignina no es degradada anaeróbicamente.
- Frecuentemente, una parte del material es inaccesible debido a las uniones entre partículas o a la estructura de la materia orgánica.
- Limitaciones de otros nutrientes.

Interpretación de los datos e informe

El volumen de metano producido es expresado en condiciones estándares de presión y temperatura (1,013 bar y 273 K), para facilitar la comparación de los resultados con lo reportado por la bibliografía (Holliger et al., 2016; Strömberg et al., 2014).

Las curvas de producción de metano, se realizan calculando en cada intervalo de tiempo medido, la producción de metano específica (PME), término que se utiliza para referirse al rendimiento CH_4 de un sustrato determinado. Las curvas de PME muestran el rendimiento de metano acumulado a lo largo del tiempo, reflejando la cinética de degradación del sustrato. Estas curvas se incluyen en el informe de PBM. El SME y el PBM presentan las mismas unidades, expresadas como $\text{mLCH}_4/\text{gDQO}$ o gSV del sustrato agregado (Hafner et al., 2020).

Además, a través de este ensayo puede determinarse la biodegradabilidad anaeróbica del residuo, ya que el PBM implica la degradación de la materia orgánica por microorganismos bajo condiciones anaeróbicas. Cuando la producción de biogás y metano es alta, menos materia orgánica remanente queda por degradar, indicando una alta biodegradabilidad anaeróbica (Lesteur et al., 2010). Existen varias formas propuestas para relacionar el PBM con la biodegradabilidad. Algunos consideran el índice de biodegradabilidad, como la remoción de materia orgánica (calculada a través de la remoción de SV). Otros lo relacionan con el PBMT, calculado en base a la composición elemental, la composición química o la DQO de la muestra.

El índice de biodegradabilidad (IB) puede ser calculado como la relación del PBM experimental (PBMe) y el teórico (PBMT):

$$IB (\%) = \frac{PBMe \times 100}{PBMT}$$

Donde, el PBMe es el potencial bioquímico metanogénico medido experimentalmente, expresado como mLCH₄/gSV.

En la **Tabla 5** se muestra la información que debe detallarse en un informe del ensayo de PBM, según las recomendaciones de Angelidaki et al. (2009):

Tabla 5

| Recomendaciones sobre la información que debe ser reportada en un informe de ensayo PBM | |
|--|---|
| Características del ensayo | Descripción |
| Duración | Indicar fecha de inicio y finalización del ensayo |
| Control | Sustrato estándar utilizado y sus características fisicoquímicas |
| Sustrato | Características fisicoquímicas |
| Inóculo | Origen, actividad (AME) y sus características fisicoquímicas |
| Condiciones operativas | Temperatura de incubación; tipo y velocidad de agitación; réplicas; volumen de <i>headspace</i> ; volumen del líquido; relación S/l. |
| Resultados del blanco y el control | Producción de metano; gráficos; Relación entre el rendimiento de metano experimental y el teórico (en %) para el control |
| Resultados de la muestra | Producción de metano por triplicado de la muestra, su promedio relativo y desvíos estándares; gráficos; rendimiento de metano expresado como mLCH ₄ / gDQO o gSV de la muestra en condiciones normales; índice de biodegradabilidad (opcional) |

Modelo experimental del ensayo de potencial bioquímico metanogénico

Existe una gran variedad de alternativas para realizar este ensayo. Las normativas y guías establecidas por diferentes regiones y países difieren en sus metodologías, resultando difícil la elección de aquella más adecuada para realizar el ensayo de PBM.

La propuesta metodológica y diseño experimental aquí presentado, fue realizado ajustando las variables principales que afectan el proceso anaeróbico en función a lo más aceptado por la comunidad científica, y adecuando las condiciones operativas y de diseño según la disponibilidad y accesibilidad de equipamiento del laboratorio.

Resulta indispensable, antes de iniciar el ensayo, fijar algunas condiciones operativas establecidas tales como: sustrato patrón (control), el blanco, los volúmenes (efectivo y del *headspace*) y la relación S/I. En la **Tabla 6** se detallan estas variables principales y una descripción en cada caso.

Tabla 6

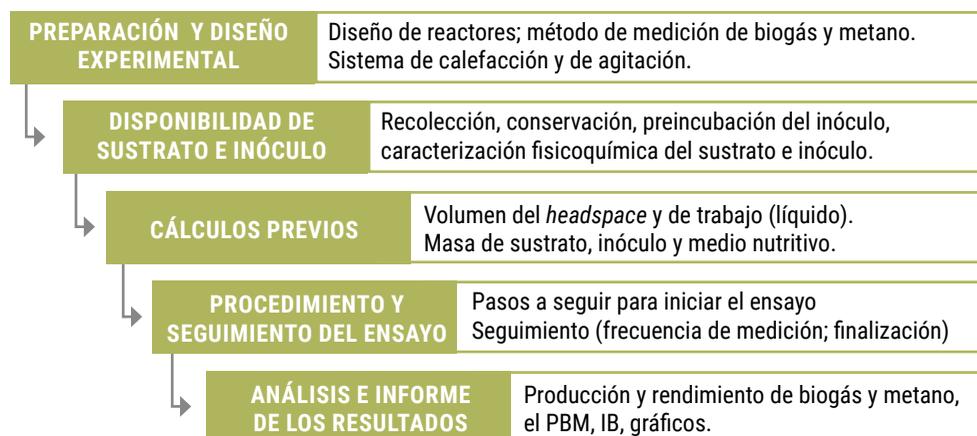
Principales variables operativas que requieren ser consideradas antes del inicio del ensayo

| Condiciones operativas | Descripción |
|------------------------|---|
| Blanco y control | Siguiendo las recomendaciones, en cada ensayo debe considerarse un blanco (inóculo solo) y un control (sustrato patrón). |
| <i>Headspace</i> | 40 % de volumen del <i>headspace</i> . Se fijó este porcentaje en función a la frecuencia de muestreo que generalmente se realiza y debido a que es el más reportado. |
| Relación S/I | S/I= 0,5. Se incorpora una relación más baja (S/I= 0,25) y una más alta (S/I= 1) si se sospecha presencia de inhibidores o se desconoce el tipo sustrato. |

En el **Diagrama 6**, se muestra un esquema descriptivo de los pasos a seguir para la realización del ensayo, y los materiales, equipos y condiciones operativas que deben ser considerados desde el inicio hasta la finalización del ensayo.

Diagrama 6

Pasos que seguir para la realización del ensayo



Preparación y diseño experimental

Diseño de reactores

Varios aspectos y factores determinan el diseño de reactor a implementar, como ser el método de medición de biogás y metano, el volumen, el tipo de material, la agitación, la temperatura, entre otros. Esta gran diversidad de factores y aspectos que son considerados a la hora de diseñar el reactor, conduce a la generación de una gran variedad de modelos y diseños de reactores. Pero, independientemente de su diseño, el reactor debe cumplir con las condiciones de estanqueidad y anaerobiosis durante todo el período que se lleva a cabo el ensayo de PBM.

El modelo de reactor que se presenta fue diseñado para medir el biogás por método manométrico y su composición (CH_4 , CO_2) por cromatografía gaseosa. El reactor consiste en una botella de vidrio borosilicato transparente que contiene inercia química entre el medio y el vidrio, de 560 mL de capacidad y resistente a altas temperaturas (hasta 140 °C) y presiones (hasta 1,5 bar de presión manométrica). Cada tapa de reactor es de material polipropileno, con un orring interno para favorecer el cierre hermético. La tapa posee en el centro una llave de acero inoxidable con válvula esférica de ¼ pulgadas, acoplada a un conector neumático con orring interno (**Figura 7 a**). La cuantificación del

biogás se realiza conectando una manguera neumática del mismo diámetro a un transductor de presión y conectando el otro extremo de la manguera al conector neumático ubicado en el centro de la tapa del reactor. La válvula se abre y el biogás acumulado en el *headspace* es medido mediante el transductor de presión (**Figura 7 b**). Se cierra la válvula para conservar el biogás acumulado en la *headspace* y luego determinar su composición por cromatografía gaseosa (**Figura 7 c**). Una vez realizada la medición, el reactor es despresurizado hasta alcanzar la presión atmosférica en su interior, se cierra la válvula y el reactor queda listo para la próxima medición.

Figura 7

Sistema de reactor utilizado para los ensayos de PBM



También, el ensayo de PBM se lleva a cabo en los reactores mostrados en la **Figura 8**, los cuales contienen (a diferencia del diseño anterior), un muestreador del líquido. Este tipo de reactores son utilizados cuando se requiere monitorear la evolución del proceso anaeróbico a través de los parámetros como AGV o alcalinidad o bien cuando se desea estudiar el comportamiento de compuestos inhibitorios.

El ensayo se realiza por triplicado, por el cual debe considerarse que por muestra a analizar se requieren 9 reactores (muestra, control y blanco).

Cada reactor fue diseñado para utilizar el método manométrico para medir el biogás y el metano por el método de cromatografía gaseosa, por el cual debe considerarse contar con un transductor de presión y un cromatógrafo de gases.

La agitación de los reactores se realiza de forma axial con un agitador magnético diseñado con 6 puertos, y con velocidad regulada a 100 rpm (**Figura 9 a**). También el Laboratorio cuenta con un sistema de agitación orbital de 9 puertos, que trabaja a una velocidad de 100 y 200 rpm. El sistema de calefacción es a través de una incubadora, regulada para trabajar en condiciones mesofílicas, a $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (**Figura 9 b**).

Figura 8

Reactor con muestreador de la fase líquida



- a** Reactor anaeróbico
1. Válvula esférica conectada al muestreador
2. Válvula esférica conectada al headspace
3. Tubo muestreador



- b** Reactor anaeróbico conectado a la jeringa para muestrear la fase líquida

Figura 9

Condiciones operativas del ensayo



- a** Reactores anaeróbicos en agitador magnético con 6 puertos



- b** Reactores anaeróbicos en incubadora regulada a 35 °C

En la **Tabla 7** se resume los principales equipos y materiales que se necesitan para llevar a cabo este modelo de metodología.

Asimismo, debe prepararse el medio nutritivo antes de iniciar el ensayo (**Tabla 8**). Si bien existen varios formulados, en esta metodología se seleccionó el medio nutritivo descrito por Angelidaki et al. (2009).

Tabla 7

| Descripción de los principales materiales, instrumentos y reactivos para realizar el ensayo de PBM | |
|--|---|
| Balanza hasta 5 kg | Para pesar los reactores y su contenido |
| Reactores | 9 reactores con sus respectivas tapas por muestra a analizar (muestra + control + blanco) |
| Cilindro con gas N ₂ | Para realizar la prueba de estanqueidad y el barrido del O ₂ en el <i>headspace</i> |
| Transductor de presión | Para medir el biogás |
| Incubadora | Para trabajar en condiciones mesofílicas (35 °C) |
| Agitador | Para realizar el mezclado |
| Cromatógrafo de gases | Para cuantificar la composición del biogás |
| Peachímetro | Para la medición del pH en la mezcla, sustrato e inóculo. |
| Celulosa microcristalina, p.a. | Sustrato estándar (control) |
| Sulfuro de sodio (Na ₂ S·7H ₂ O) | Para asegurar las condiciones reductoras en el medio. La concentración final debe ser 0,1 g/L en el reactor. Preparar en el momento. No se conserva. (Valcke & Verstraete, 1983). |

Tabla 8

| Solución stock de macro y micronutrientes | | | |
|---|---------------------|--|---------------------|
| Macronutrientes | Concentración (g/L) | Micronutrientes | Concentración (g/L) |
| Sc 1= NH ₄ Cl | 17 | FeCl ₂ ·4H ₂ O | 2,0 |
| Sc 2= K ₂ HPO ₄ | 3,70 | H ₃ BO ₃ | 0,05 |
| Sc 3= MgSO ₄ | 0,56 | ZnSO ₄ ·H ₂ O | 0,07 |
| Sc4= CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0,80 | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0,04 |
| | | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,05 |
| | | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 0,05 |
| | | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,05 |
| | | NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0,09 |
| | | EDTA | 0,50 |
| | | HCl 36 % | 1 ml/L |
| | | Na ₂ SeO ₃ | 0,07 |
| | | Resazurina | 0,50 |

Preparación del medio nutritivo: En un matraz de 1000 mL, agregar 950 mL de agua aproximadamente, adicionarle 10 mL de cada solución de macronutrientes Sc 1, 2, 3 y 4, respetando ese orden. Luego se adiciona 1 mL de la solución de micronutrientes. Llevar a 1 L. La mezcla es gasificada con una corriente de gas N₂ durante 10-15 min. Se recomienda almacenar las soluciones de macro y micronutrientes en heladera hasta 6 meses (Angelidaki et al., 2009).

Disponibilidad del sustrato y del inóculo

Sustrato

Algunas recomendaciones deben ser consideradas sobre el muestreo y la preparación del sustrato en el ensayo de PBM:

- La muestra debe ser lo más representativa posible al sustrato que será tratado por la digestión anaeróbica en una planta a escala real.
- La muestra debe ser lo más homogénea posible. Puede utilizarse un sistema de agitación para tomar la muestra (por ejemplo, para efluente de cerdos).
- Pretratamiento: puede requerirse una trituración previa de la muestra antes de su utilización como sustrato (por ejemplo, para la FORSU), para maximizar el contacto entre el sustrato y los microorganismos y para una mayor representatividad y homogeneidad en el reactor.

En cuanto a la caracterización inicial del sustrato, es recomendable incluir los parámetros pH, ST; SV y DQO. Con el contenido de ST puede calcularse también el contenido de humedad de la muestra; con el contenido de SV (materia orgánica de la muestra) puede estimarse el carbono orgánico total a través del factor de conversión de 1,8 gSV/gC (Iglesias Jiménez & Pérez García, 1992).

Se recomienda la determinación de la composición elemental de la muestra (C, H, N, S, O). Esto permitirá calcular el PBM teórico de la muestra con mayor precisión. También el PBM teórico puede calcularse a través de la DQO. Sin embargo, la determinación de esta variable, principalmente cuando se trabaja con sustratos sólidos o que presentan una alta heterogeneidad y donde el valor de la DQO es muy alto, puede resultar técnicamente erróneo, debido a la baja representatividad de la alícuota y a las diluciones altas que deben realizarse para la técnica. Para obtener un valor de DQO representativo de la muestra, se recomienda hacer esta técnica por sextuplicado.

Por otro lado, si se sospecha la presencia de algún inhibidor en la muestra (N-NH_3 o alto contenido de metales pesados) deberá incluirse esta variable en su caracterización.

Una vez homogenizada la muestra y triturada (en caso de ser necesario) se fracciona en tres réplicas (A, B, C) para realizar las determinaciones analíticas y llevar a cabo el ensayo; las muestras se deben conservar en la heladera (4 °C) hasta su uso.

Por último, para realizar el control deberá conocerse el contenido de SV del sustrato estándar (celulosa, gelatina). Este valor se utilizará para calcular la cantidad de masa a agregar al sistema, para mantener una relación de $S/I=0,5 \text{ gSV/gSV}$.

Inóculo

Generalmente, se utiliza un inóculo fresco, proveniente de una planta de biogás en funcionamiento. Se prefieren los lodos granulares que poseen mayor actividad. Para

la caracterización, se recomienda determinar los siguientes parámetros: pH, Alcalinidad, AGV, N-NH₃, ST, SV, SST, SSV y principalmente la actividad metanogénica específica (AME). Los valores obtenidos son comparados con los valores referenciados por Holliger et al. (2016); de no cumplir con alguno de estos valores referenciados, deberá seleccionarse otro inóculo para la realización del ensayo. En la práctica, una forma de estimar la calidad del inóculo es conocer las condiciones de funcionamiento del reactor de origen, donde su calidad será la adecuada para el ensayo si proviene de un reactor que trabaja eficientemente.

El inóculo es desgasificado previamente al inicio del ensayo. Se coloca el inóculo en un frasco de dos litros de vidrio con un *headspace* del 40 %, aproximadamente. Luego se cierra con la tapa de polipropileno especial, con la válvula abierta para que ventee el biogás residual y se lo lleva a la incubadora a 35 °C (la misma temperatura de trabajo del ensayo), durante no más de 4 días.

Cálculos previos

El volumen de *headspace* (V_h), el volumen total de líquido (V_t), la masa de sustrato (M_s) y la masa de inóculo (M_{in}) a agregar en cada reactor, deben conocerse a priori de arrancar el ensayo. Estos valores se calculan según las siguientes expresiones:

$$V_h \text{ (mL)} = \frac{V_t \times 40}{100}$$

$$V_f \text{ (mL)} = V_t - V_h$$

$$V_{in} \text{ (mL)} = \frac{A \times V_f}{B}$$

Donde:

V_h = volumen del *headspace* (mL)

V_t = volumen total del reactor (mL)

V_f = volumen final del líquido en el reactor (mL)

V_{in} = volumen de inóculo agregado al reactor (mL)

A = concentración del inóculo en el reactor (15 gSV/L)

B = concentración del inóculo (gSV/L)

Como la carga del reactor se realizará por pesaje, el V_{in} deberá pasarse a masa de inóculo (M_{in}) conociendo su densidad:

$$M_{in} \text{ (g)} = d \times V_{in}$$

Donde:

d= densidad del inóculo (g/mL)

A través de la relación S/I (gSV/gSV) establecida y conociendo la masa de inóculo (M_{in}), se calcula la masa de sustrato (M_s) según:

$$M_s (g) = \frac{M_{in} \times C \times S/I}{D}$$

Donde:

M_s = masa de sustrato agregada al reactor (g)

S/I = relación sustrato/inóculo fijada. Recomendada: S/I= 0,5 (gSV/gSV).

C= concentración del inóculo (= B, pero expresado como gSV/g)

D= concentración del sustrato (gSV/g)

Todos estos resultados deben ser registrados en una planilla, ya que es indispensable conocerlos para llevar a cabo el ensayo.

Procedimiento y seguimiento del ensayo

Procedimiento

1. Pesar el reactor y tararlo
2. Agregar la masa de inóculo al reactor (M_{in} en g)¹.
3. Agregar la masa de sustrato al reactor (M_s en g)¹.
4. Agregar medio nutritivo hasta un poco menos (10 ml) que el V_p , considerando que la densidad de la mezcla es igual a 1.
5. Medir el pH de la mezcla y ajustar a pH neutro en el caso que sea necesario. Registrar su valor.
6. Una vez neutralizada la mezcla, completar con el medio nutritivo hasta V_p .
7. Agregar la solución reductora de Na_2S para que quede 0,1 g/L dentro del reactor. Cerrar el reactor inmediatamente.
8. Realizar el barrido del O_2 con el N_2 . Para ello, conectar la manguera desde el cilindro de N_2 a la válvula de la tapa del reactor. Abrir la válvula del tubo de N_2 (re-

¹Las masas de inóculo y de sustrato a agregar en cada reactor deben ser homogéneas y representativas. Si los lodos son granulares, los cuales sedimentan rápidamente, pueden tomarse con una pipeta Pasteur plástica con punta cortada manteniendo en agitación el inóculo o agitando con la misma pipeta Pasteur. Si la masa de sustrato es líquida (por ejemplo, efluentes agropecuarios o agroindustriales) considerar también esta recomendación para la toma de la muestra.

gulada a 25 psi de salida) y del reactor para permitir el paso del N_2 por 1 minuto, aproximadamente. Cerrar ambas válvulas, conectar el reactor al transductor de presión y medir la presión. Se toma como referencia lograr medir entre 0,80 y 0,90 bar dentro del reactor. Si no se alcanzó la presión de referencia, repetir este procedimiento pasando nuevamente más N_2 ².

9. Realizar la prueba de hermeticidad. Sumergir en agua el reactor sometido a presión (paso anterior) y observar que no se liberen burbujas en la tapa del reactor. Si se observan burbujas es porque el reactor tiene pérdidas, no pasando la prueba de hermeticidad. Abrir la válvula del reactor y liberar el gas hasta alcanzar la presión atmosférica. Si pasó la prueba de hermeticidad, repetir tres veces más el barrido del O_2 con N_2 (punto anterior) para asegurar el desplazamiento completo del O_2 .
10. Cerrar la válvula del reactor, y llevarlo a incubadora a una temperatura de 35 °C. Registrar la hora de inicio de incubación.
11. Agitar los reactores 2 veces al día durante 20 minutos.
12. Preparar el blanco siguiendo el mismo procedimiento, pero sin el agregado de sustrato (punto 2).
13. Preparar el control siguiendo el mismo procedimiento, pero agregando como sustrato la celulosa microcristalina sólida en la misma relación que la usada para el sustrato (relación de 0,5 gSV/gSV).
14. Preparar una cuarta réplica, siguiendo el mismo procedimiento para el sustrato, el control y el blanco. Esta cuarta réplica será utilizada para la caracterización inicial de la mezcla líquida³.

Seguimiento del ensayo

15. Medición del volumen del gas: conectar con una manguera neumática el transductor con la válvula de la tapa del reactor. Abrir la válvula, medir y registrar la presión, como así también la fecha, la hora y la temperatura de incubación. Cerrar la válvula del reactor, asegurando que no existan pérdidas del gas en el *headspace*.

²Ajustar el procedimiento de barrido del O_2 con N_2 en función al equipamiento y condiciones con que se cuenta. El tiempo de barrido con N_2 , su caudal de salida y el procedimiento descrito aquí fueron ajustados en función a este diseño de reactor, teniendo en cuenta la resistencia del material y asegurando no superar la presión máxima que soporta, por lo que deberán ser considerados solo como una recomendación.

³El contenido de CH_4 y CO_2 en el biogás fue determinado por cromatografía de gases con equipo Hewlett Packard 5890 GC System siguiendo la norma ASTM D 1945-14 (2014). Se utilizó la columna de tamiz molecular con malla 80/100 empacada en tubo de acero inoxidable y granulometría 13 X y una columna de Porapak N malla 80/100 empacada en un tubo de acero inoxidable. Como gas de transporte se utilizó gas Helio grado cromatográfico 99.998 % de pureza a un caudal de 80 mL/min. La temperatura del horno de columnas fue de 90 °C, la del inyector de 130 °C, la del detector de 250 °C y donde se alojan las válvulas y el lazo de muestra de 130 °C. El detector utilizado es un monofilamento de conductividad térmica (TCD). El tiempo total de análisis es de unos 6 minutos. El gas patrón utilizado para la calibración está compuesto por 47,4 % CH_4 , 8,60% de N_2 , 35,00 % de CO_2 , 2,00 % de O_2 , 2,99 % de H_2 y 4,01 % de CO, con nivel de confianza del 95 % (cilindro N° 155032, grupo Linde Gas S.A.).

La primera medición deberá realizarse dentro de las primeras 24 h.

16. Medición del CH₄ y CO₂: conectar el reactor con el muestreador para gases del cromatógrafo. Abrir la válvula del reactor para que el gas en el *headspace* pase por la columna cromatográfica⁴. Despresurizar el reactor hasta presión atmosférica, así el sistema queda listo para una próxima medición.
17. Frecuencia de muestreo: dependerá de la presión en el *headspace*⁵.
18. Finalización del ensayo: cuando la producción de biogás diaria es menor al 1 % del total generado.
19. Caracterización inicial y final de la mezcla dentro del reactor. Se recomienda medir pH, SV y/o DQO. Si se sospecha algún inhibidor como N-NH₃ incorporarlo en el análisis.

Análisis y reporte de los resultados

Registro y análisis de datos. Cálculos

Mediante la Ley de Gases Ideales y, bajo condiciones estándares de presión y temperatura (273 K y 1,013 bar), el volumen de CH₄ en el tiempo t ($V_{CH_4 t}$) se calcula, según las siguientes ecuaciones:

$$V_{CH_4 t} \text{ (mL)} = \frac{(P - P_{VH_2O}) \times V_h \times 273 \text{ K}}{1,013 \text{ bar} \times (T + 273 \text{ K})} \times \frac{X_{CH_4 t}}{100}$$

$$P_{VH_2O} \text{ (bar)} = 0,61094 e^{(17,625 \times T / (243,04 + T))} \times 0,01$$

Donde:

$V_{CH_4 t}$ = es el volumen de metano en el *headspace* calculado con la concentración de metano y la presión medida (P) en el tiempo t (mL).

P = incremento de la presión (bar).

P_{VH_2O} = es la presión de vapor, calculada con la ecuación de Magnus (Alduchov & Eskridge, 1996). Como la ecuación esta expresada en KPa, se multiplica por 0,01 para pasar a bares.

V_h = volumen del *headspace* (mL)

T = temperatura de incubación (°C)

⁴Otra forma diferente es considerar 100 mL adicionales de volumen final en el reactor, y antes de cerrarlo, se toma esta alícuota en forma homogénea para la caracterización inicial de cada réplica. La toma de muestra debe ser lo más representativa y homogénea posible. Para ello, colocar el reactor en agitación axial y utilizar una pipeta Pasteur plástica con punta redondeada para su recolección.

⁵Para obtener un resultado cromatográfico fiable, se requiere un valor mínimo de presión de 0,10 bar para realizar una barrida segura por la columna cromatográfica y un valor máximo de 1 bar para evitar posibles fugas, ruptura del recipiente por sobrepresión y minimizar la solubilidad de los gases (CH₄ y CO₂) en el líquido.

$X_{CH_4 t}$ = concentración de metano medida en el tiempo t, normalizada y expresada como fracción en volumen (%).

Se incluye la presión de vapor, suponiendo que para el biogás es la presión de vapor de saturación, porque se espera que el biogás esté cerca del equilibrio en la fase acuosa (Hafner et al., 2020).

Inmediatamente luego de la despresurización o postventeo se asume que el sistema alcanza la presión atmosférica (1,013 bares), que el cambio de la temperatura es despreciable y que la composición del biogás es la misma que antes del venteo (Hafner et al., 2020). Este estado será el inicial (t-1) para la próxima medición.

El volumen de metano producido en un intervalo de tiempo (V_{CH_4}), se calcula como la diferencia entre el volumen de metano medido en el tiempo t ($V_{CH_4 t}$), y el volumen de metano postventeo de la medición anterior $V_{CH_4 (t-1)}$.

$$V_{CH_4} (mL) = V_{CH_4 t} (mL) - V_{CH_4 (t-1)} (mL)$$

$$V_{CH_4 (t-1)} (mL) = \frac{(1,013 \text{ bar} \times P_{VH_2O}) \times V_h \times 273 \text{ K}}{1,013 \text{ bar} \times (T + 273 \text{ K})} \times \frac{X_{CH_4 (t-1)}}{100}$$

Donde:

$V_{CH_4 (t-1)}$ = es el volumen de metano en el *headspace* luego del postventeo hasta la presión atmosférica de la medición anterior, t-1 (mL).

$X_{CH_4 (t-1)}$ = concentración de metano medida en el último tiempo de muestreo, t-1, normalizada y expresada como fracción en volumen (%).

Para calcular el volumen de dióxido de carbono (V_{CO_2}), se utilizan las mismas ecuaciones descritas anteriormente, pero reemplazando la concentración de metano por la concentración de CO_2 .

El volumen de biogás ($V_{biogás}$) producido se calcula según:

$$V_{biogás} (mL) = V_{CH_4} + V_{CO_2}$$

A continuación, se explican los cálculos para la determinación de la producción de metano específica y del potencial bioquímico metanogénico, basados en la metodología descrita por (Hafner et al., 2020).

Para construir la curva de la producción de metano específica (PME) del sustrato, debe considerarse la resta de la producción de metano específica del blanco.

El rendimiento de metano del inóculo (blanco) de la réplica j se calcula como:

$$RCH_{A,b,j,t} \left(\frac{mLCH_4}{g} \right) = \frac{VCH_{A,a,c,b,j,t}}{M_{in}}$$

Donde:

$RCH_{4,b,j,t}$ = el rendimiento de metano del inóculo para la réplica j en el tiempo t (mLCH₄/g).

$VCH_{4,ac,b,j,t}$ = volumen de metano acumulado del blanco para la réplica j en el tiempo t (mL).

M_{in} = masa de inóculo agregada al inicio del ensayo en la réplica j (g).

El rendimiento de metano del blanco promedio en el tiempo t ($\overline{RCH_{4,b,t}}$) se calcula promediando los valores de $VCH_{4,ac,b,j,t}$ obtenidos en cada réplica j.

La producción neta de CH₄ para el sustrato en el tiempo t ($VCH_{4,s,n,t,net}$) para cada réplica n se calcula como:

$$VCH_{4,s,n,t,net} \text{ (mL)} = VCH_{4,ac,s,n,t} - \overline{RCH_{4,b,t}} \times M_{in}$$

Donde:

$VCH_{4,ac,s,n,t}$ = volumen de metano acumulado del sustrato + inóculo para la réplica n en el tiempo t (mL).

La producción de metano específica del sustrato para cada réplica n en el tiempo t ($PME_{n,t}$) se calcula como:

$$PME_{n,t} \left(\frac{\text{mLCH}_4}{\text{gSV}} \right) = \frac{VCH_{4,s,n,t,net}}{M_{s,sv}}$$

Donde:

$M_{s,sv}$ = masa de sustrato agregada al inicio del ensayo, expresada como sólidos volátiles (gSV).

La curva de PME del sustrato para cada réplica se construye considerando la suma de cada PME obtenido en el tiempo t ($PME_{n,t}$). También puede graficarse la curva de PME promedio del sustrato considerando el promedio de los valores obtenidos para cada réplica en el tiempo t (PME_t).

El Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM) del sustrato para cada réplica es el máximo valor acumulado de la PME en la duración total del ensayo (tf):

$$PBM_n \left(\frac{\text{mLCH}_4}{\text{gSV}} \right) = PBE_{ac,n,tf}$$

Donde:

PBM = potencial bioquímico metanogénico del sustrato para la réplica n (mLCH₄/gSV)

$PBM_{ac,n,tf}$ = la producción de metano específica del sustrato para la réplica n, acumulada durante todo el ensayo (mLCH₄/gSV)

$M_{s,sv}$ = masa de sustrato agregada al inicio del ensayo, expresada como sólidos volátiles (gSV).

El índice de biodegradabilidad (IB) del sustrato para la réplica n se calcula considerando que por cada g de DQO de sustrato agregado al sistema se transforman 350 mL de CH₄ en condiciones estándares (Lesteur et al., 2010):

$$IB (\%) = \frac{PBM \times M_{s,sv} \times 100}{350 \times DQO}$$

Donde:

PBM = potencial bioquímico metanogénico del sustrato (mLCH₄/gSV).

DQO = masa del sustrato agregada al inicio del ensayo, expresada como g de DQO.

350 = es el factor de conversión, que considera que 1 g DQO= 350 mL de CH₄.

El promedio del IB del sustrato se calcula considerando el valor obtenido de IB para cada réplica.

Validación del ensayo e informe de los resultados

El ensayo debe cumplir con ciertos criterios de control de calidad para que pueda ser validado e informado (Holliger et al., 2016). El ensayo deberá ser rechazado si:

- El desvío estándar relativo del blanco y del control es > 5 %
- El PBM del control es < 85 % o > 100 % comparado con el PBM teórico.
- El desvío estándar relativo de la muestra es > 5 %

Koch et al. (2019) recomienda tener en cuenta los siguientes criterios para que la curva de rendimiento de metano sea aceptable:

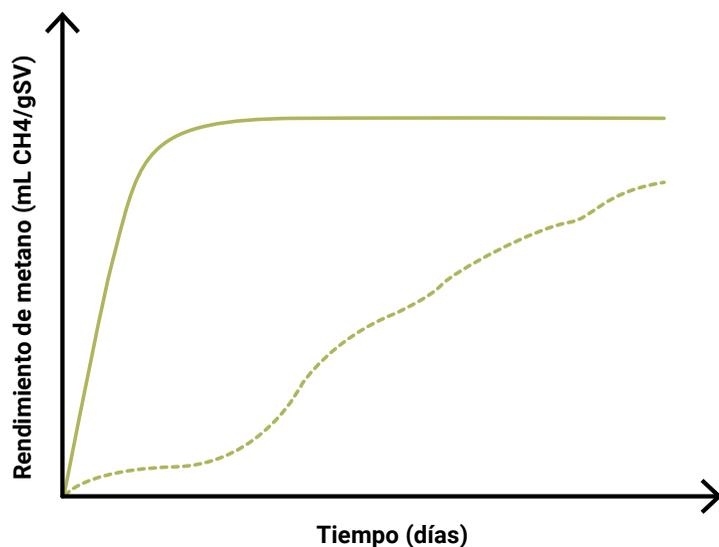
- Incremento monótono de la producción de metano sin pendiente negativa.
- La parte mas empinada de la curva debe estar al inicio de la incubación con una fase de retardo o *lag* muy corta (no mas de unos pocos días), alcanzando una fase estacionaria con una producción de metano mínima.
- Ausencia de ondulaciones en la curva (**Figura 10**).
- Una progresión similar al comportamiento cinético de los modelos de primer orden y tipo Monod. Una fase de retardo extensa con la aplicación del modelo de Gompertz o modelos similares es un fuerte indicador de errores en el diseño y ejecución del experimento.

Cumpliendo con estos criterios de calidad, se podrá elevar el informe con los resultados. El informe debe ser lo más completo posible, indicando no solo los resultados obtenidos sino también las condiciones y diseño experimental del ensayo, ya que pueden ser factores influyentes en el resultado. La duración, las características del sustrato, inóculo y control, las condiciones operativas (temperatura, agitación, volumen efectivo, volumen del *headspace*, relación S/l), los resultados obtenidos del blanco y del control, y los resultados de la muestra de análisis (el PBM, el rendimiento de biogás y sus respec-

tivos gráficos, % de CH₄ y CO₂ y el IB) no deben faltar en el reporte de los resultados de un ensayo de PBM.

Figura 10

Curvas de rendimiento de metano



La línea llena representa la curva normal y la línea punteada representa una curva con comportamiento ondulado que corresponde a un uso inapropiado de relación SI.

Bibliografía

Alduchov, O. A., & Eskridge, R. E. (1996). Improved Magnus form approximation of saturation vapor pressure. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, 35(4), 601–609.

Angelidaki and Sanders. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3, 117–129.

Angelidaki, I, Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & Lier, J. B. Van. (2009). *Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops : a proposed protocol for batch assays*. 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>

Angelidaki, Irini, Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., & Stams, A. J. M. (2011). Biomethanation and its potential. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 494). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>

APHA. (1992). *Metodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales* (17th edn.). American Public Health Association.

Aquino, S. F., Chernicharo, C. A., Foresti, E., & Dos Santos, Maria L. F. Monteggia, L. O. (2007). Methodologies for determining the Specific Methanogenic Activity (SMA) in Anaerobic Sludges. *Eng. Sanit. Ambient*, 12(2), 192–201.

Astals, S., Koch, K., Weinrich, S., Hafner, S. D., Tait, S., & Peces, M. (2020). Impact of storage conditions on the methanogenic activity of anaerobic digestion inocula. *Water (Switzerland)*, 12(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/W12051321>

Badshah, M., Lam, D. M., Liu, J., & Mattiasson, B. (2012). Use of an automatic methane potential test system for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. *Bioresource Technology*, 114, 262–269.

Braun, R., Weiland, P., & Wellinger, A. (2008). Biogas from energy crop digestion. *IEA Bioenergy Task*, 37, 1–20.

Cárdenas Cleves, L. M., Parra Orobio, B. A., Torres Lozada, P., & Vásquez Franco, C. H. (2016). Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos. *Revista Investigación, Optimización y Nuevos Procesos En Ingeniería*, 29(1), 95–108. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016008>

Cho, Y., Young, J., & Moon, H. (2005). Factors affecting measurement of specific methanogenic activity. *Water Science and Technology*, 52(1–2), 435–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2005.0550>

De Vrieze, J., Raport, L., Willems, B., Verbrugge, S., Volcke, E., Meers, E., Angenent, L. T., Boon, N., Vrieze, J. De, Raport, L., Willems, B., Verbrugge, S., Volcke, E., Meers, E., Angenent, L. T., & Boon, N. (2015). Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. *Microbial Biotechnology*, 8(5), 776–786. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12268>

Elbeshbishy, E., Nakhla, G., & Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresource Technology*, 110, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.025>

Fernández Rodríguez, J., Pérez, M., & Romero, L. I. (2012). Mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Optimisation of the semicontinuous process. *Chemical Engineering Journal*, 193–194, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.018>

Filer, J., Ding, H. H., & Chang, S. (2019). Biochemical methane potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. *Water*, 11(5), 921.

Gao, R., Yuan, X., Zhu, W., Wang, X., Chen, S., Cheng, X., & Cui, Z. (2012). Methane yield through anaerobic digestion for various maize varieties in China. *Bioresource Technology*, 118, 611–614.

Graziani, P. (2018). *Economía circular e innovación tecnológica en residuos sólidos. Oportunidades en América Latina* (CAF (ed.); CAF). scioteca.caf.com.

Hafner, S D, Astals, S., Buffiere, P., Løjborg, N., Holliger, C., Koch, K., & Weinrich, S. (2020). *Calculation of methane production from manometric measurements. Standard BMP methods document*. <https://www.dbfz.de/en/bmp>.

Hafner, Sasha D., Astals, S. D., Holliger, C., Koch, K., & Weinrich, S. (2020). *Calculation of Biochemical Methane Potential (BMP). Standard BMP methods*. <https://www.dbfz.de/en/bmp>.

Hansen, T. L., Schmidt, J. E., Angelidaki, I., Marca, E., Jansen, J. L. C., Mosbæk, H., & Christensen, T. H. (2004). Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*, 24(4), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2003.09.009>

Himanshu, H., Voelklein, M. A., Murphy, J. D., Grant, J., & O'Kiely, P. (2017). Factors controlling headspace pressure in a manual manometric BMP method can be used to produce a methane output comparable to AMPTS. *Bioresource Technology*, 238, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.088>

Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515–2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>

Iglesias Jiménez, E., & Pérez García, V. (1992). Relationships between organic carbon and total organic matter in municipal solid wastes and city refuse composts. *Bioresource Technology*, 41(3), 265–272. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90012-M](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90012-M)

Jingura, R. M., & Kamusoko, R. (2017). Methods for determination of biomethane potential of feedstocks: A review. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 573–586. <https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.2.3>

Justesen, C. G., Astals, S., Mortensen, J. R., Thorsen, R., Koch, K., Weinrich, S., Triolo, J. M., & Hafner, S. D. (2019). Development and validation of a low-cost gas density method for measuring biochemical methane potential (BMP). *Water (Switzerland)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/W11122431>

Khan, M. A., Patel, P. G., Ganesh, A. G., Rais, N., Faheem, S. M., & Khan, S. T. (2018). Assessing Methanogenic Archaeal Community in Full Scale Anaerobic Sludge Digester Systems in Dubai, United Arab Emirates. *The Open Microbiology Journal*, 12(1), 123–134. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010123>

Koch, K., Bajón Fernández, Y., & Drewes, J. E. (2015). Influence of headspace flushing on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Bioresource Technology*, 186(February), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.071>

Koch, K., Hafner, S. D., Weinrich, S., & Astals, S. (2019). Identification of Critical Problems in Biochemical Methane Potential (BMP) Tests From Methane Production Curves. *Frontiers in Environmental Science*, 7(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00178>

Koch, K., Lippert, T., & Drewes, J. E. (2017). The role of inoculum's origin on the methane yield of different substrates in biochemical methane potential (BMP) tests. *Biore-source Technology*, 243, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.142>

Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J. M., Junqua, G., & Steyer, J. P. (2010). Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochemistry*, 45(4), 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.018>

Li, C., Nges, I. A., Lu, W., & Wang, H. (2017). Assessment of the degradation efficiency of full-scale biogas plants: A comparative study of degradation indicators. *Bioresource Technology*, 244, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.157>

Li, L., He, Q., Wei, Y., He, Q., & Peng, X. (2014). Early warning indicators for monitoring the process failure of anaerobic digestion system of food waste. *Bioresource Technology*, 171, 491–494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.089>

Møller, H. B., Sommer, S. G., & Ahring, B. K. (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy*, 26(5), 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.008>

Moody, L., Burns, R., Wu-Haan, W., Spajic, R., & Spajić, R. (2009). Use of biochemical methane potential (BMP) assays for predicting and enhancing anaerobic digester performance. *Proceedings of The 4th International and 44th Croatian Symposium of Agriculture*, 930–934. http://sa.agr.hr/pdf/2009/sa2009_p1009.pdf

Nielfa, A., Cano, R., & Fdz-Polanco, M. (2015). Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports*, 5(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.005>

Owen, W. F., Stuckev, D. C., Healv, J. B., Young, L. Y., & Mccagr, P. L. (1979). *Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity*. 13(5).

Raposo, F., Banks, C. J., Siegert, I., Heaven, S., & Borja, R. (2006). Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry*, 41(6), 1444–1450. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.012>

Raposo, F., De La Rubia, M. A., Fernández-Cegrí, V., & Borja, R. (2012). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>

Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., de la Rubia, M. A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J. C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., ... de Wilde, V. (2011). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: Evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(8), 1088–1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>

Rozzi, A., & Remigi, E. (2004). *Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions, a literature review*. 93–115. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-5762-z>

Shayegan, J., Ghavipankeh, F., & Mirjafari, P. (2005). The effect of influent COD and upward flow velocity on the behaviour of sulphate-reducing bacteria. *Process Biochemistry*, 40(7), 2305–2310. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.005>

Souto, T. F., Aquino, S. F., Silva, S. Q., & Chernicharo, C. A. L. (2010). Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation*, 21(3), 411–424. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9311-x>

Strömberg, S., Nistor, M., & Liu, J. (2014). Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*, 34, 1939–1948. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.018>

Strong, P. J., Kalyuzhnaya, M., Silverman, J., & Clarke, W. P. (2016). A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresource Technology*, 215, 314–323.

Symons, G. E., & Buswell, A. M. (1933). The methane fermentation of carbohydrates, 2. *Journal of the American Chemical Society*, 55(5), 2028–2036.

Tabatabaei, M., & Ghanavati, H. (2018). Biogas.Fundamentals, process and operation. In *Biofuel and biorefinery technologies* (p. 471). Springer International Publishing AG. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-77335-3>

Tanimu, M. I., Ghazi, T. I. M., Harun, M. R., & Idris, A. (2014). Effect of Feed Loading on Biogas Methane Production in Batch Mesophilic Anaerobic Digesters Treating Food Waste. In *International Journal of Chemical and Environmental Engineering* (Vol. 5, Issue 1).

V.D.I. (2006). *VDI 4630. Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests*. ICS 13.030.30; 27.190

Valero, D., Montes, J. A., Rico, J. L., & Rico, C. (2016). Influence of headspace pressure on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*, 48, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.012>

Wang, B., Björn, A., Strömberg, S., Nges, I. A., Nistor, M., & Liu, J. (2017). Evaluating the influences of mixing strategies on the Biochemical Methane Potential test. *Journal of Environmental Management*, 185, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.10.044>

Wang, B., Strömberg, S., Li, C., Nges, I. A., Nistor, M., Deng, L., & Liu, J. (2015). Effects of substrate concentration on methane potential and degradation kinetics in batch anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 194, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.034>

Ye, Y., Zamalloa, C., Lin, H., Yan, M., Schmidt, D., & Hu, B. (2015). Evaluation of anaerobic co-digestion of dairy manure with food wastes via bio-methane potential assay and CSTR reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(3), 217–227.

Yilmaz, V. (2015). A straightforward method: Biochemical methane potential assay. *International Conference Renewable Energy Research and Applications (ICRERA 2015)*, 148–150.

Zaman, N. Q. (2010). The Applicability of Batch Tests To Assess Biomethanation Potential of Organic Waste and Assess Scale Up To Continuous Reactor Systems. *PhD Thesis*, 293.

Abreviaturas

AGV: Ácidos grasos volátiles

AME: Actividad metanogénica específica

APHA: *American Public Health Association*

ASTM: *American Society for Testing and Materials*

C:N:P:S: Relación entre Carbono: Nitrógeno: Fósforo: Azufre

C/N: Relación entre el carbono y el nitrógeno

CaCO₃: Carbonato de calcio

CH₄: Metano

CO₂: Dióxido de carbono

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DIN: Deutsches Institut für Normung

DQO: Demanda química de oxígeno

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

FORSU: Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

FTIR: Infrarrojo de transformada de Fourier

H₂S: Acido sulfúrico

IB: Índice de biodegradabilidad

IR: Infrarrojo

ISO: *International Organization for Standardization*

KOH: Hidróxido de potasio

LiOH: Hidróxido de litio

N-NH₃: Nitrógeno amoniacal

NaOH: Hidróxido de sodio

NIR: Infrarrojo cercano

PBM: Potencial bioquímico metanogénico

PBMe: Potencial bioquímico metanogénico experimental

PBMT: Potencial bioquímico metanogénico teórico

PCR: *polymerase chain reaction*

RPM: Revoluciones por minuto

S/I: Relación entre el sustrato y el inóculo

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos volátiles

VDI: Verein Deutscher Ingenieure

El ensayo del Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM) es una herramienta metodológica ampliamente utilizada a nivel mundial para definir la factibilidad técnica de una planta de biogás y para evaluar el potencial energético de las biomásas. A pesar de su importancia, existe una amplia variabilidad metodológica que genera incertidumbres y complejiza la comparación e interpretación de los resultados. En el primer capítulo de este documento se resume la información más actualizada sobre los factores, condiciones operativas y ambientales que influyen y deben ser consideradas durante el desarrollo del ensayo. En el segundo capítulo se ejemplifica el protocolo de este ensayo, utilizando un diseño de reactores anaeróbicos de gran practicidad y reproducibilidad, generados por este grupo de investigadores pertenecientes al Laboratorio de Transformación de Residuos (LTR) de Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del INTA. Este ensayo se viene desarrollando desde el año 2013 y ha permitido obtener resultados confiables y fidedignos, registrándose actualmente más de 30 ensayos con diferentes tipos de residuos sólidos y efluentes orgánicos, sostenidos con reportes científicos, tesis de maestrías y doctorados.

Se espera que este documento le sirva al lector como una guía para poder cuantificar de manera segura el potencial metanogénico de biomásas argentinas y para que a futuro, las autoridades regulatorias puedan normalizar y estandarizar esta metodología a nivel nacional.



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina