



ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**Máster Universitario de Investigación en
Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos**



DEFINICIÓN DE LA METODOLOGÍA DEL TEST DE BIODEGRADABILIDAD BAJO CONDICIONES AEROBIAS



GINA CONDREA RINEANU

2016



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna **D^a. Gina Condrea Rinceanu**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Definición de la metodología del test de biodegradabilidad aerobia o compostabilidad”, bajo la dirección de D^a. Belén Fernández García, debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 19 de julio de 2016

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos

Fdo.: Concepción Paredes Gil

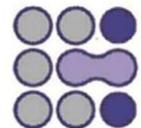


TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:



ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**Máster Universitario de Investigación en
Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos**



DEFINICIÓN DE LA METODOLOGÍA DEL TEST DE BIODEGRADABILIDAD BAJO CONDICIONES AEROBIAS

Vº Bº DIRECTOR

Belén Fernández García

ALUMNO

Gina Condrea Rinceanu

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER

IDENTIFICACIONES:

Autor: Gina Condrea Rinceanu

Título: Definición de la metodología del test de biodegradabilidad bajo condiciones aerobias

Title: Methodology definition of the biodegradability test under aerobic conditions

Director del TFM: Belén Fernández García

Año: 2016

Titulación: Máster Universitario en Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos

Tipo de proyecto: Trabajo final del máster.

Palabras claves: biodegradabilidad, ensayo, producción de CO₂

Keywords: biodegradability, test, CO₂ production

Nº citas bibliográficas: 62

Nº de tablas: 9

Nº de figuras: 15

Nº de anexos: 9

RESUMEN

La principal alternativa de gestión de los residuos plásticos biodegradables es el reciclado o valorización energética mediante tratamiento orgánico. Actualmente la gestión de los bioresiduos en España presenta dos vías de tratamiento principales, el compostaje (condiciones aerobias) y la biometanización (condiciones anaerobias). En el presente estudio se analiza la metodología del test de biodegradabilidad en condiciones aerobias, siguiendo la norma UNE-EN ISO 14855-1:2005. Finalmente, se eligieron dos materiales conocidos, celulosa (reactivo) y un bioplástico comercial (MaterBi), para validar dicha metodología.

ABSTRACT

The main alternative management of biodegradable plastic waste is recycling or energy recovering through organic processing. Currently, the management of bio-waste in Spain has two possible waste processing systems, composting (aerobic conditions) and biomethanization (anaerobic conditions). In this study, the methodology of the biodegradability test under aerobic conditions, following the standard UNE EN ISO 14855-1:2005, was studied. Finally, two known materials, cellulose (reactant) and a commercial bioplastic (MaterBi), were chosen to validate this methodology.



Agradecimientos

Ante todo quiero dar las gracias a mi directora Belén Fernández García por su apoyo y atención en todo momento ya que sin su ayuda no habría podido terminar este trabajo.



ÍNDICE

1.1. Gestión de residuos orgánicos.....	5
1.2. Procesos de estabilización biológica de residuos sólidos orgánicos	6
1.2.1. <i>Compostaje</i>	<i>7</i>
1.2.2. <i>Digestión anaerobia.....</i>	<i>17</i>
1.3. Justificación del trabajo.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Recopilación bibliográfica.....	27
3.2. Métodos analíticos	27
3.2.1. <i>Determinación de sólidos totales y volátiles</i>	<i>27</i>
3.2.2. <i>Determinación de la alcalinidad total, parcial e intermedia.....</i>	<i>28</i>
3.2.3. <i>Determinación de la demanda química de oxígeno.....</i>	<i>28</i>
3.2.4. <i>Determinación de la composición del biogás.....</i>	<i>29</i>
3.2.5. <i>Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total.....</i>	<i>30</i>
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Definiciones	31
4.2. Biodegradación.....	33
4.2.1. <i>Pruebas de biodegradabilidad inmediata</i>	<i>34</i>
4.2.2. <i>Pruebas de biodegradabilidad intrínseca</i>	<i>38</i>
4.2.3. <i>Pruebas de simulación</i>	<i>39</i>
4.2.4. <i>Pruebas de biodegradabilidad en suelos</i>	<i>39</i>
4.3. Métodos estandarizados de biodegradación para materiales sólidos	40
4.3.1. <i>American Society for Testing and Materials (ASTM).....</i>	<i>41</i>
4.3.2. <i>Institute for Standards Research (ISR).....</i>	<i>42</i>
4.3.3. <i>International Standard Organization (ISO).....</i>	<i>43</i>
4.3.4. <i>European Committee for Normalization (CEN)</i>	<i>44</i>
4.3.5. <i>Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)....</i>	<i>44</i>

4.4. Comparación entre normas	46
4.5. Protocolo propuesto	49
4.5.1. <i>Principio del método</i>	49
4.5.2. <i>Materiales, reactivos y equipos</i>	49
4.5.3. <i>Procedimiento</i>	51
4.5.4. <i>Cálculos</i>	54
4.5.5. <i>Expresión e interpretación de los resultados</i>	56
4.5.6. <i>Validez de los resultados</i>	56
4.6. Prueba experimental	56
4.6.1. <i>Materiales</i>	56
4.6.2. <i>Inóculo</i>	57
5. CONCLUSIONES	69
5.1. Revisión bibliográfica	69
5.2. Metodología propuesta	69
5.3. Comprobación experimental	70
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
6.1. Bibliografía científica	72
6.2. Normas consultadas	77
7. ANEXOS	78
7.1. Anexo 1. Determinación del CT	78
7.2. Anexo 2. Determinación del contenido de ST y SV del compost	78
7.3. Anexo 3. Determinación del contenido de ST y SV de la glucosa	79
7.4. Anexo 4. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)	79
7.5. Anexo 5. Medición del CO₂ por cromatografía del Ensayo 1	80
7.6. Anexo 6. Cantidad acumulada de CO₂ en el Ensayo 1	81
7.7. Anexo 7. Valoración alcalinidad en el Ensayo 1	82
7.8. Anexo 8. Medición del CO₂ por cromatografía del Ensayo 2	83
7.9. Anexo 9. Cantidad acumulada de CO₂ en el Ensayo 2	85

Lista de figuras

<i>Figura 1 Esquema básico del proceso de compostaje</i>	9
<i>Figura 2 Fases del proceso de compostaje y las poblaciones microbianas asociados (Casco y Mormeneo, 2008)</i>	11
<i>Figura 3 Valorización de residuos orgánicos</i>	18
<i>Figura 4 Etapas metabólicas para la formación de metano (Gujer y Zehnder, 1983)</i>	19
<i>Figura 5 Cromatógrafo de gases VARIAN CP-3800</i>	29
<i>Figura 6 Material de vidrio y esquema del montaje</i>	50
<i>Figura 7 Glucosa, Celulosa y Mater Bi</i>	57
<i>Figura 8 Imagen del compost sin tamizar (izquierda) y tamizado (derecha)</i>	58
<i>Figura 9 Esquema del montaje por material y prueba de aireación con agua</i>	59
<i>Figura 10 Vistas lateral y frontal del montaje</i>	60
<i>Figura 11 Valoración con HCl 1,2 M y FNA</i>	61
<i>Figura 12 Incidencia en el seguimiento</i>	61
<i>Figura 13 Ensayo 1: evolución del carbono total de la glucosa (C-in) mineralizado</i>	63
<i>Figura 14 Ensayo 2: montaje e incidencia en el seguimiento (cristalización de sosa)</i> .66	
<i>Figura 15 Ensayo 2: evolución del CO₂ producido (arriba) y del carbono total de la celulosa y Mater B (C-in) mineralizado (abajo)</i>	66

Lista de tablas

<i>Tabla 1 Pruebas de biodegradabilidad normalizadas o en curso de normalización propuestas por la OCDE, así como su correspondencia con pruebas ISO, US-EPA y ECB.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 2 Comparación de las condiciones de los ensayos de biodegradabilidad</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 3 Caracterización de los inóculos y de los materiales a estudiar.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 4 Ensayo 1: cantidades utilizadas para realizar el ensayo 1 (glucosa).....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 5 Ensayo 1: cantidad de CO₂ total.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 6 Ensayo 1: biodegradabilidad en función del ratio inóculo - material.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 7 Ensayo 2: cantidades utilizadas</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 8 Ensayo 2: biodegradabilidad en función del ratio inóculo - material.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 9 Ensayo 2: cálculo del CO₂ total.....</i>	<i>67</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gestión de residuos orgánicos

Los residuos y subproductos orgánicos de los diferentes procesos de producción y consumo son un recurso valioso como fuente de energía renovable, materia orgánica y nutrientes para el suelo, o bien como materia prima para la producción de nuevos productos orgánicos valorizables en el mercado. La variabilidad de la generación de residuos orgánicos hace que su correcto manejo sea de vital importancia para evitar incidencias en el medio ambiente en general, y para el sistema suelo-planta en particular. Es importante considerar que sin un adecuado control, uso y optimización de su uso en función de criterios científicos, estos residuos pueden constituir un vector de contaminación y como consecuencia, degradar los sistemas agrícolas u otros compartimentos naturales (ríos, costas, etc.).

En la actualidad, se da mucha importancia a la minimización de materia orgánica biodegradable que se deposita en los vertederos, siendo ésta uno de los principales objetivos dentro de la política europea de gestión de residuos. La Directiva 1999/31/CE (DOCE, 1999), relativa al vertido de residuos, es muy explícita en este sentido y programa la reducción gradual y obligatoria de residuos biodegradables que entran en vertederos: el valor de reducción de residuos biodegradables generados (año 1995) esperado es de 75% a los 5 años, 50% a los 8 años y 35% a los 15 años, según la transposición de la Directiva a las legislaciones estatales¹.

Para hacer posible el cumplimiento de este objetivo, se debe por tanto reciclar, recuperar, transformar o eliminar parte de esta materia orgánica biodegradable. Los procesos con la finalidad de reducir la materia orgánica biodegradable en cualquier tipología de residuo orgánico, de forma genérica son (European Commission, 2000; 2001): el compostaje, la digestión anaerobia (mesofílica o termofílica), la combinación de digestión anaerobia y compostaje, o la desnitrificación.

¹ Esta directiva europea se ha traspuesto mediante el Real Decreto 1481/2001 (BOE, 2002).

Por tanto, se pueden plantear tres estrategias genéricas para minimizar la cantidad de residuos biodegradables depositados en vertederos: 1) transformación para mejorar la calidad y reciclaje en sistemas agrarios, mediante un proceso combinado de digestión anaerobia y compostaje; 2) transformación para reducir materia orgánica y aislamiento en vertedero, mediante un tratamiento mecánico-biológico; 3) incineración y aislamiento de cenizas. Los costes asociados a estas estrategias dependen del equilibrio entre el diseño tecnológico y los aspectos de la gestión y recogida.

La transformación y reciclaje de residuos orgánicos frescos en agricultura presenta diferentes inconvenientes, como fitotoxicidad (por compuestos orgánicos, elementos y sustancias minerales, etc.), la inmovilización de nitrógeno y deficiencia de oxígeno a nivel de las raíces de la planta o la elevación excesiva de la temperatura en la zona de la rizosfera, entre otros (Abad et al., 1997). Por tanto, se hace necesario un tratamiento que minimice estos inconvenientes.

El compostaje o la digestión anaerobia permiten la estabilización de residuos orgánicos frescos mediante un proceso de biodegradación, mediante el cual los microorganismos transforman los compuestos orgánicos en productos menos tóxicos que los compuestos originales.

1.2. Procesos de estabilización biológica de residuos sólidos orgánicos

Los ensayos que se emplean para la determinación de la biodegradabilidad tienen en cuenta los factores ambientales que favorecen la descomposición biológica en medios aerobios y anaerobios. Por ello, el conocimiento de dichos factores es fundamental para evaluar las normas existentes. En este apartado, se presentan las condiciones ideales que favorecen los procesos de compostaje y de digestión anaerobia.

1.2.1. Compostaje

Entre los diferentes métodos de adecuación de los residuos sólidos orgánicos para fines agrícolas destaca el **compostaje** (Abad y Puchades, 2002; Climent et al., 1996), tanto desde el punto de vista ecológico como económico (Raviv, 1998): al mismo tiempo que colabora en la gestión de los residuos sólidos, el compostaje es el sistema que más respeta el ciclo de conservación de la materia y el que mayor aplicación encuentra en agricultura (Soliva, 2001). Entre los beneficios del compostaje se incluyen:

- Acondicionamiento del suelo. La utilización del compost como enmienda orgánica o producto restituidor de materia orgánica en los terrenos de labor tiene un gran potencial e interés en nuestro país, ya que la presencia de dicha materia orgánica en el suelo en proporciones adecuadas es fundamental para asegurar la fertilidad y evitar la desertización. Además, la materia orgánica en el suelo produce una serie de efectos de repercusión agro-biológica muy favorable.
- Mejora las propiedades físicas del suelo. La materia orgánica contribuye favorablemente a mejorar la estabilidad de la estructura de los agregados del suelo agrícola (serán más permeables los suelos pesados y más compactos los ligeros), aumenta la permeabilidad hídrica y gaseosa, y contribuye a aumentar la capacidad de retención hídrica del suelo mediante la formación de agregados.
- Mejora las propiedades químicas. La materia orgánica aporta macronutrientes N, P, K y micronutrientes, y mejora la capacidad de intercambio de cationes del suelo. Esta propiedad consiste en absorber los nutrientes catiónicos del suelo, poniéndolos más adelante a disposición de las plantas, evitándose de esta forma la lixiviación. Por otra parte, los compuestos húmicos presentes en la materia orgánica forman complejos y quelatos estables, aumentando la posibilidad de ser asimilados por las plantas.
- Mejora la actividad biológica del suelo. La materia orgánica del suelo actúa como fuente de energía y nutrición para los microorganismos presentes en el suelo. Estos viven a expensas del humus y contribuyen a su mineralización. Una población microbiana activa es índice de fertilidad de un suelo.

- Facilita el manejo de estiércoles. El compostaje reduce el peso, el volumen, el contenido en humedad, y la actividad de los estiércoles. El compost es mucho más fácil de manejar que los estiércoles, y se almacena sin problemas de olores o de insectos y puede ser aplicado en cualquier época del año. Esto minimiza las pérdidas de nitrógeno y el impacto ambiental en el campo.

En la actualidad, el compostaje es un proceso tecnológico industrializado, sin un grado de complejidad excesivo, técnico y económicamente viable, poco contaminante y con mayor aceptación social, en comparación con los vertederos o las plantas incineradoras. El compostaje es una técnica de estabilización de residuos orgánicos (RO) que tiene interés en el aprovechamiento de residuos y subproductos de distintas actividades como sustratos y hoy por hoy presenta un interés especial por diferentes razones: fuerte demanda de sustratos y variados; problemática derivada de la importación de materiales como la turba; necesidad de proteger ciertos recursos; problemas de rentabilidad y competitividad; elevada producción de residuos y subproductos; costo elevados de vertederos y de los sistemas de tratamientos.

El proceso de compostaje es un proceso natural de descomposición en condiciones aerobias (Figura 1). En este proceso, un conjunto de poblaciones microbianas formadas por bacterias, hongos y otros microorganismos, se suceden transformando los sustratos contenidos inicialmente en CO₂, H₂O, energía en forma de calor (Golueke, 1972) y compuestos complejos meta-estables, principalmente sustancias húmicas (Haung, 1993), para dar un producto final denominado “compost” que se puede definir como un material estable, maduro y humificado.

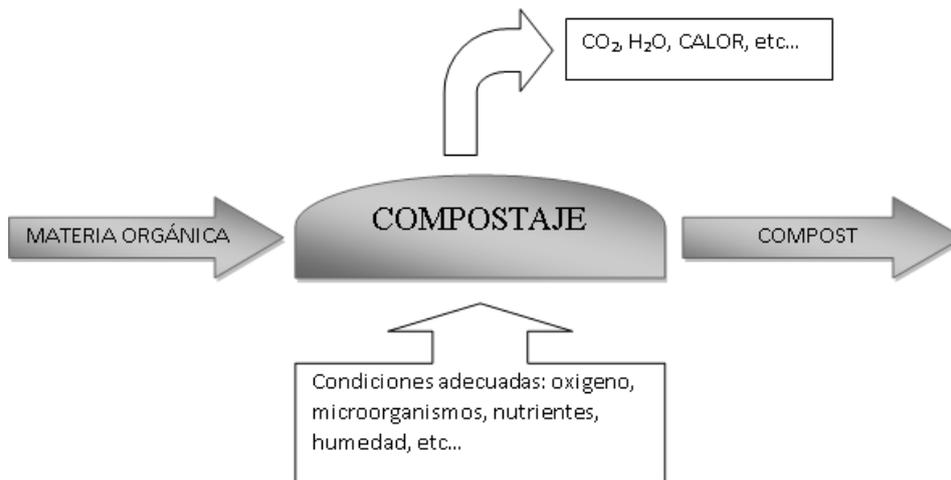


Figura 1 Esquema básico del proceso de compostaje

Los principales objetivos del proceso de compostaje son (i) la reducción del volumen del residuo; (ii) la eliminación de organismos patógenos; (iii) la formación de un producto final estabilizado, libre de olores que pueda ser empleado para aplicación en suelos como enmienda orgánica, fertilizante, etc. Según el RD 506/2013, el “compost” es un “producto higienizado y estabilizado, obtenido mediante descomposición biológica aeróbica (incluyendo fase termófila), bajo condiciones controladas, de materiales orgánicos biodegradables recogidos separadamente”.

La dinámica del proceso de compostaje es compleja. Esta complejidad está fundamentada principalmente en las variaciones existentes a lo largo del proceso en las poblaciones microbianas, el pH, la temperatura, la humedad, la disponibilidad de sustratos, el oxígeno, etc. Para un adecuado desarrollo del proceso de compostaje es necesario garantizar que las condiciones de operación se mantengan en los intervalos óptimos, ya que de otro modo no podría alcanzarse el rendimiento deseado en el proceso ni la calidad en el compost final. Al ser el compostaje un proceso biológico, las condiciones de operación óptimas son aquellas que permiten el adecuado desarrollo de los microorganismos implicados en compostaje.

Condiciones para el proceso de compostaje

Las variables que controlan el proceso de compostaje pueden clasificarse en tres grupos: físicas, químicas y biológicas. Entre las variables físicas, destacan la temperatura, la humedad y el tamaño de partícula que condicionará, entre otros aspectos, la porosidad y el espacio de aire libre en el seno de la matriz de compost. Entre las químicas, destacan la relación C/N, el pH y la disponibilidad de oxígeno. Entre las biológicas, los dos factores más importantes son la presencia de microorganismos capaces de realizar el proceso de compostaje y la biodegradabilidad de los residuos. El valor de estas variables dependerá en gran medida de las condiciones ambientales, del tipo de residuo compostado y del sistema de operación empleado para realizar el compostaje. Todas estas variables, también se clasifican en dos tipos, parámetros de seguimiento y los relativos a la naturaleza del sustrato.

Los parámetros de seguimiento son aquellos que han de ser medidos y controlados durante cada fase del proceso. Entre estos parámetros, se incluyen: temperatura, humedad, pH, aireación y espacio de aire libre (Bueno-Marquez y col., 2008).

- Temperatura

En relación a la temperatura, los materiales iniciales a se encuentran a la misma temperatura hasta que da comienzo la actividad microbiana, donde los microorganismos generan calor aumentando la temperatura del material del sistema. Por ello, la temperatura es considerada la variable fundamental en el control del compostaje. De este modo, pequeñas variaciones de temperatura afectan más a la actividad microbiana que pequeños cambios en la humedad, pH o C/N (Liang y col., 2003; Miyatake y col., 2006).

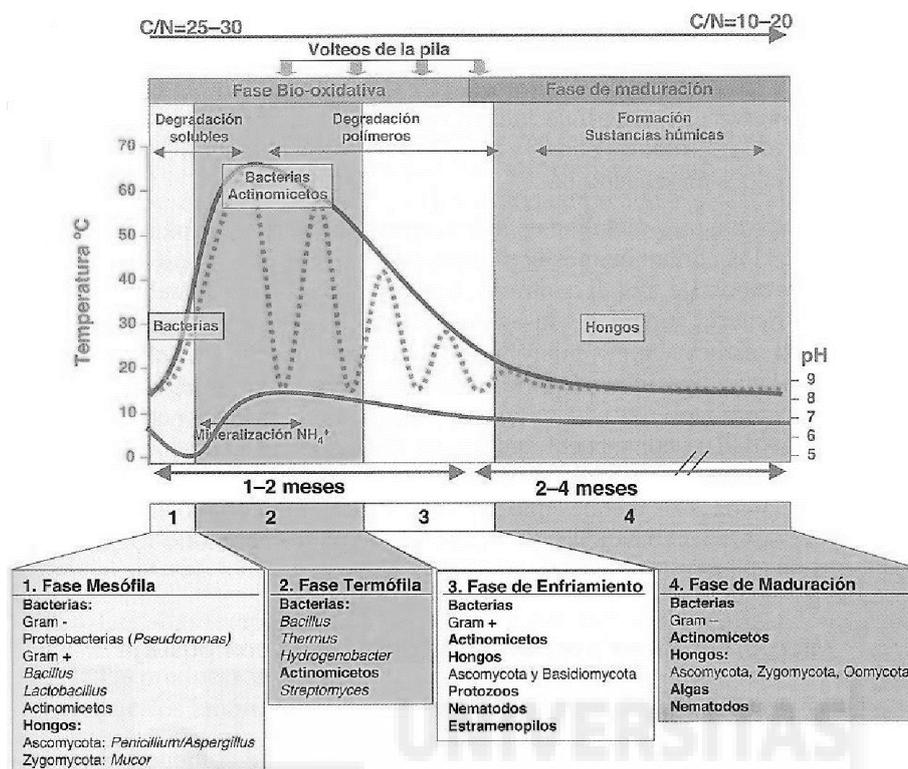


Figura 2 Fases del proceso de compostaje y las poblaciones microbianas asociados (Casco y Mormeneo, 2008)

Por la evolución de la temperatura se puede juzgar la eficiencia y el grado de estabilización a que ha llegado el proceso, ya que existe una relación directa entre la temperatura y magnitud de la degradación de la materia orgánica. Asimismo, existe una relación directa entre la degradación y el tiempo durante el cual la temperatura ha sido alta. Se observan tres fases en el proceso de descomposición aeróbica (Figura 2): fase mesófila inicial ($T < 45^{\circ}\text{C}$), al final de la cual se producen ácidos orgánicos; fase termófila ($T > 45^{\circ}\text{C}$); y fase mesófila final, considerándose finalizado el proceso cuando se alcanza de nuevo la temperatura inicial (Chen e Inbar (1993).

Cada especie de microorganismo tiene un intervalo de temperatura óptima en el que su actividad es mayor y más efectiva: $15-40^{\circ}\text{C}$ para microorganismos mesófilos y $40-70^{\circ}\text{C}$ para los termófilos (Moreno Casco y Mormeneo, 2008). En cada fase del proceso, los microorganismos, para los que esa temperatura sea óptima para su desarrollo, serán los encargados de la descomposición de la materia orgánica del residuo:

- Fase inicial o mesofílica, donde la pila está a temperatura ambiente y comienzan a desarrollarse las bacterias y hongos mesófilos, que descomponen los carbohidratos y proteínas más fácilmente degradables. A temperaturas superiores a 40°C, la actividad mesofílica cesa y la degradación entra en la fase termófila.
- Fase termofílica, durante la cual los microorganismos son reemplazados por los actinomicetos, los hongos y bacterias termofílicas, las cuales degradan las proteínas y los carbohidratos no celulósicos y posiblemente los lípidos y la hemicelulosa, pero no atacan la celulosa ni la lignina.
- Fase de enfriamiento, caracterizada por una caída de la temperatura y de la velocidad de descomposición y una recolonización de la masa por microorganismos mesófilos, los cuales llevarán a cabo la degradación de azúcares, hemicelulosa y celulosa. Estas tres fases constituyen lo que se denominada fase biooxidativa del proceso de compostaje.
- Fase de maduración, donde se producirá predominantemente la estabilización y también una cierta mineralización de la materia orgánica con la producción de un producto final altamente humificado.

- pH

En relación con el pH, éste tiene una influencia directa en el compostaje debido a su acción sobre la dinámica de los procesos microbianos. Mediante el seguimiento del pH se puede obtener una medida indirecta del control de la aireación de la mezcla, ya que si en algún momento se crean condiciones anaerobias se liberan ácidos orgánicos que provocan el descenso del pH.

Según algunos autores la evolución del pH en el compostaje presenta tres fases. Durante la fase mesófila inicial se observa una disminución del pH debido a la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica más lábil, produciendo una liberación de ácidos orgánicos. Eventualmente esta bajada inicial del pH puede ser pronunciada si existen condiciones anaeróbicas, pues se formará aún más cantidad de ácidos orgánicos. En una segunda fase se produce una progresiva alcalinización del medio, debido a la

perdida de los ácidos orgánicos y la generación de amoníaco procedente de la descomposición de las proteínas (Sanchez-Monedero, 2001). Y por último, en la tercera fase el pH tiende a la neutralidad debido a la formación de compuestos húmicos que tienen propiedades tampón (Figura 3).

Suler et al., (1977) establecieron una relación entre los cambios de pH y la aireación de la mezcla, concluyendo que un compostaje con la aireación adecuada conduce a productos finales con un pH entre 7 y 8; valores más bajos del pH son indicativos de fenómenos anaeróbicos y de que el material aún no está maduro. Posteriormente, estos mismos autores estudiaron las relaciones pH-aireación-microorganismos existentes en el proceso dedujeron que la degradación orgánica se inhibe a pH bajos, por lo que si el pH se mantiene por encima de 7.5 durante el proceso es síntoma de una buena descomposición.

- Humedad

El compostaje es un proceso biológico de descomposición de materia orgánica en el que la presencia de agua es imprescindible para las necesidades fisiológicas de la fauna microbiana gracias a que es el medio de transporte de las sustancias solubles que sirven de alimento a las células y de los productos de desecho de las reacciones que tienen lugar durante el proceso. También, es considerada por algunos autores como la variable más importante del proceso de compostaje (Haung, 1993; Madejón y col., 2002).

La humedad de la masa de compostaje debe ser tal que el agua no llegue a ocupar totalmente los poros de la masa (Miyatake y col., 2006), para que permita la circulación tanto del oxígeno (proceso aerobio) como de otros gases producidos en la reacción. El rango óptimo para el crecimiento microbiano está entre el 50-70%; la actividad decrece mucho cuando la humedad está por debajo del 30%; por encima del 70% el agua desplaza al aire en los espacios libres existentes entre las partículas, reduciendo la transferencia de oxígeno produciéndose una anaerobiosis, la cual origina malos olores y afecta a la velocidad del proceso disminuyéndola.

Este exceso de humedad puede ser reducido aumentando la aireación (Haug, 1993). Por ello, con un buen control de la humedad y de la aireación puede llevarse a cabo el control de la temperatura debido a que durante el proceso de compostaje se debe llegar a un equilibrio entre los huecos de partículas que se pueden llenar de aire o de agua.

- Aireación

Para el correcto desarrollo del compostaje es necesario asegurar la presencia de oxígeno, ya que los microorganismos que intervienen son aerobios. Las pilas de compostaje presentan porcentajes variables de oxígeno en el aire de sus espacios libres: la parte más externa contiene casi tanto oxígeno como el aire (18-20%); hacia el interior el contenido de oxígeno va disminuyendo, mientras que el dióxido de carbono va aumentando hasta el punto de que a una profundidad mayor de 60 cm el contenido de oxígeno puede estar entre 0,5 y 2% (Ekinci y col., 2004).

Una aireación insuficiente provoca una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente retardo en la descomposición, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores (Bidlingmaier, 1996). El exceso de ventilación podría provocar el enfriamiento de la masa y una alta desecación con la consiguiente reducción de la actividad metabólica de los microorganismos (ZHu, 2006).

- Espacio libre de aire

Siendo el compostaje un proceso biológico de descomposición de la materia orgánica, la presencia de agua es imprescindible para satisfacer las necesidades fisiológicas de los microorganismos, ya que el agua es el medio de transporte tanto de las sustancias que sirven de alimento a las células, como de los productos de deshechos de la reacción (Hoitinky col. 1995). La humedad (contenido en agua) de la masa de compostaje debe ser tal que el agua no llegue a ocupar totalmente los poros de dicha masa y permita la circulación tanto del oxígeno (ya que el proceso debe desarrollarse en condiciones aeróbicas), como de otros gases producidos en la reacción.

Los parámetros relativos a la naturaleza del sustrato son aquellos que han de ser medidos y adecuados a sus valores correctos fundamentalmente al inicio del proceso

(Madejón y col. 2001). Entre los parámetros considerados relativos a la naturaleza del sustrato están: tamaño de partícula, relación C/N y C/P, nutrientes, materia orgánica y conductividad eléctrica.

- Tamaño de partícula

El tamaño inicial de las partículas que componen la masa a compostar es una importante variable para la optimización del proceso, ya que cuanto mayor sea la superficie expuesta al ataque microbiano por unidad de masa, más rápida y completa será la aireación. Por lo tanto, el desmenuzamiento del material facilita el ataque de los microorganismos y aumenta la velocidad del proceso. Pero si se reduce en exceso el espacio entre partículas, aumenta las fuerzas de fricción (Haug, 1993), limitando la difusión de oxígeno hacia el interior y de dióxido de carbono hacia el exterior, lo cual puede ocasionar un colapso microbiano.

- Relación C/N

El equilibrio de nutrientes y biopolímeros en la mezcla inicial debe cuidarse para ajustar la nutrición de los microorganismos y dar las condiciones físicas y físico químicas necesarias en la matriz. La relación C/N es uno de los parámetros más utilizados para valorar este equilibrio.

Los materiales carbonados tienen tres funciones: constituyentes de los materiales celulares, participantes activos en el metabolismo energético, presentan unas características importantes como estructurantes y como base de la formación de moléculas estabilizadas parecidas a las sustancias húmicas. El carbono sirve como fuente de energía, “quemándose” y transformando el dióxido de carbono pero además forma parte del protoplasma de las nuevas células; así es necesaria una mayor proporción de C que de N. Los organismos utilizan 2/3 del C para la obtención de energía (respiración) y solo combinan una tercera parte con el N para la formación de nuevas células. La actividad biológica se reduce si el material contiene mucho más C que N. Cuando el material a tratar presenta un exceso de N, éste es “eliminado” en forma de amoníaco, lo que debería evitarse, por una parte aparecen problemas de olores

desagradables y contaminación y por otra, el producto final habrá perdido parte de un nutriente importante.

El nitrógeno es fundamentalmente un constituyente de los materiales celulares, puede participar en el intercambio de electrones en el metabolismo energético.

Para un correcto compostaje se recomienda siempre una relación C/N inicial al entorno de 30, el intervalo óptimo es de 25-35 (Jhorar et al., 1991). Cuando la relación C/N es superior a 35, el proceso se ralentiza por falta de nitrógeno disponible (el crecimiento está limitado por falta de nutrientes) y las bacterias deberán esperar la lisis de parte de ellas para poder disponer de nitrógeno metabolizable de nuevo. Cuando la relación C/N es inferior a 25, el nitrógeno está presente en exceso, y no existe ralentización del proceso por este motivo, aunque la probabilidad de pérdida de nitrógeno en forma de amoníaco en los gases emitidos es elevada.

La relación C/N para un compost totalmente maduro es cercana a 10, al igual que la del humus, considerándose con C/N <20, que el compost ya es suficientemente estable o maduro.

- Nutrientes

La utilidad agronómica de los residuos con posibilidad de ser compostados está en función de la disponibilidad de los elementos nutritivos que posean (Kiehl, 1985). Los microorganismos solo pueden aprovechar compuestos simples, por lo que las moléculas más complejas se rompen en otras más sencillas para poder ser asimilables (Castaldi y col., 2005).

Entre los elementos que componen el sustrato destacan el C, N, y P, que son macronutrientes necesarios para el desarrollo microbiano. Se comprueba que, en general, entre el inicio y el final de compostaje se produce un aumento de las concentraciones de distintos nutrientes, debido a la pérdida de materia orgánica de la masa a compostar (Díaz y col., 2004. Michel y col., 2004). Además de C, N y P existen otros nutrientes presentes en menor cantidad (micronutrientes). Estos tienen un papel

importante en la síntesis de las enzimas, en el metabolismo de los microorganismos y en los mecanismos de transporte intra y extracelular (Miyatake y col., 2006).

- Materia orgánica

Durante el proceso de compostaje, las pérdidas de materia orgánica pueden alcanzar el 30%, medido como materia total. La mayoría de estas pérdidas es materia orgánica “volátil”, que corresponden a sustancias ricas en carbono. Estas pérdidas se producen en la primera fase de fermentación, que es la fase más activa, y no durante el periodo de altas temperaturas.

1.2.2. Digestión anaerobia

Otro proceso de valorización que más se está desarrollando en los últimos años a nivel europeo e internacional de residuos orgánicos es la digestión anaerobia o **biometanización**. A través del mismo, se consigue, en ausencia de oxígeno, degradar y estabilizar la fracción orgánica presente en los residuos, por medio de la acción de microorganismos específicos en un digestor anaerobio. Las ventajas de la digestión anaerobia son:

- Logra una gestión continua, sostenible y eficiente de los residuos agro-ganaderos y agro-industriales.
- Producción de biogás, un biocombustible a partir del cual se obtiene energía eléctrica y térmica de carácter renovable para abastecer el propio proceso (Figura 3).
- Producción de digestato, biofertilizante estabilizado, de olor reducido y rico en nutrientes, sustituto de los actuales fertilizantes inorgánicos.
- Reducción del volumen de residuos orgánicos enviados a vertedero.
- Contribuye a la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero al evitar la emisión incontrolada de metano a la atmósfera, por los procesos de degradación natural.
- Contribuye a la mejora de la calidad de los suelos y a prevenir la contaminación de acuíferos, puesto que evita que los residuos líquidos sean dispersados sin control en el terreno.

- Disminuye las molestias a la comunidad producidas por los malos olores asociados a estos residuos.

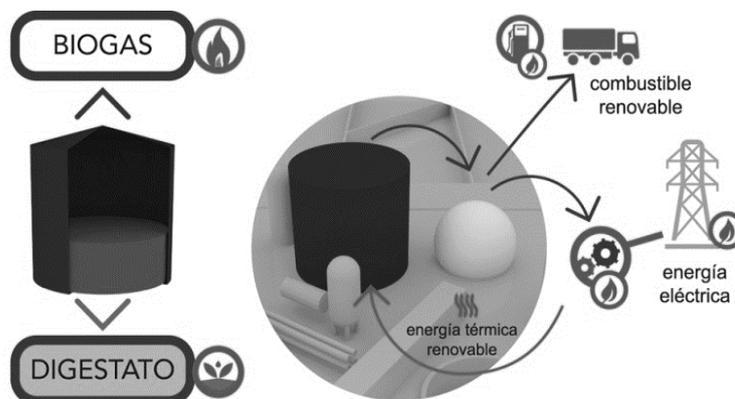


Figura 3 Valorización de residuos orgánicos

Como resultado del proceso de digestión anaerobia se obtiene biogás y digestato. El biogás, debido a su alto contenido en metano (CH_4), entre un 50-70%, supone un combustible renovable idóneo para su empleo en motores de co-generación, obteniendo energía eléctrica y térmica empleadas en la propia instalación, y cuyo excedente es vertido a la red. Por otro lado, el digestato, mezcla de productos minerales tales como N, P, K, Ca, etc., y de compuestos orgánicos y formas minerales estabilizados y mucho mejor asimilables por los cultivos, constituye, tanto en fase sólida como líquida, un biofertilizante, o fertilizante orgánico, de gran calidad, sustituto de los fertilizantes inorgánicos y químicos convencionales.

La digestión anaerobia es el tratamiento biológico de la materia orgánica mediante la acción de bacterias específicas en ausencia de oxígeno. La materia orgánica se descompone en biogás, principalmente CH_4 y CO_2 , ambos productos con un valor energético considerable. El objetivo de la digestión es reducir la materia orgánica (sólidos volátiles), y como consecuencia, el material se estabiliza y su volumen se

reduce. Por otra parte, a través del proceso de digestión se eliminan gran parte de los gérmenes patógenos.

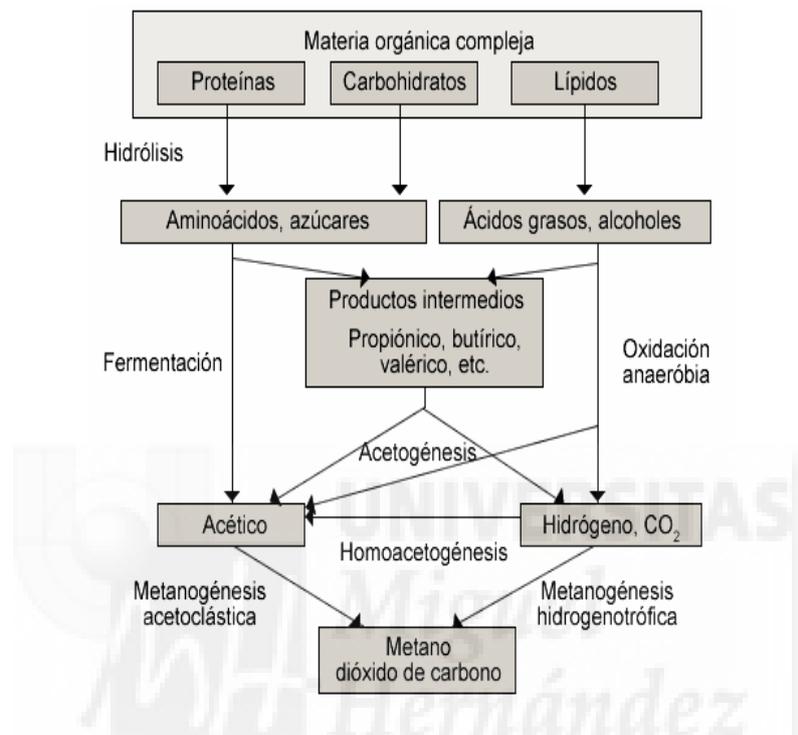


Figura 4 Etapas metabólicas para la formación de metano (Gujer y Zehnder, 1983)

La degradación anaeróbica es un proceso complejo en el que intervienen diferentes grupos microbianos, de manera coordinada y secuencial, para transformar la materia orgánica presente en los lodos hasta los productos finales del proceso (Figura 4). Las etapas que componen el proceso de digestión anaeróbica son:

- Hidrólisis, o transformación de la materia orgánica polimérica en compuestos solubles o monómeros; es llevada a cabo por la acción de enzimas extracelulares producidas por microorganismos hidrolíticos. Es el paso inicial para la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos, ya que los microorganismos involucrados en el proceso de biometanización únicamente pueden utilizar materia orgánica soluble que pueda atravesar su membrana celular. La hidrólisis depende de la temperatura, tiempo de retención hidráulico,

composición del sustrato (lignina, carbohidratos, proteínas, grasas), tamaño de partículas, pH, concentración de amonio y concentración de los productos de la hidrólisis (Martí, 2006).

Las proteínas son hidrolizadas en péptidos y aminoácidos por la acción de enzimas proteolíticas llamadas proteasas. Parte de estos aminoácidos son utilizados directamente en la síntesis de nuevo material celular y el resto son degradados a ácidos orgánicos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro en etapas posteriores del proceso (Martí, 2006). La degradación de los lípidos en ambientes anaerobios comienza con la ruptura de las grasas por la acción de enzimas hidrolíticas denominadas lipasas, produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol. Por último, la velocidad de degradación de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) es tan lenta que suele ser la etapa limitante del proceso de hidrólisis de dichos materiales. Ello se debe a que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaerobios y además, bajo condiciones anaerobias, se transforma en compuestos fenólicos que son conocidos agentes antimicrobianos, afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, de la hemicelulosa y de otros hidratos de carbono. Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son celobiosa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos.

- Fase fermentativa o acidogénica, en la que los compuestos orgánicos sencillos generados en la etapa anterior son utilizados por las bacterias generadoras de ácidos. Como resultado se produce su conversión en ácidos orgánicos volátiles (acetato, propionato, butirato, etc.), alcoholes y otros subproductos importantes para etapas posteriores (amoníaco, hidrógeno y dióxido de carbono). Esta etapa la pueden llevar a cabo bacterias anaeróbicas o facultativas.
- Fase acetogénica, en la que algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos (hidrógeno y ácido acético), otros (etanol, ácidos orgánicos volátiles de cadena más larga y

algunos compuestos aromáticos) deben ser transformados en productos más sencillos, tales como acetato e hidrógeno, mediante la acción de las bacterias acetogénicas (Garrity et al., 2007). Un tipo especial de microorganismos acetogénicos son los llamados homoacetogénicos, que son capaces de crecer heterotróficamente en presencia de azúcares o compuestos monocarbonados (como la mezcla H_2/CO_2), produciendo como único producto acetato. El resultado neto del metabolismo homoacetogénico permite mantener bajas presiones parciales de hidrógeno y, por tanto, permite la actividad de las bacterias acidogénicas y acetogénicas (Garrity et al., 2007; Nähle, 1987).

- Fase metanogénica, en la que los microorganismos metanogénicos completan el proceso de digestión anaerobia mediante la formación de metano a partir de sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente (acetato, formiato, metanol, metilaminas), hidrógeno y dióxido de carbono. La obtención de metano puede realizarse principalmente mediante dos rutas metabólicas, la acetoclástica (utilizan acético como sustrato) y la hidrogenófila (utilizan hidrógeno y dióxido de carbono). Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del dominio Archaea y presentan unas características comunes que los diferencian del resto de los microorganismos procariontes, tanto en su bioquímica como en su historia evolutiva (Martí, 2006; Siles, 2010).

Condiciones para el proceso de digestión anaerobia

Las variables más importantes que afectan a los sistemas de digestión anaerobia pueden ser clasificados como parámetros de control y relativos a la naturaleza del sustrato.

- Temperatura

Existen tres rangos de temperatura en los que pueden desarrollarse los microorganismos anaerobios: psicrófilo (por debajo de 25°C), mesófilo (entre 25°C y 45°C) y termófilo (entre 45°C y 65°C). Está ampliamente reconocido que las temperaturas óptimas para cada rango son aproximadamente 20°C, 35°C y 55°C para las condiciones psicrófilas,

mesófilas y termófilas, respectivamente. El rango mesófilo de operación es el más utilizado, a pesar de que en la actualidad se está utilizando cada vez más el rango termófilo para conseguir una mayor velocidad de tratamiento (lo que en algunos casos implica un aumento en la eliminación de materia orgánica y en la producción de biogás) y una mejor eliminación de microorganismos patógenos. Sin embargo, el régimen termófilo suele ser más inestable a cualquier cambio de las condiciones de operación y presenta además mayores problemas de inhibición por la mayor toxicidad de determinados compuestos a elevadas temperaturas, como el nitrógeno amoniacal o los ácidos grasos de cadena larga (Chen et al., 2008).

- pH y alcalinidad

Los diferentes grupos bacterianos presentes en el proceso de digestión anaerobia presentan unos niveles de actividad óptimos para valores de pH próximos a la neutralidad: fermentativos, entre 7,2 - 7,4; acetogénicos, entre 7,0 - 7,2; metanogénicos, entre 6,5 - 7,5. De forma general, para que el proceso se desarrolle satisfactoriamente, el pH no debería exceder los límites de 7-8 (Wheatley, 1990).

El pH es una de las variables utilizadas en el diagnóstico de los sistemas anaerobios ya que muchos fenómenos tienen influencia sobre el mismo. Un ejemplo de ello, son las situaciones de acidificación de un reactor anaerobio provocadas por desequilibrios en la producción y consumo de ácidos orgánicos volátiles. La acumulación de éstos provoca un descenso en el pH, que será más o menos acusado en función de la alcalinidad del medio. Una de las consecuencias derivadas de un descenso del pH a valores inferiores a 6 es que el biogás generado es muy pobre en metano y, por tanto, presenta peores cualidades energéticas.

Por otra parte, el pH afecta a los diferentes equilibrios químicos existentes en el medio, pudiendo desplazarlos hacia la formación de un determinado componente que tenga influencia en el proceso. Éste es el caso de los equilibrios ácido-base del ácido acético y del amoníaco: al aumentar el pH se favorece la formación de amoníaco libre que, a elevadas concentraciones, es inhibidor del crecimiento microbiano y a pH bajos se genera mayoritariamente la forma no ionizada del ácido acético, que inhibe el

mecanismo de degradación del propionato. En este sentido la alcalinidad, que es una medida de la capacidad tampón del medio, es otra variable fundamental a tener en cuenta para el correcto desarrollo del proceso de digestión anaerobia. En el rango de pH de la biometanización, el principal equilibrio que controla la alcalinidad es el del dióxido de carbono/bicarbonato. Se considera que valores de alcalinidad superiores a 2.500 mgCaCO₃/L, aseguran un buen control del pH y una adecuada estabilidad del sistema, si bien no son recomendables valores excesivos.

- Nutrientes

Una de las ventajas de los procesos de digestión anaerobia frente a los procesos aerobios es el bajo requerimiento de nutrientes, derivado de los bajos índices de producción de biomasa que presentan los microorganismos anaerobios. Los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de dichos microorganismos son carbono, nitrógeno y fósforo, además de una serie de elementos minerales como S, K, Na, Ca, Mg y Fe, que deben estar presentes a nivel de trazas. Según Amatya (1996) y Aiyuk et al. (2004), la proporción recomendable entre DQO, nitrógeno y fósforo es de 300:5:1, respectivamente, para el adecuado arranque de los reactores anaerobios si bien el ratio óptimo, para el correcto funcionamiento del reactor durante el tratamiento de residuos puede variar entre 50:4:1 y 350:5:1, (Thaveesri, 1995; Brunetti et al., 1983). En el caso de que el residuo a tratar presente un balance de nutrientes alejado de estas proporciones, se puede proponer su co-digestión con otro sustrato biodegradable que permita compensar el desequilibrio y aproximarlos a los requerimientos óptimos de los microorganismos anaerobios (Chen et al., 2008).

- Potencial redox

Conviene mantener el valor del potencial redox por debajo de -300 ó -330 mV para asegurar el ambiente fuertemente reductor que las bacterias metanogénicas necesitan para su actividad óptima (Martí, 2006).

- Velocidad de carga orgánica y tiempo de retención

El tiempo de retención, junto con la velocidad de carga orgánica, condicionado por el tipo de sustrato, son los principales parámetros de diseño ya que determinan el volumen del digestor.

El tiempo de retención hidráulico (TRH) indica el tiempo de permanencia de una fase acuosa en un digestor para que toda la materia orgánica biodegradable se transforme en biogás. Depende del tipo de residuo y sus características, así como de las condiciones de operación. En los sistemas de mezcla completa, el TRH coincide con el tiempo de retención celular, por lo que el tiempo de retención deberá ser suficiente para asegurar el crecimiento de la población bacteriana. Al aumentar el TRH, aumenta el grado de degradación de la materia orgánica y la producción de biogás, aunque este valor depende en gran medida del tipo de reactor utilizado y del residuo a tratar.

La velocidad de carga orgánica (VCO) es la cantidad de materia orgánica añadida al reactor en un determinado tiempo y por unidad de volumen, siendo directamente dependiente de la concentración de sustrato y del tiempo de retención fijado. En ausencia de inhibidores, altas cargas orgánicas proporcionan altas producciones volumétricas de biogás, aunque también aumenta el riesgo de sobrecargas puntuales que conllevan a la acidificación del reactor.

- Agitación

La experiencia ha demostrado que una adecuada mezcla del contenido del digestor es esencial, ya que permite (Martí, 2006):

- Poner en contacto el sustrato fresco con la población bacteriana y eliminar los metabolitos producidos por los microorganismos metanogénicos al favorecer la salida de los gases.
- Proporcionar una concentración uniforme de la población bacteriana.
- Prevenir la formación de espumas y la sedimentación en el reactor.
- Prevenir la formación de espacios muertos, que reducirían el volumen efectivo del reactor, y la formación de vías preferenciales.

- Reducir la estratificación térmica, manteniendo una temperatura uniforme en el medio de reacción.

El sistema de agitación puede ser mecánico, hidráulico o neumático. Sin embargo, la velocidad de agitación debe ser suficiente para asegurar la correcta homogeneización del licor de mezcla, sin romper los agregados bacterianos.

1.3. Justificación del trabajo

Dado que los organismos reguladores exigen a los gestores de residuos cada vez más evidencias experimentales de que sus residuos se transforman en compuestos inocuos cuando se liberan al medio ambiente, se han diseñado diversas pruebas de biodegradabilidad. Estas permiten estimar en el laboratorio la factibilidad de la biodegradación en condiciones cercanas a las que caracterizan un medio natural determinado. Sin embargo, hasta el momento:

- Se detecta una falta de armonización de la cuantificación de “biodegradabilidad”.
- Faltan protocolos para materiales sólidos en general, ya que solo se han desarrollado ensayos para materiales específicos como envases plásticos.
- El ensayo debería tener en cuenta las características del proceso de tratamiento (compostaje, digestión anaerobia) al que se va a someter los residuos sólidos orgánicos.

2. OBJETIVOS

Los objetivos son:

- Recopilación y comparación de normas internacionales relativas a la determinación de la biodegradabilidad de materias orgánicas.
- Proposición de una metodología para la determinación de la biodegradabilidad de materias orgánicas en general.
- Comprobación de la metodología propuesta mediante la determinación de la biodegradabilidad de un material orgánico conocido.

En relación con el último objetivo, se seleccionó un plástico biodegradable comercial (MaterBi) y un material de referencia (celulosa).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recopilación bibliográfica

La definición de la metodología para la determinación de un material sólido orgánico se ha basado en la información recopilada a partir de documentos e información indexada en bases de datos de calidad y prestigio dentro del mundo científico e institucional, organismos públicos, centros de investigación, etc. En cuanto a las fuentes de información de tipo científico-tecnológica, la búsqueda se ha realizado a través de las siguientes fuentes: (i) *ISI Web of Science (Web of Knowledge)*, base de datos de publicaciones y revistas científicas indizadas por ISI de Thomson Reuters; (ii) *Scopus*, base de datos que recoge tanto los artículos de publicaciones y revistas científicas indizadas por ISI, como otros muchos títulos de revistas técnicas del mundo; (iii) *Google Scholar*, buscador de Google de fuentes académicas.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Determinación de sólidos totales y volátiles

Este método se basa en eliminar la humedad de la muestra a 105°C, para obtener los sólidos totales (ST), y posteriormente, eliminar la materia orgánica por oxidación a 550°C. Los sólidos volátiles (SV) son una primera aproximación del contenido de la materia orgánica de un residuo. Este parámetro se expresa como porcentaje de la materia fresca (% smf).

Cálculos:

$$ST (\% \text{ en peso}) = \frac{ST (g)}{100 \text{ g muestra}} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \cdot 100$$

$$SV (\% \text{ en peso sobre muestra fresca}) = \frac{SV (g)}{100 \text{ g muestra}} = \frac{(C-D)}{(B-A)} \cdot 100$$

Siendo A: Peso cápsula (g); B: peso cápsula + muestra; C: peso cápsula + residuo seco a 105°C; D: peso cápsula + residuo a 550°C (g).

3.2.2. Determinación de la alcalinidad total, parcial e intermedia

La medida de la alcalinidad informa sobre la capacidad tampón del medio y, por tanto, sobre la resistencia de pH a variar en función de los cambios introducido en el sistema. Este parámetro se expresa en mgCaCO₃/L. La medición de la alcalinidad se basa en el método standard 2320 de *Standard methods for examination of water and wastewater* (1995), que consiste en la valoración de la muestra con un ácido fuerte desde el pH de la muestra hasta pH 4,3. Este método define tres parámetros de medida de la alcalinidad: alcalinidad total (AT), medida en el punto de pH 4,3; alcalinidad parcial (AP), asociada a la alcalinidad al bicarbonato medida en el punto de pH 5,75; alcalinidad intermedia (AL), asociada a la concentración de AGV y estimada como la diferencia entre ambas. La relación de alcalinidad RA se define como la proporción entre AL y AT.

Cálculo:

$$AT (mg CaCO_3/L) = \frac{V_{4.3} \cdot N_{H_2SO_4}}{V_{muestra}} * 50$$

$$AP (mg CaCO_3/L) = \frac{V_{5.75} \cdot N_{H_2SO_4}}{V_{muestra}} * 50$$

$$AL (mg CaCO_3/L) = AT - AP$$

$$V_{4.3} = \frac{AT \cdot V_{muestra}}{N_{H_2SO_4}} * \frac{1}{50}$$

$$V_{5.75} = \frac{AP \cdot V_{muestra}}{N_{H_2SO_4}} * \frac{1}{50}$$

$$V_{muestra} = \frac{N_{H_2SO_4} \cdot (V_{4.3} - V_{5.75})}{AL} * \frac{1}{50}$$

3.2.3. Determinación de la demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) se define como la cantidad de oxígeno consumido por los componentes oxidables de una muestra (materia orgánica como de origen mineral) bajo condiciones específicas de agentes oxidantes, tiempo y temperatura. Las sustancias orgánicas e inorgánicas oxidables presentes en la muestra, se oxidan mediante reflujo en solución ácida (H₂SO₄) con un exceso conocido de

dicromato y en presencia de un catalizador. Después de la digestión, el dicromato restante sin reducir se valora con sulfato ferroso de amonio (Sal de Mohr), utilizando como punto final de la valoración ferroína. Se expresa en mg O₂/L.

Cálculo:

$$DQO \text{ (mg O}_2\text{/L)} = \frac{(A-B) \cdot N \cdot 8000}{\text{mL muestra}}$$

Siendo A: mL Sal de Mohr utilizados para hacer el blanco; B: mL Sal de Mohr utilizados para la muestra; N: normalidad de la Sal de Mohr.

No es directamente asimilable a la materia orgánica total que se determinaría por el carbono orgánico total (COT) (es necesario conocer esta correlación por cada sustrato), pero es una determinación muy frecuente en los procesos biológicos de tratamiento de aguas y residuos orgánicos.

3.2.4. Determinación de la composición del biogás

La composición del biogás se determina mediante la cuantificación de los moles de CO₂ y CH₄ en una muestra gaseosa. El método se basa en la separación cromatográfica de los diferentes compuestos de la muestra gaseosa, gracias a diferente afinidad de cada uno de ellos por la fase estacionaria, y detección mediante un detector de conductividad térmica (TCD). Se utiliza un cromatógrafo de gases (Modelo VARIAN CP-3800) equipado con dos inyectores y dos detectores TCD (Figura 5).



Figura 5 Cromatógrafo de gases VARIAN CP-3800

La extracción de la muestra gaseosa se realiza con una jeringa cromatográfica con válvulas de apertura y cierre. El volumen de muestra que se inyecta es de 0,2 mL. El método está calibrado con dos patrones de N_2/CO_2 y CH_4/CO_2 . La composición del gas se expresa como fracciones molares.

3.2.5. *Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total*

El análisis elemental se realiza mediante el equipo TruSpec CHNS (LECO), en el que se determina simultáneamente carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, presentes en un amplio rango de sustancias orgánicas o inorgánicas, ya sea en muestras líquidas, sólidas o gaseosas. Se expresa como porcentaje sobre materia fresca (% smf).

Este método se basa en una oxidación catalizada a alta temperatura (combustión flash dinámica) de la muestra seca. La mezcla de gases producida es introducida a continuación en una columna cromatográfica. Para garantizar la correcta cuantificación de los gases de combustión, éstos son conducidos a través de una zona de oxidación catalítica (trióxido de tungsteno) en donde se reducen los óxidos de nitrógeno y azufre formados eventualmente en la combustión a nitrógeno elemental y anhídrido sulfuroso (SO_2). En esta etapa se retiene el exceso de oxígeno. Tras ser eluidos los gases, éstos pasan por un detector termo-conductimétrico. El método para muestras sólidas está calibrado con un patrón de EDTA ($41,02 \pm 0,13\%$ C y $9,57 \pm 0,03\%$ N).

4. RESULTADOS

Los resultados se presentan en los siguientes apartados: (i) definiciones de los principales conceptos relacionados con el ensayo de biodegradabilidad. (ii) recopilación de métodos; (iii) metodología propuesta; (iv) prueba experimental.

4.1. Definiciones

A continuación se presenta un glosario ordenado alfabéticamente con los principales conceptos relacionados con el ensayo de biodegradabilidad y recopilados a partir de las normas encontradas en la bibliografía.

- **Biodegradación:** degradación causada por actividad biológica, especialmente por acción enzimática, que conduce a un cambio significativo en la estructura de un material. Los principales agentes involucrados son bacterias y hongos.
- **Biodegradabilidad primaria o parcial:** alteración de la estructura química que resulta en una pérdida de propiedades específicas del polímero.
- **Biodegradabilidad final:** conduce a la mineralización con formación de CO₂ (aerobiosis), CH₄ (anaerobiosis), agua, minerales y biomasa.
- **Material biodegradable:** todo producto que se degrada y se destruye por la acción de los hongos y bacterias, bajo condiciones ambientales determinadas. La definición debe aportar otro parámetro esencial: el tiempo y las condiciones en la que se verifica la degradación. Como norma general se puede considerar que un material es biodegradable en medio húmedo cuando se degrada entre 28 y 60 días o en medio seco o en compostaje natural, en 90 días.
- **Compost:** Material acondicionante del suelo en estado de descomposición de la materia orgánica que aporta nutrientes y mejora la estructura del suelo.
- **Compostaje:** Técnica de tratamiento de la fracción sólida de los residuos que usa procesos naturales para convertir la materia orgánica en CO₂, agua y humus a través de la acción de los microorganismos.

- **Desintegración.** Descomposición física de un material en muchos fragmentos pequeños.
- **Microorganismo:** Organismos vivos de tamaño microscópico tales como bacterias, hongos y levaduras.
- **Compostabilidad:** Aptitud de un material para biodegradarse en un proceso de compostaje. Para afirmar la compostabilidad, debe haberse demostrado que un material puede biodegradarse y desintegrarse en un sistema de compostaje (como pueden mostrar los métodos de ensayo normalizado) y terminar su biodegradación durante la utilización final del compost. El compost debe cumplir los criterios de calidad correspondientes que son por ejemplo un bajo contenido en metales pesados, ninguna ecotoxicidad, ningún residuo claramente distinguible.
- **Plástico compostable:** Plásticos que se biodegradan bajo condiciones de compostaje (humedad y temperatura especificadas para el desarrollo de los microorganismos). Definición recogida en EN 14995 Plásticos - Evaluación de compostabilidad - Programa de ensayo y especificaciones (bM 02/2006 p.34F, bM 01/2007 p38).
- **Polímero degradable** es aquel que sufre un cambio significativo en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas.
- **Plástico o polímero biodegradable** se define, según:
 - ASTM o American Society for Testing and Materials (ASTM Subcommittee D20), aquel plástico en el cual la degradación resulta de la acción de los microorganismos de ocurrencia natural.
 - ISO o International Standards Organization (ISO-472), aquel plástico diseñado para sufrir un cambio significativo en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas resultando la pérdida de algunas propiedades, medidas por métodos estándar. Los cambios son el resultado de la acción de microorganismos de ocurrencia natural.
 - German Institute for Standardization (DIN 103.2), aquel material plástico en el cual todos sus componentes orgánicos sufren un proceso completo de biodegradación.

- European Committee for Normalization (CEN), aquel material en el cual la degradación resulta de la acción de microorganismos. El material es mineralizado.

4.2. Biodegradación

Mediante el proceso conocido como biodegradación, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos, la mayoría de las veces en productos menos tóxicos que los compuestos originales. Por tanto, se define la biodegradabilidad como la capacidad intrínseca de una sustancia a ser transformada en una estructura química más simple por vía microbiana (Ottenbrite y Albertsson, 1992). La biodegradación puede ser ‘primaria’ y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión en productos inorgánicos de bajo peso molecular (CO_2 , CH_4 , H_2O , N_2) y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina ‘biodegradación última’ o ‘mineralización’ (OCDE², 1992).

Para evaluar la biodegradabilidad, se han diseñado una serie de pruebas que buscan cuantificar el grado de persistencia de estructuras químicas en ambientes naturales (Tabla 1). En general, las condiciones de estos ensayos tienen en cuenta que los compuestos a evaluar son total o parcialmente solubles en medio acuoso, con concentraciones bajas o medias. Se emplean diversos parámetros para cuantificar la biodegradabilidad de un compuesto, y aunque cada país establece sus propios requerimientos, en general se pretende conseguir entre 60% y 90% de descomposición del material en un lapso de 60 a 90 días.

Algunas de estas pruebas han sido normalizadas para garantizar que sus resultados sean confiables y válidos independientemente del laboratorio en el que hayan sido obtenidos. Según el esquema establecido por el *Programa de Evaluación de Productos Químicos* de la OCDE, la biodegradabilidad de una sustancia se determina utilizando tres niveles sucesivos de ensayo: las pruebas de biodegradabilidad inmediata, de biodegradabilidad intrínseca y de simulación (OCDE, 1992). Según este esquema, inicialmente se lleva a

² OCDE: organización para la cooperación y el desarrollo económico.

cabo una prueba de biodegradabilidad inmediata con la finalidad de clasificar los compuestos en la categoría ‘fácilmente biodegradable’ con medios analíticos simples. Las condiciones experimentales de las pruebas inmediatas restringen al máximo las posibilidades de que la biodegradación suceda, razón por la cual se considera que un resultado positivo indica la biodegradabilidad de la sustancia en la mayoría de los medios naturales y de los sistemas de tratamiento (Nyholm, 1991).

Si el resultado de la prueba de biodegradabilidad inmediata es negativo, se procede a realizar una prueba intrínseca. Estas pruebas utilizan condiciones experimentales más favorables a la degradación, por lo que un resultado positivo implica que la sustancia es ‘intrínsecamente biodegradable’ bajo las condiciones empleadas, aunque no necesariamente en el medio natural. Por otra parte, un resultado negativo indica muy probablemente la persistencia ambiental de la sustancia.

Finalmente, se llevan a cabo pruebas de simulación. Tales pruebas tienen como objetivo estudiar el comportamiento del compuesto en sistemas de tratamiento o medios naturales relevantes, para lo cual debe contarse con un cierto conocimiento de la distribución de la sustancia en los diferentes compartimientos ambientales (agua, suelos, etc.). Si el resultado de la prueba de simulación es negativo, se presume que la sustancia persiste en el ambiente y por tanto, puede considerarse que está sujeta a restricciones en cuanto a su esquema de producción, comercialización o uso (Kaiser, 1998).

4.2.1. Pruebas de biodegradabilidad inmediata

La mayoría de ensayos normalizados de la OCDE son pruebas de biodegradabilidad inmediata. El principio general de estas pruebas es la incubación aerobia estática, por lote, a pH neutro y a una temperatura de 20-25°C. La sustancia en estudio se añade con una concentración definida, como única fuente de carbono y energía. El inóculo consiste en una población microbiana natural que no haya sido expuesta al compuesto de prueba.

Estas pruebas pueden aplicarse a una gran variedad de materiales, debido a que se basan en el seguimiento de parámetros directos y no específicos del compuesto que se estudia, como el carbono orgánico disuelto (COD), o bien de parámetros indirectos

correlacionados con la mineralización de la compuesto, como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) o la producción de CO₂. Simultáneamente, se evalúan varios testigos que aseguran que los resultados no se deban a una degradación abiótica, a la eliminación física de la molécula por adsorción, a la toxicidad de la sustancia o a una actividad deficiente del inóculo. Ésta última se evalúa con compuestos de referencia fácilmente biodegradables, tales como la anilina o el acetato de sodio. Los resultados de los ensayos respirométricos se corrigen con la respiración endógena del inóculo, la cual se mide en ausencia de la sustancia de prueba.

El nivel límite de biodegradación exigido por estas pruebas es el 70% del COD, o el 60% de la demanda teórica de oxígeno (ThO₂), o el 60% de la producción teórica de CO₂ (ThCO₂) cuando se trata de pruebas respirométricas, en un período de 28 días. El nivel máximo de biodegradación presentado al cabo de 28 días, la duración de la fase de latencia (*t_L*) y el tiempo de vida media (*t_{1/2}*), definido como el tiempo transcurrido para obtener una biodegradación del 50%, se reportan como resultado de las pruebas. Los parámetros ThO₂ y ThCO₂ se calculan a partir de la estructura química de la molécula considerando una biodegradación total de la misma (OCDE, 1992).

Para un resultado positivo, a excepción de la prueba MITI I (301 C), la biodegradación debe además alcanzarse en los 10 días que se suceden al final de la fase de latencia, la cual se define arbitrariamente como el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación del 10%³.

La selección de una prueba se lleva a cabo considerando las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Los compuestos volátiles deben evaluarse en sistemas cerrados y preferiblemente mediante la concentración de O₂ disuelto (i.e., prueba 301 D). La biodegradación de los compuestos poco solubles en agua no deberá cuantificarse mediante el consumo de COD (i.e., evitar las pruebas 301 A y E), mientras que deberán preferirse los ensayos respirométricos para los compuestos absorbibles.

³ A este criterio se le conoce como 'la ventana de los 10 días'.

Tabla 1 Pruebas de biodegradabilidad normalizadas o en curso de normalización propuestas por la OCDE, así como su correspondencia con pruebas ISO, US-EPA y ECB

Prueba	OCDE^a	ISO^b	US -EPA^c	ECB^d
Biodegradabilidad inmediata				
AFNOR modificada - pérdida de COD	301 A	7827	835.3110	C.4-A
Sturm modificada - desprendimiento de CO2	301 B	9439	835.3110	C.4-C
MITI I modificada	301 C	-	835.3110	C.4-F
Frasco cerrado	301 D	10707	835.3110	C.4-E
Modificada de detección de la OCDE (pérdida de COD)	301 E	7827	835.3110	C.4-B
Respirometría manométrica	301 F	9408	835.3110	C.4-D
Desprendimiento de CO2 en recipientes cerrados	310 ^e	14593	835.3120	-
Biodegradabilidad intrínseca				
SCAS (Semi-Continuous Activated Sludge) modificada	302 A	9887	835.3210	C.12
Zahn-Wellens modificada	302 B	9888	835.3200	C.9
MITI II modificada	302 C	-	-	-
CONCAWE	302 D ^e	-	-	-
Simulación				
Simulación de tratamiento aerobio con lodos activos	303 A	11733	-	C.10
Simulación de tratamiento aerobio con biomasa fija	303 B	-	-	-
Biodegradabilidad intrínseca en suelos	304 A	14239	835.3300	-
Biodegradabilidad en agua marina	306	-	835.3160	-
Transformación aerobia y anaerobia en suelos	307	-	-	C.23 ^e
Transformación aerobia y anaerobia en sedimentos acuáticos	308	-	-	C.24 ^e
Mineralización aerobia en agua superficial	309 ^e	14592-1	-	-
Producción de biogás a partir de lodo anaerobio diluido	311 ^e	11734	-	-

^a OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico; ^b ISO: Organización Internacional de Normalización; ^c US-EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos; ^d ECB: Oficina Europea de Sustancias Químicas; ^e Prueba en proceso de normalización.

Sin embargo, la sola elección de un método puede afectar el resultado de la prueba. Por la reducida concentración de biomasa que estipulan, las pruebas 301 D y E proporcionan más resultados negativos, ya que frecuentemente necesitan largos períodos para que los microorganismos puedan reproducirse suficientemente. Por otra parte, dado que un resultado positivo en alguna de estas pruebas ‘restrictivas’ garantiza que el compuesto se biodegradará rápidamente, son las más indicadas para los compuestos que se encontrarán en grandes cantidades en el medio ambiente.

Se ha reportado que la cinética de biodegradación de un compuesto determinado depende de la prueba que se seleccione. Reuschenbach et al., (2003) encontraron que la anilina se biodegrada más rápidamente en la prueba 301 A, basada en el seguimiento del COD, que en la prueba 301 F y más aún que en la 301 B, basadas en el consumo de O₂ y en la producción de CO₂, respectivamente. La prueba 301 B mide el CO₂ producido, el cual es capturado por un álcali en un dispositivo externo al recipiente en el que se lleva a cabo la biodegradación. Si éste no cuenta con aireación y agitación suficientes, se producirá una acumulación de bicarbonato, lo que modificará la cinética de biodegradación. Además, el método de cuantificación del CO₂ capturado es impreciso *per se*, ya que éste se calcula a partir de la diferencia entre los valores de titulación del álcali del recipiente de prueba y del testigo, que son relativamente elevados.

En virtud de que la prueba 301 B no es muy confiable desde el punto de vista cinético, es recomendable que el criterio de ‘la ventana de los 10 días’ se elimine cuando se utiliza dicho método. De hecho, se ha mostrado que en el caso de surfactantes este criterio produce falsos resultados negativos (Richterich y Steber, 2001), aun cuando se utilicen otras pruebas de biodegradabilidad inmediata.

La prueba 310 (en proceso de normalización) fue propuesta para solventar algunas de las limitaciones de la prueba 301 B. Esta prueba, que permite probar compuestos volátiles, poco solubles en agua y absorbibles, se lleva a cabo en recipientes cerrados, en los que se deja un volumen determinado de aire. Durante y al final de la incubación, se sacrifican botellas de réplica para determinar el C inorgánico presente en el aire o en el líquido después de añadir un ácido o una base, respectivamente. Considerando la

relación de volúmenes de líquido y de aire, es posible determinar la totalidad de CO₂ producido. Mediante un ensayo inter-laboratorio se mostró que esta prueba es la más adecuada para la determinación de la biodegradabilidad inmediata de surfactantes (Painter et al., 2003).

4.2.2. Pruebas de biodegradabilidad intrínseca

Las pruebas de biodegradabilidad intrínseca se desarrollan bajo condiciones ambientales más favorables a la biodegradación, sobre todo en lo que concierne a la duración del ensayo y al mantenimiento de una viabilidad elevada del inóculo. Lo anterior se logra mediante la adaptación previa del inóculo a la sustancia y la adición de una fuente adicional de carbono. A la fecha, la OCDE ha normalizado tres pruebas de biodegradabilidad intrínseca en medio aerobio: SCAS (Semi-Continuous Activated Sludge), ZahnWellens y MITI II. En la prueba SCAS, una muestra de lodos activados se expone tanto a la sustancia como a un efluente doméstico durante 23 horas, al cabo de las cuales se obtiene el sobrenadante para su análisis en términos de COD. El sobrenadante se reemplaza por un volumen equivalente de efluente doméstico y se añade nuevamente la sustancia de prueba (20 mg_{COD}/l) para reiniciar el ciclo. Debido a su prolongada duración (hasta 6 meses) y al contacto continuo con el efluente que actúa a la vez como inóculo y fuente alternativa de carbono, es una prueba muy adecuada para la determinación de la biodegradabilidad intrínseca. Por otro lado, el test Zahn-Wellens se lleva a cabo en modo discontinuo, basándose también en el seguimiento de la pérdida de COD; sin embargo, utiliza altas concentraciones de la sustancia de prueba (50-400 mg_{COD}/l) que pueden ser tóxicas para los microorganismos.

La prueba MITI II permite evaluar la biodegradabilidad de sustancias insolubles en agua. Sin embargo, especifica un protocolo de preparación del inóculo sumamente complicado que precisa la mezcla de 10 muestras naturales (i.e., suelo, agua superficial, lodos activados) y su posterior pre-cultivo con peptona y glucosa durante al menos 30 días (OCDE, 1992). Varios autores han reportado que este procedimiento, lejos de aumentar el potencial de biodegradación del inóculo, produce más resultados negativos que otras pruebas con igual concentración de biomasa (Painter, 1995).

Recientemente se propuso la prueba CONCAWE (302 D, en proceso de normalización) para la determinación de la biodegradabilidad intrínseca de productos derivados del petróleo, y en general de sustancias volátiles y poco solubles. Este ensayo utiliza la misma metodología que la prueba inmediata 310, pero a diferencia de ésta, utiliza una población microbiana mixta previamente adaptada a la sustancia de prueba y un período de incubación de 8 semanas (OCDE, 2001a). Dado que Batters et al., (1999) encontraron que la prueba proporciona resultados con reproducibilidad semejante a la de otras pruebas inherentes, constituye una mejor alternativa que el ensayo MITI II para el estudio de la biodegradabilidad de sustancias insolubles en agua.

4.2.3. Pruebas de simulación

El ensayo 303A, que reproduce una planta de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados, es la prueba de simulación más utilizada. En esta prueba se determina la velocidad de degradación de la sustancia (10-20 mg_{COD}/l), contenida en un agua residual sintética a base de peptona, en un módulo de lodos activados con un tiempo de retención de lodos de 6 días. La biodegradabilidad de la sustancia se calcula a partir del COD removido en un tiempo de residencia hidráulica de 3-6 horas y considerando los resultados de una prueba testigo realizada simultáneamente sin la sustancia. Un inconveniente de la prueba es que utiliza concentraciones muy elevadas con respecto a las que suelen encontrarse en la mayoría de las plantas de tratamiento, lo que conduce a cinéticas y mecanismos de biodegradación distintos a los que suceden en la realidad. Por tal motivo, Painter (1995) sugirió realizar estas pruebas con una concentración aproximada de 10 mg/l, lo cual necesita una técnica analítica específica o que la sustancia esté marcada con ¹⁴C. La OCDE también propone una variante de esta prueba, en la cual se simula un sistema de tratamiento de aguas residuales por biomasa fija (303 B).

4.2.4. Pruebas de biodegradabilidad en suelos

La prueba 304A fue normalizada por la OCDE en 1981 para determinar la biodegradabilidad intrínseca de sustancias químicas en suelos. Una versión más completa de esta prueba ha sido normalizada recientemente (307), que permite estudiar

la transformación aerobia y anaerobia en suelos de compuestos para los cuales exista un método analítico de sensibilidad suficiente (OCDE, 2002a). Este ensayo implica la adición de la sustancia de prueba, la cual puede ser o no marcada radiactivamente, a muestras de suelo y su posterior incubación en un biómetro a temperatura y humedad constantes y en ausencia de luz. A diferentes períodos de incubación se realiza una extracción de las muestras y se determinan los contenidos de la sustancia de prueba y de los principales productos de degradación. Los productos volátiles deben ser colectados absorbiéndolos en los medios apropiados para su posterior cuantificación. Cuando se usa la sustancia marcada con ^{14}C es posible medir su velocidad de mineralización mediante el $^{14}\text{CO}_2$ producido. Para el estudio de las rutas de biodegradación de una sustancia es suficiente realizar la evaluación con un solo tipo de suelo por un período no mayor de 120 días. Para la determinación de velocidades de biodegradación se aconseja realizar las pruebas con al menos tres tipos de suelo diferentes en su contenido de C orgánico, pH, contenido de arcilla y concentración de biomasa; estos tipos de suelo deben ser representativos del medio receptor de la molécula que se evalúa y en este caso la duración del estudio puede alargarse hasta 6 ó 12 meses.

Se ha encontrado que la adición de una sustancia fácilmente biodegradable estimula la degradación de la materia orgánica nativa del suelo, lo que se conoce con el nombre de imprimación (Alexander, 1977). El uso de sustancias marcadas al ^{14}C permite eliminar este error, al evaluar únicamente el CO_2 producto de la degradación de la sustancia.

4.3. Métodos estandarizados de biodegradación para materiales sólidos

En este apartado, se presentan los ensayos recopilados en la bibliografía y orientados a la determinación de la biodegradabilidad de materiales orgánicos sólidos. La mayoría de estas normas de ensayo se basan en la biodegradación del material de ensayo se realiza en presencia de oxígeno, se generan como productos dióxido de carbono, sales minerales y nueva biomasa. Por otro lado, el porcentaje de biodegradación en estos ensayos se calcula mediante la relación entre el dióxido de carbono generado a partir del

material del ensayo y la cantidad teórica máxima de dióxido de carbono que puede producirse a partir del material del ensayo.

No existen normas internacionales que regulan y miden la velocidad de los procesos de degradación y de biodegradación de materiales orgánicos sólidos en general. Sin embargo, sí existen ensayos para materiales específicos, como los envases plásticos o biopolímeros.

Los ensayos se han agrupado por la organización responsable de su estandarización. Las principales organizaciones internacionales que han establecido normas o métodos de ensayo son: American Society for Testing and Materials (ASTM), Institute for Standards Research (ISR), Internacional Standards Organization (ISO), European Standardization Committee (CEN), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Aunque algunas entidades a nivel nacional, como *German Institute for Standardization* (DNI) y *Organic Reclamation and Composting Association* (ORCA) (Bélgica), han definido sus propios ensayos, éstos no se han incluido en este apartado.

4.3.1. *American Society for Testing and Materials (ASTM)*

Una familia de normas de ASTM está dirigida al estudio del deterioro de las propiedades físicas de los plásticos en una variedad de condiciones ambientales específicas incluyendo compostaje simulado (D5509, D5512), vertedero simulado (D5525), actividad microbiana aeróbica (D5247) y condiciones de marina flotante (D5437).

Un segundo grupo de normas de ASTM está dirigido al estudio de generación de CO₂ en entornos aeróbicos, incluida la utilización de lodos (D5209), de lodos activados (D5271) y compostaje controlado (D5338).

Un tercer grupo de normas ASTM aborda la evolución de CH₄ y el CO₂ en ambientes anaeróbicos (D5210), biodegradación anaeróbica (D5511) y vertedero acelerado (D5526). La norma ASTM D6400 establece los requisitos para distinguir entre plásticos degradables y biodegradables.

Por último, la norma ASTM D6954 (4), se recomienda ser aplicada solo para el estudio de los materiales poliméricos, comercialmente conocidos como oxo-biodegradables, se subdivide en tres partes:

- La muestra debe ser expuesta a temperaturas entre 20-70oC en presencia de niveles de aire o humedad específicos. Para películas delgadas, el período de exposición debería ser el tiempo requerido para alcanzar 5% de elongación a ruptura o menos y un peso molecular promedio en peso (Mw) de 5000 o menos unidades, medido a 3 temperaturas diferentes.
- A continuación, las muestras son expuestas a un proceso de degradación abiótica, el material de prueba debería ser sometido a degradación apropiada (D5988, D5338 – que tiene como referencia la ISO 14855 – y D5526). Se registra el perfil de tiempo en la evolución de dióxido de carbono.
- Se realizan las pruebas de toxicidad, que envuelve las consideraciones de los impactos ecológicos en la disposición final D5951, que tiene como referencia la OECD 208.

4.3.2. *Institute for Standards Research (ISR)*

Esta entidad ha definido un ensayo para evaluar el comportamiento de los plásticos biodegradables en instalaciones de compostaje y en condiciones de laboratorio. ISR ha determinado tres criterios que necesitan los plásticos a fin de ser definidos como compostables:

- Deben degradarse al mismo ritmo y en la misma medida que el material compostable y sin dejar residuos tóxicos o persistentes.
- Debe desintegrarse durante el compostaje activo, por lo que no se deben encontrar fragmentos visibles o distinguibles en las pantallas.
- No debe tener ninguna ecotoxicidad o fitotoxicidad que pueda tener repercusiones en la capacidad del compost para soportar el crecimiento de plantas.

4.3.3. *International Standard Organization (ISO)*

La Organización Internacional de Normalización (ISO) ha establecido varios ensayos por los que actualmente se evalúan los plásticos: ISO 14855 es una prueba de compostaje aeróbica controlada; ISO 14851 e ISO 14852 son pruebas de biodegradación diseñadas específicamente para materiales poliméricos; ISO 15985 es una prueba de biodegradación anaeróbica en un ambiente alto de sólidos.

Una parte importante de la evaluación de plásticos biodegradables consiste en determinar la desintegración en la forma de producto final. Puede utilizarse una prueba a escala piloto controlada o en una prueba en un centro de tratamiento de compostaje aeróbico a gran escala. Debido a la naturaleza y condiciones de dichas pruebas de desintegración, las pruebas no se pueden diferenciar entre biodegradabilidad y desintegración abiótica, pero en su lugar se muestra que se ha alcanzado suficiente desintegración en los materiales de prueba durante el tiempo especificado de prueba (6 meses).

La norma ISO 11734 especifica un método general de selección de la biodegradabilidad de compuestos orgánicos a una concentración determinada por acción de microorganismos anaerobios. Se utiliza un lodo diluido con una concentración relativamente alta de la sustancia química a ensayar. El ensayo permite una exposición del lodo a sustancias química de hasta 60 días, periodo que es superior al tiempo normal de retención del lodo en los digestores anaerobios (de 25 días a 30 días), aunque los digestores de carácter industrial pueden tener tiempos de retención mayores. El método es aplicable a los compuestos orgánicos, de contenido en carbono conocido y que sean solubles o poco solubles en agua, y sin efectos inhibidores frente a los microorganismos de ensayo a las concentraciones elegidas para el ensayo.

Las normas ISO 11734 e ISO 14853 fueron verificados usando polímeros como sustancia de prueba. Se encontró que ambos métodos para ser adecuado y factible de realizar ensayos de biodegradación anaeróbica.

4.3.4. European Committee for Normalization (CEN)

En 1.999, el European Committee for Normalization (CEN) estableció el estándar de la norma prEN 13432. La norma proporciona a la Directiva Europea de la Comisión Europea sobre envases y residuos de envases con normas y reglamentos técnicos apropiados. Esta norma es un punto de referencia para todos los productores europeos, las autoridades, los administradores de la instalación y los consumidores. El estándar especifica requisitos y procedimientos para determinar la compostabilidad de materiales de embalaje plástico basados en cuatro áreas principales: biodegradabilidad; desintegración durante el tratamiento biológico; y efecto sobre la calidad del compost resultante. Es la norma más estricta para la biodegradabilidad y se puede aplicar a otros materiales de embalaje además de polímeros e incorpora los siguientes ensayos y normas:

- ISO 14855 (Plastics – Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration under controlled composting conditions. Method by analysis of released carbon dioxide).
- ISO 15985 (Plastics – Determination of the ultimate anaerobic biodegradation and disintegration under high-solids anaerobic – digestion condition. Method by analysis of released biogas).
- ASTM D5338 (Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting condition).

Para que un material sea aprobado por la norma, no debe permanecer más de 6 meses en cualquiera de las condiciones estipuladas en las pruebas anteriormente mencionadas y tener un nivel de aprobación de 90%. Además, el material no deberá exceder un contenido metales pesados por encima de 50% para el compost “normal”.

4.3.5. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)

La OCDE ha incentivado el estudio y la aplicación de sistemas anaerobios para la evaluación de la biodegradabilidad de una gran variedad de contaminantes, debido a la presencia de altas concentraciones de algunos contaminantes en ambientes anaerobios,

como por ejemplo en sedimentos (OCDE, 1981), junto con la evidencia de que los microorganismos anaerobios son metabólicamente más versátiles de lo que se creía (Caldwell et al., 1998; Anderson y Lovley, 2000).

Para tal efecto, se propuso el método 311, actualmente en proceso de normalización (OCDE, 2001d). Este método consiste en incubar en recipientes herméticos, durante 60 días a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, lodos provenientes de un digestor anaerobio ($1-3 \text{ g}_{\text{SST}}^4/\text{l}$) en presencia de una concentración de 20-100 mgC/l de la sustancia de prueba. La cuantificación de la presión ejercida por los gases producto de la biodegradación anaerobia (i.e., CO_2 y CH_4) permite calcular el grado y la velocidad de degradación de la sustancia.

Como control se emplean sustancias de referencia fácilmente biodegradables, tales como fenol o benzoato de sodio. Cuando se desconoce si la sustancia es tóxica para los microorganismos anaerobios, se recomienda un control adicional en el que se adicionan la sustancia de prueba y la de referencia en la misma concentración. Así mismo, cuando se trabaja con una sustancia poco soluble en agua y se emplea un disolvente, debe incluirse un control en el que se adicionan el disolvente, el medio de cultivo y el inóculo. Este método también considera el empleo de un inóculo pre-adaptado a la sustancia de estudio, cuando se sospecha que ésta no es fácilmente biodegradable.

El método OCDE 311 está limitado a la evaluación de un sistema metanogénico; sin embargo los microorganismos anaerobios pueden utilizar una variedad de aceptores finales de electrones (i.e., nitratos, sulfatos, Mn y Fe), los cuales están presentes en ambientes naturales y en aguas residuales industriales. Además, no puede asumirse que el potencial metabólico en un ambiente anaerobio es el mismo con los diferentes aceptores finales de electrones (Strevett et al., 2002). Por ejemplo, Hee-Sung et al. (2002), al estudiar la biodegradación de pirrolidina y piperidina en ambientes desnitrificantes, sulfatorreductores y metanogénicos, observaron una degradación completa en el ambiente desnitrificante y ninguna degradación en los otros dos ambientes después de 6 meses. Otro limitante del método OCDE 311 está relacionado con el medio de cultivo ya que carece de compuestos orgánicos (i.e., vitaminas y

⁴ SST: sólidos suspendidos totales.

aminoácidos), los cuales pueden ser requeridos por los microorganismos anaerobios para su óptimo crecimiento (Colleran y Pender, 2002).

4.4. Comparación entre normas

La normalización de las pruebas de biodegradabilidad enfrenta un problema que es inherente a cualquier intento de simulación ambiental in vitro. Cuando se pretende integrar en el laboratorio el mayor número de variables, buscando reflejar la complejidad real de los fenómenos naturales, disminuye también la posibilidad de construir métodos reproducibles y por lo tanto susceptibles de normalización. Así, las pruebas de biodegradabilidad normalizadas deben contar con metodologías experimentales simples y al mismo tiempo, aproximarse lo más posible a los fenómenos que realmente suceden en la naturaleza.

En la Tabla 2 se comparan varias normas: todas estas pruebas se basan en la determinación de biogás (medición manométrica o volumétrica) como producto final de proceso de biodegradación anaeróbica:

- La mayoría los métodos son pruebas de cribado para la evaluación de la biodegradabilidad en un medio acuoso. Se utiliza un medio de sal mineral definido con volúmenes entre 100-1.000 mL.
- Las concentraciones de sustancia de ensayo varían desde 15-100 mg de carbono orgánico por litro. La cantidad de sólidos (inóculo de biomasa) se ajusta a 1-3 g de materia seca por litro. Para lograr una suficiente producción de biogás, es necesaria una concentración mínima de sustancia de prueba, alrededor de 20 mg de carbono orgánico por g de sólidos. Los ensayos se incuban a temperatura mesófila (35° C) y con la duración del ensayo de 20 días hasta 8 semanas.
- Los métodos de ensayo que trabajan con sistemas de alto contenido en sólidos corresponden a los procesos de digestión anaeróbico secos. Algunas de estas pruebas de detección se han desarrollado para las pruebas de embalaje y material plástico.

Tabla 2 Comparación de las condiciones de los ensayos de biodegradabilidad

Normas	ASTM D 5210:1992 (1)	ASTM D 5511:1994 (2)	DIN 38414, TL 8:1985-06 (3)	ISO 11734: 1995	ISO/DIS 14853: 1999 (4)	ISO/DIS 15985:1999	CEN/Draft:1995 (6)	OECD 311:2001 (7)	ISO 14855-1
Seguimiento de la degradación	Biogás** C-org soluble Polímero residual	Biogás**	Biogás**	Biogás** C-inorg soluble	Biogás**	Biogás**,*** Desintegración	Biogás** Desintegración	Biogás** C-inorg disuelto (DIC)	Biogás** Desintegración
Aplicable a	polímero	polímero	<i>No definido</i>	sustancia orgánica soluble	sustancias insolubles	sustancias insolubles	material de embalaje	div. material	polímero
Medio	medio mineral definido	sustancia digerida	lodos depuradora	medio mineral definido	medio mineral definido	sustancia digerida	sustancia digerida	medio mineral definido	medio mineral definido
Volumen	100 mL	ca. 1 L en 2L *	500 mL	100 – 1000 mL	250 mL	ca. 1000 mL	ca. 1000 mL	100 - 1000 mL	2 L
Duración	<i>No definido</i>	Hasta alcanzar 70% degradación	20 – 40 días	60 días	30 - 60 días	15 días (mínimo)	15 días (mínimo)	60 días	max. 6 meses
Temperatura	35±2°C	52±2°C	35±1 °C	35±2 °C	35±2 °C	52±2 °C	52±2 °C	35±2 °C	58±2 °C
Método medición gas	volumétrico o manométrico	volumétrico	volumétrico	manométrico	volumétrico o manométrico	volumétrico	volumétrico	manométrico	volumétrico
Concentración de material a estudiar	<i>No definido</i>	15 – 100 g ST/L	<i>No definido</i>	100 mg C-org /L	100 mg C-org /L	20 g ST y 8 gCOT/L	20 g ST y con 8 gCOT/L	20 – 100 mg C-org /L	20 gCOT/L
	1-2 gST/L	300 gST/L	<i>No definido</i>	1 - 3 gST/L	1 - 3 gST/L	> 200 gST/L	1 - 3 gST/L	1 - 3 gST/L	50 gST/L
Criterio “Biodegradable”	Min. 70%	Min. 70%	Min. 70%	<i>No definido</i>	70% COD ó 60% THO ₂	90% antes de 6 meses	90% antes de 6 meses	<i>No definido</i>	90% antes de 6 meses

Notas:

* Frascos Erlenmeyer.

** Biogás: CO₂, CH₄.

*** CO₂ opcional y CH₄ forma gaseosa

(1): Método de prueba estándar para determinar la biodegradación anaeróbica de materiales plásticos en presencia de lodos de depuradora municipal.

(2): Método de prueba estándar para determinar la biodegradación anaeróbica de materiales plásticos bajo alto contenido de sólidos condiciones anaeróbicas-digestión.

(3): Evaluación del comportamiento digester.

(4): Evaluación de la última biodegradación anaeróbica de materiales plásticos en un sistema acuoso – método por el análisis de la conversión de carbono a dióxido de carbono y metano.

(5): Plástico - Evaluación de la biodegradabilidad anaeróbica y la desintegración bajo alto contenido en sólidos condiciones anaeróbicas-digestión - método mediante el análisis de biogás liberados.

(6): Evaluación de la biodegradación final y la desintegración de los materiales de envasado bajo alto contenido de sólidos condiciones de digestión anaeróbica - método por el análisis de biogás liberados.

(7): biodegradabilidad anaeróbica; La producción de gas a partir de lodos de depuradora anaerobia diluido; Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos. Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (2006).

4.5. Protocolo propuesto

Este protocolo se basa en la norma española UNE EN ISO 14855-1 y está diseñado para simular las condiciones de compostaje.

4.5.1. Principio del método

El material de ensayo se mezcla con el inóculo y se introduce en un recipiente donde se composta intensivamente bajo condiciones de oxígeno, temperatura y humedad óptimas durante un período de tiempo suficiente para llegar a la fase estacionaria de biodegradación, entre 45 días y 6 meses. Durante la biodegradación aeróbica del material de ensayo, el dióxido de carbono, el agua, las sales minerales y los nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa) son los productos finales de la biodegradación.

El porcentaje de biodegradación se calcula mediante la relación entre CO_2 generado experimentalmente y la cantidad teórica máxima de CO_2 que puede producirse a partir del material plástico. El CO_2 generado experimentalmente se mide a intervalos regulares para determinar la producción acumulada del mismo. La cantidad teórica máxima de CO_2 se calcula a partir del contenido de carbono orgánico total (COT). Con los datos obtenidos se puede calcular también la velocidad de degradación.

4.5.2. Materiales, reactivos y equipos

Los materiales y equipos necesarios son:

- Recipientes de compostaje de vidrio de 250 ml que permitan la purga de gas equilibrada en dirección ascendente (Figura 6).
- Tapones de cierre hermético con 2 y 3 salidas.
- Tubos impermeables al aire que conecten los recipientes de compostaje con el suministro de aire y el sistema de medición de CO_2 .
- Tamiz de 0,5 - 1 mm de luz de malla.

- Sistema de suministro de aire, capaz de suministrar a cada recipiente aire libre de CO₂ en un flujo suficiente como para proporcionar condiciones realmente aeróbicas durante el ensayo (compresor de aire, bomba de pecera).
- Cromatógrafo de gases para la lectura del CO₂.
- Rotámetro, con un caudal mínimo de 10 ml/min, para mantener el caudal adecuado en el interior de los reactores.
- pH metro.
- Estufa para el análisis de los sólidos totales (105⁰C).
- Mufla para el análisis de los sólidos volátiles (550⁰C).
- Analizador elemental para la determinación del carbono orgánico total (COT).
- Balanza (máximo 3000 g).
- Cámara termostatazada.

Los reactivos necesarios son:

- Celulosa
- Agua destilada
- Sosa (hidróxido de sodio, NaOH) 40%
- HCl
- Fenolftaleína



Figura 6 Material de vidrio y esquema del montaje

4.5.3. Procedimiento

Conservación de muestras

- Conservación del inóculo: el inóculo del compost maduro se puede guardar a temperatura ambiente.
- Conservación de muestras: si el grado de humedad de las muestras supera 1% deben mantenerse refrigeradas 24 horas. En caso de superar este período, las muestras se deben congelar. Si son muestras sin humedad, se pueden conservar a temperatura ambiente.

Preparación del inóculo

Como inóculo debe utilizarse un compost bien aireado procedente de una planta de compostaje aeróbico en funcionamiento. El inóculo debe ser homogéneo y libre de objetos inertes grandes como vidrio, piedras o piezas de metal. Estos se eliminan manualmente y entonces se tamiza el compost en una malla de 0,5 - 1 cm. Una vez tamizado, se determina el contenido de sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y contenido en COT del inóculo⁵. Adicionalmente, se puede medir al principio y/o al final del ensayo parámetros como el contenido en COT, nitrógeno total Kjeldhal (NTK) y ácidos grasos volátiles (AGV).

Para realizar el ensayo, se ajusta el contenido de humedad del inóculo si es necesario, antes de la utilización del compost, mediante la adición de agua desionizada o un secado suave (aireación con aire seco): los ST debe estar entre 35% y 55% smf (sobre muestra fresca) y los SV no deben ser más de un 15% smf ó 30% ST.

Se mide el pH inmediatamente, que debe estar entre **7,0 y 9,0**. Para ello, se prepara una mezcla de 1 parte de inóculo con 5 partes de agua desionizada; se mezcla mediante agitación suave y se mide.

⁵ Si no se dispone de mediador de COT, el contenido de COT se puede medir por diferencia entre el carbono elemental total de la muestra inicial y el carbono elemental total de las cenizas (carbono inorgánico).

La adición opcional de material estructurante (madera o material inerte) puede prevenir el apelmazamiento y obstrucción del compost durante el ensayo.

Se verifica la actividad del inóculo durante el ensayo con celulosa (material de referencia) y mediante la medida de CO_2 , en los recipientes en blanco. Al final del ensayo el material de referencia debe haberse degradado un 70%. El inóculo del blanco debe producir entre 50 y 150 mg de CO_2/gSV en los primeros 10 días de ensayo. Si la producción de CO_2 es demasiado alta se estabiliza el compost por aireación durante unos días antes de utilizarlo en un nuevo ensayo. Si la actividad es demasiado baja, se sustituye el compost.

Preparación del material de ensayo y del de referencia

Se determina el carbono orgánico total (COT) del material del ensayo y de referencia, y se expresa como gCOT/gST . El material de ensayo debe tener suficiente COT para poder detectar el CO_2 producido. Normalmente, se requiere un mínimo de 50 gST para un recipiente de 1 litro con una concentración de 0,4 gCOT/gST .

Se utiliza material de ensayo en forma de gránulos, polvo, película o formas simples. El área máxima superficial de una pieza individual de material de ensayo debe ser de unos 2cm x 2cm. Si cualquier pieza en el material de ensayo original es más grande, se reduce el tamaño.

Preparación del ensayo

Se preparan el siguiente número de recipientes:

- Dos recipientes con el compost y el material de ensayo
- Dos recipientes para el compost y el material de referencia
- Dos recipientes para el blanco (compost)

Se sigue el siguiente procedimiento:

- a. Todos los viales deben estar identificados de forma adecuada. Se registra la tara del vial vacío, así como todas las pesadas que se vaya realizando.

- b. En cada vial se añaden 120 g de inóculo. Hay que tener en cuenta que la mezcla del ensayo debe ocupar unas tres partes del volumen del recipiente de compostaje.
- c. Se añaden 10 g de material. Se recomienda que la proporción de ST-inóculo y ST-material debe ser aproximadamente de 6:1 (el material inerte, no se tiene en cuenta en esta relación).
- d. Se sitúan los viales a la temperatura de ensayo. Se recomienda una temperatura de 55 – 60°C. La incubación se debe hacer en la oscuridad o luz difusa.
- e. Se inicia la aireación, con un caudal de aire recomendado de 10-30 ml/min. Este caudal debe ser el mismo en cada vial.

Seguimiento del ensayo

Se mide la cantidad de dióxido de carbono generada a partir del aire de salida de cada recipiente de compostaje a intervalos intermedios de tiempo. La frecuencia de la medición dependerá de la precisión deseada de la curva de biodegradabilidad y la biodegradabilidad de la mezcla de ensayo. Como mínimo, se mide el dióxido de carbono generado al menos 2 veces al día a intervalos de unas 6 h durante la fase de biodegradación y una vez al día durante la fase de estancamiento.

En cuanto al sistema de aireación, es recomendable que el sistema de suministro de aire y el sistema de medición de del dióxido de carbono estén desconectados antes de agitar los recipientes de compostaje. Se mide la concentración de oxígeno en la salida de aire de los viales, esta no debería bajar por debajo de 6%. Se debe controlar este nivel, para asegurar que se mantengan las condiciones aerobias, durante la primera semana. Semanalmente se agitan los recipientes de compostaje para prevenir la aparición de caminos preferenciales y asegurar una aireación uniforme.

En relación a la humedad, se comprueba mediante observación visual que la humedad de la mezcla de ensayo en los recipientes de compostaje sea adecuada. No debe de presentar agua libre estancada o agrupamientos de material. Las condiciones muy secas se observan típicamente por ausencia de condensado en el espacio superior del recipiente de compostaje.

Si se midiera la humedad mediante ST/V esta debería mantenerse en un 50%. El contenido de humedad deseado se consigue mediante aireación con aire seco o humidificado. Se puede obtener un cambio más drástico en el contenido de humedad mediante la adicción de agua. La misma agitación semanal de los recipientes de compostaje ayuda a asegurar una distribución uniforme y homogénea de la humedad.

Se mide el pH semanalmente. Si el pH es menor de 7,0 la biodegradación podría inhibirse debido a la acidificación del compost por la rápida degradación de un material de ensayo fácilmente degradable. En este caso, se recomienda la medición del espectro de los ácidos grasos volátiles (AGV) para verificar la acidificación de los contenidos del recipiente de compostaje. Si se ha formado más de 2 gAGV/kg-ST, entonces el ensayo debe considerarse inválido debido a la acidificación e inhibición de la actividad microbiana. Para evitar la acidificación, se añade más compost a todos los recipientes o se repite el ensayo utilizando, por ejemplo, menos material de ensayo o más compost.

Duración del ensayo

Se incuban los recipientes de compostaje durante un período que no exceda de 6 meses, aunque el período de incubación puede extenderse hasta que se alcance una fase de estancamiento constante. Alternativamente, puede acortarse el período de incubación si la fase de estancamiento se alcanza antes.

Al finalizar el ensayo se toma una muestra lo más homogénea posible de cada vial y se determinan los ST y SV.

4.5.4. Cálculos

Cantidad teórica máxima de CO₂

La cantidad máxima de dióxido de carbono ($ThCO_2$; se expresa como gC) que puede ser calculada a partir de la cantidad de material en cada vial, según la siguiente ecuación:

$$ThCO_2 = m \times w_c \times \frac{44}{12} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde: m , masa (g) del material de ensayo introducida en el vial; w_c , es el contenido de carbono del material, expresado como una fracción de masa (% smf); 44 y 22 son las masas atómicas y moleculares (g/mol) del CO_2 y C, respectivamente.

Se calcula de la misma manera la cantidad teórica de CO_2 que puede generar el material de referencia de cada vial.

Medición del CO_2 generado por cromatografía de gases

En primer lugar es necesario calcular la producción acumulada real de CO_2 a partir de los resultados del cromatografía, para lo que hay que registrar el número de muestras extraídas e incidencias (fugas, aireación, etc).

Para expresar el volumen en condiciones normales es necesario conocer las condiciones de presión (P) y temperatura (T^a) a las que se hicieron las medidas. La corrección para pasar a condiciones normales es la siguiente:

$$NV_{CO_2} = V_{CO_2} \cdot \frac{273 \cdot 1}{(273 + T^a) \cdot P} \quad (\text{Ec.2})$$

La producción neta atribuible al sustrato será el resultado de restar a la producción la producción del blanco.

Porcentaje de biodegradación

Se calcula el porcentaje de biodegradación (D_t) en cada vial (V_T) como la cantidad de CO_2 generado durante cada intervalo de medición utilizando la siguiente ecuación:

$$D_t = \frac{\sum (CO_2)_T^t - \sum (CO_2)_B^t}{ThCO_2} \times 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde: $\sum (CO_2)_T^t$ y $\sum (CO_2)_B^t$ son la cantidad acumulada de CO_2 , en gramos, generada al tiempo t; en el vial con material V_T y en vial blanco V_B respectivamente; $ThCO_2$ es cantidad máxima teórica de dióxido de carbono del material.

4.5.5. *Expresión e interpretación de los resultados*

Se presenta la curva de la evolución de la cantidad acumulada de dióxido de carbono de cada recipiente en función del tiempo, ya la curva de biodegradación (porcentaje de carbono inicial mineralizado en función del tiempo). Se utilizan valores medios si las diferencias entre los valores individuales son menores del 20%. Si no es este el caso, se dibujan las curvas de biodegradación para cada recipiente de compostaje.

Se lee el grado de biodegradación a partir de la fase estacionaria de la curva de biodegradación y se anota este valor como el resultado final del ensayo. Si no se observa fase estacionaria, se estima el grado de biodegradación final de la cantidad acumulada de CO₂ que se ha generado al final del ensayo.

4.5.6. *Validez de los resultados*

El ensayo se considera válido si:

- El grado de biodegradación del material de referencia es más del 70% después de 45 días.
- La diferencia entre el porcentaje de biodegradación del material de referencia en los recipientes de compostaje es menor del 20% al final del ensayo.
- El inóculo en el blanco ha generado más de 50 mg pero menos de 150 mg_{CO2/gsv} (valores medios) después de 10 días de incubación.

4.6. **Prueba experimental**

4.6.1. *Materiales*

Se ha empleado como materias a degradar en los ensayos glucosa, celulosa y un plástico compostable comercial denominado Mater Bi (Figura 7). La glucosa y la celulosa son reactivos sintéticos. Los números CAS de la glucosa y la celulosa son CAS 50-99-7 y CAS 9004-35-7, respectivamente.

El Mater-Bi es un material comercial biodegradable que deriva principalmente del almidón de maíz, trigo y patata. Es un material termoplástico que puede ser procesado

con la misma tecnología que el plástico tradicional. La biodegradabilidad ha sido medida siguiendo un método estándar aprobado (norma europea EN 13432) por organizaciones internacionales como ISO, CEN, ASTM, DIN, UNI. La compostabilidad del Mater-Bi está certificada mediante las etiquetas⁶ "OK Compost" y "DIN Certco".

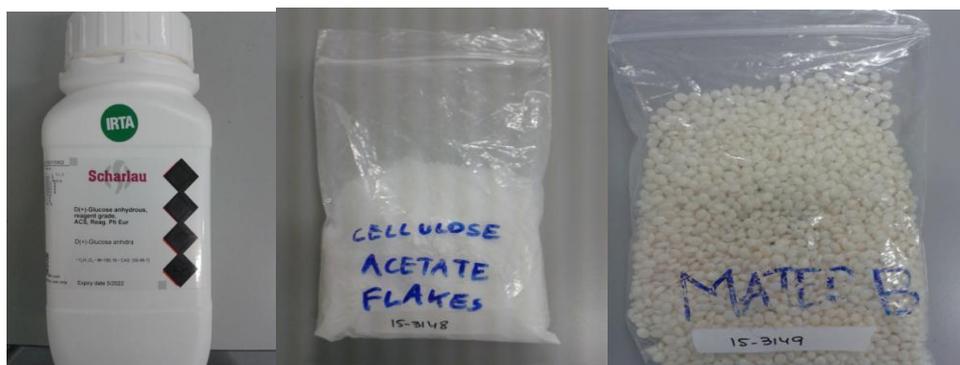


Figura 7 Glucosa, Celulosa y Mater Bi

4.6.2. Inóculo

Como inóculo se ha utilizado dos muestras de compost maduro, ambos procedentes de la unidad de compostaje en túnel de residuos sólidos urbanos de la planta de biometanización Can Barba (Terrassa, Barcelona). La Figura 8 muestra una imagen del compost original y tamizado sin trozos de vidrio, piedras y piezas de metal. Posteriormente, los compost tamizados (Compost 1, Compost 2) fueron caracterizados según su contenido de ST, SV, CT y DQO (Tabla 3).

Tabla 3 Caracterización de los inóculos y de los materiales a estudiar

Material	ST (%smf)	SV (%smf)	CT (gC/gST)	DQO (g/kg smf)
Compost 1	61,58	21,64	0,22	
Compost 2	66,97	27,63	0,01	600,84
Glucosa	99,55	99,89	0,4	
Celulosa	98,05	97,98	0,41	1739,54
MaterBi	99,18	98,14	0,41	1587,72

⁶ <http://www.novamont.com/eng/mater-bi-certifications>.



Figura 8 Imagen del compost sin tamizar (izquierda) y tamizado (derecha)

Conclusiones

- El compost maduro es un material muy heterogéneo y complejo. Por tanto, necesita una preparación antes de utilizarlo.
- El compost debe tener suficiente porosidad para permitir que se mantenga las condiciones aeróbicas durante el mayor tiempo posible.
- Antes de utilizar el compost se ajusta el contenido de agua. La humedad debería mantenerse en un 50% (se consigue mediante aireación con aire adición de agua).

4.6.3. Ensayo 1. Selección de la proporción inóculo y material

Para la selección de la proporción inóculo y material, se preparó un ensayo con glucosa como material de referencia y el Compost 1. La caracterización se muestra en la Tabla 3.

Tabla 4 Ensayo 1: cantidades utilizadas para realizar el ensayo 1 (glucosa)

unidades	g	g	g	g	g	gC	ratio		
vial	ST compost	compost	ST material	H2O	material	material	C:M	g mezcla	gC/gST
V1	46,19	75,00	7,70	24,18	7,70	3,08	6:1	106,88	0,4
V2	46,19	75,00	4,62	21,12	4,62	1,85	10:1	100,74	0,4
V3	46,19	75,00	15,40	31,90	15,40	6,16	3:1	122,30	0,4
V4	46,19	75,00	46,19	62,88	46,19	18,48	1.1	184,07	0,4
V5	36,95	60,00	1,85	15,05	1,85	0,74	20:1	76,90	0,4

Durante la preparación de los viales, se ajustó la humedad del Inóculo 1 con agua desionizada. Se pusieron canicas de vidrio en el fondo de todos los viales, para prevenir el apelmazamiento de la mezcla inóculo-material-agua durante el ensayo, y se comprobó el funcionamiento del sistema de aireación. Para cada material, se prepararon los siguientes recipientes: 1 vial de 900 ml con 400 ml agua (B1), 1 vial de 900 ml con 250 ml NaOH 40% (B2), 1 vial de 250 ml con la mezcla inóculo y material (B3), 1 vial de 250 ml con 150 ml NaOH 40% (B4). En la Figura 9 se muestra el esquema del montaje por cada material y una imagen hecha durante la prueba de aireación con agua.

Para poder diferenciar el CO₂ generado en el vial B3 y el del aire de entrada, éste se hizo pasar por el vial B2 lleno de una solución de NaOH 40%. De esta forma, se asegura la absorción completa del CO₂ del aire en la disolución básica (reacción del CO₂ con el hidróxido de sodio para formar bicarbonato de sodio). Usando el mismo principio, se hizo pasar el gas procedente del vial B3 por el vial B4 con 150 ml de la solución de NaOH 40%, para retener la totalidad de CO₂ generado durante la biodegradación de la glucosa.

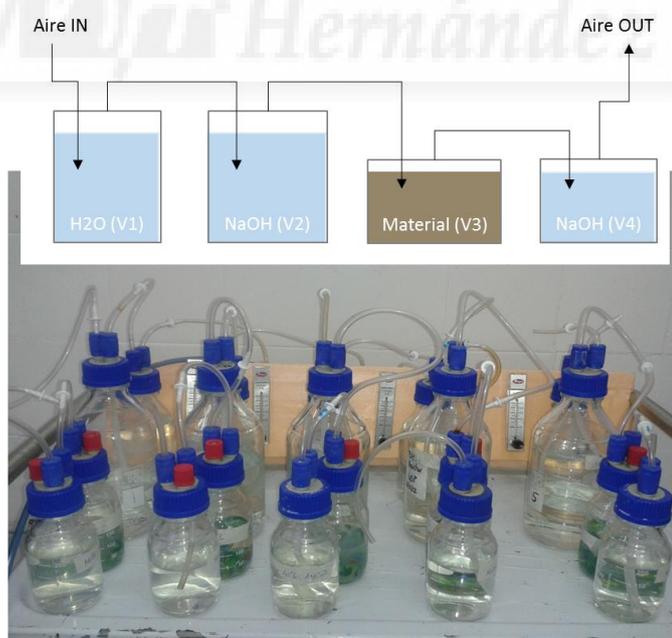


Figura 9 Esquema del montaje por material y prueba de aireación con agua



Figura 10 Vistas lateral y frontal del montaje

Por tanto, se siguió el siguiente procedimiento:

- Se identifican todas los viales de forma adecuada (se anota la tara del vial vacío). Se mezclaron las cantidades de inóculo y material, según la Tabla 4. Se tuvo en cuenta que la mezcla del ensayo debe ocupar unas tres partes del volumen del recipiente de compostaje.
- Se comprobó que el material de ensayo tuvo suficiente carbono orgánico para producir dióxido de carbono en cantidad adecuada para la determinación (Tabla 4). Se requiere un mínimo de $0,4 \text{ g}_{\text{COT}}/\text{g}_{\text{ST}}$.
- Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).
- Se airearon con aire libre de CO_2 y agua (pasando el aire a través de botellas con una disolución de NaOH). Se airearon con aire comprimido. Se comprobó que la velocidad del flujo de aire es la misma a cada vial (10 ml/min).
- Se midió el pH a intervalos regulares. Si el pH es menor de 7 la biodegradación podría inhibirse debido a la acidificación del compost por la rápida degradación del material de ensayo fácilmente degradable.
- Se midió el CO_2 generado en el vial B3 a intervalos regulares de tiempo. Para determinar el CO_2 generado, se utilizó un cromatógrafo de gases (Anexo 5). Como segundo método de determinación del CO_2 generado se determinó la alcalinidad en el vial B4: se tomaron 10 ml de la muestra, se valoraron con HCl

- 1,2 M y FNA hasta cambio de color. Se anotaron los ml de HCl consumidos (Anexo 7).
- A partir de los datos de CO₂ producido, se calculó la biodegradabilidad de cada uno de los ratios ensayados (Figura 11).

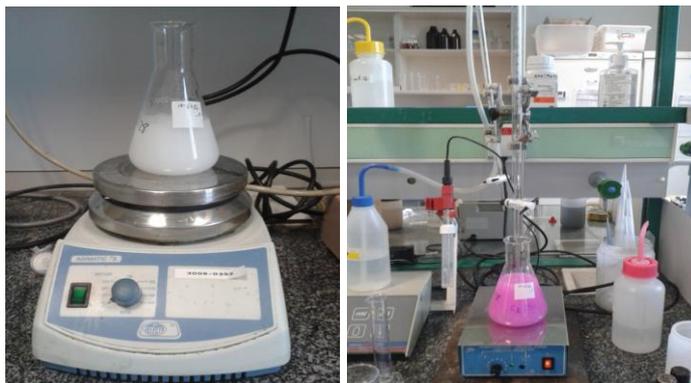


Figura 11 Valoración con HCl 1,2 M y FNA



Figura 12 Incidencia en el seguimiento

Cabe destacar que, durante el seguimiento de este ensayo en particular, fue muy importante el control del nivel de agua y solución de sosa. Se controló visualmente que la humedad no fuese demasiado alta ni baja, vigilando que no hubiese agua libre estancada o aglomeraciones de material (las condiciones muy secas se observan típicamente por la ausencia de condensado en el espacio superior del recipiente de compostaje). Sin embargo el día 6 del ensayo, el nivel de agua del recipiente B4 bajó y

la sosa caustica pasó en la botella con compost (Figura 12). Debido a este incidente, se paró el V4.

En la Tabla 5 se determinó, mediante cálculo, la cantidad total de CO₂ (g). Se calculó como la suma del gC-CO₂ en fase gas (medida cromatográfica) y gC-CO₂ en fase acuosa. Para calcular la cantidad de CO₂ en fase acuosa, se utilizó la ley de Henry (la cantidad de gas disuelta en un líquido a temperatura constante es proporcional a la presión parcial del gas), según la Ecuación 4. Esta cantidad se suma a la determinada en la fase gaseosa y se tiene en cuenta en el cálculo de la biodegradabilidad. A partir de la cantidad total de CO₂, se calcula el porcentaje de biodegradación del material de ensayo para cada intervalo de medición utilizando la Ecuación 5.

$$P_{co2} = K_H \cdot c \quad (\text{Ec.4})$$

$$\text{Biodegradación} = \text{g CO}_2 \text{ total} / \text{g C inicial} \quad (\text{Ec.5})$$

Donde: P_{co2}, presión parcial del CO₂; c, concentración del CO₂; K_H, constante de Henry (K_H (25°C) = 1673 atm); g CO₂ total, cantidad total (gC) de dióxido de carbono generado en cada recipiente de compostaje que contiene el material de ensayo, en gramos por recipiente; g C inicial, cantidad (gC) de C inicial introducido en el material de ensayo introducido en los recipientes de compostaje al principio del ensayo.

Tabla 5 Ensayo 1: Cantidad de CO₂ total

vial	C gas (mol)	C ac (g)	Biodeg. (%C-in)	C total (g)	C (mol)	CO2 (mol)	CO2 (g)
V1	0,00000377	0,34	11%	0,34	0,03	0,03	1,26
V2	0,00000303	0,35	19%	0,35	0,03	0,03	1,29
V3	0,00004755	0,42	7%	0,42	0,03	0,03	1,53
V4	<i>anulado</i>						
V5	0,00004603	0,26	35%	0,26	0,02	0,02	0,96

Se observa que el valor de biodegradación calculado (Tabla5) es mayor que el valor de biodegradación determinado experimentalmente (Tabla 6). Esta diferencia aparece porque el porcentaje de biodegradación (experimental) no incluye la cantidad de C en fase acuosa. Por tanto, se puede concluir que la cantidad de C-CO₂ en fase acuosa influye en el cálculo del porcentaje de biodegradación.

En la Tabla 6 se muestran los valores de ThCO₂ y CO₂ producido durante el ensayo. A partir de estos valores, se calculó la biodegradabilidad de cada uno de los materiales ensayados (Anexo 6) y se construyó la curva de biodegradación en el tiempo (Figura 13).

Tabla 6 Ensayo 1: biodegradabilidad en función del ratio inóculo - material

vial	Inóculo- Material (g:g)	ThCO ₂ (g C)	CO ₂ total (g C)	Duración (días)	Biodeg. (%C-in)
V1	6:1	11,29	1,26	7	7%
V2	10:1	6,78	1,29	7	13%
V3	3:1	22,59	1,53	7	4%
V4	1:1	<i>anulado</i>			
V5	20:1	2,71	0,96	7	31%

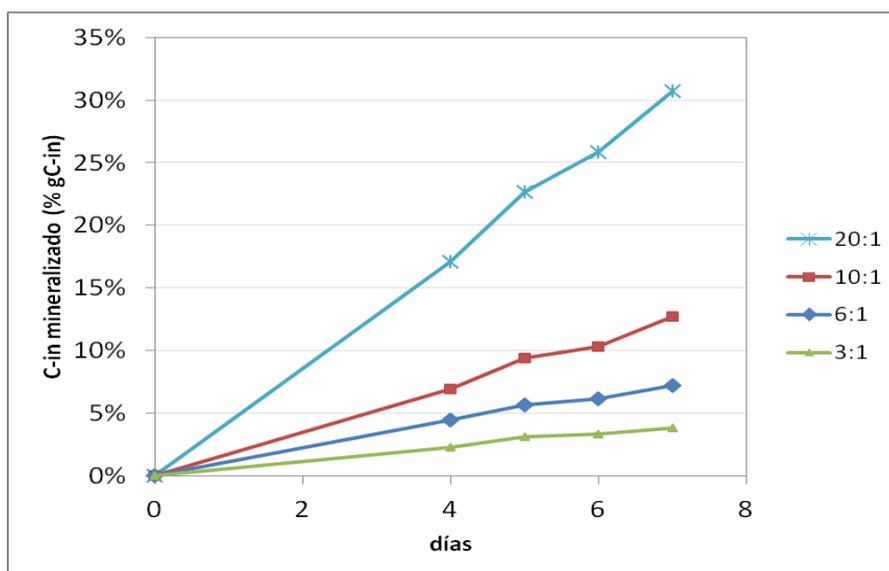


Figura 13 Ensayo 1: evolución del carbono total de la glucosa (C-in) mineralizado

Conclusiones

Se han seleccionado los valores de biodegradabilidad de la Tabla 5 porque incluye el dióxido de carbono generado en la biodegradación y disuelto en la fase líquida. Los resultados en cuanto a porcentaje de biodegradabilidad tras 7 días de ensayo fueron los siguientes:

- El material de ensayo 20:1 alcanzó un 35% de biodegradación.
- El material de ensayo 10:1 alcanzó un 19% de biodegradación.
- El material de ensayo 6:1 alcanzó un 11% de biodegradación.
- El material de ensayo 3:1 alcanzó un 7% de biodegradación.

En conclusión, el ratio inóculo material que mejoró la velocidad y el porcentaje de mineralización mayores fue el correspondiente al ratio 20:1. Por tanto, se eligió este ratio para el ensayo siguiente.

4.6.4. Ensayo 2. Prueba con materiales de referencia

El ensayo 2 se hizo con dos materiales de referencia, celulosa y MaterBi, con el Compost 2 como inóculo. En la Tabla 7 se muestra las cantidades empleadas durante la preparación.

Se siguió el procedimiento descrito en el apartado anterior. Las principales diferencias entre este ensayo y el anterior fueron:

- En este ensayo, se mezclaron las cantidades de inóculos y material necesarias para mantener un ratio inóculo – material de 20:1 en todos los viales (Tabla 7).

Se utilizó el ratio 20:1 porque se observó (ensayo 1) que con este ratio se alcanzó una elevada biodegradación en un tiempo corto.

- Se colocaron los viales en una cámara termostaticada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Se airearon con aire comprimido, comprobando que la velocidad del flujo de aire fuese la misma a cada vial (50 ml/min). Se utilizó un flujo alto para asegurar que

se mantienen las condiciones aeróbicas durante el ensayo a través de cada recipiente de compostaje.

- Se midió el CO₂ generado a intervalos regulares de tiempo, solo por cromatografía de gases (Anexo 8).

Tabla 7 Ensayo 2: cantidades utilizadas

unidades	g	g	g	g	g	gC	ratio	
vial	ST compost	compost	ST material	H2O	material	material	C:M	g mezcla
V1	80,36	120,00	-	40,00	0,00	-	20:1	160,00
V2	80,36	120,00	4,02	44,00	4,10	1,89	20:1	168,10
V3	80,36	120,00	4,02	44,00	4,10	1,89	20:1	168,10
V4	80,36	120,00	4,02	44,00	4,09	2,20	20:1	168,09
V5	80,36	120,00	4,02	44,00	4,09	2,20	20:1	168,09

Cabe destacar que, durante el seguimiento de este ensayo en particular, fue muy importante el control del nivel de líquido (agua y solución de sosa) en las viales V1, V2 y V4. Se controló visualmente que la humedad no fuese demasiado alta ni baja, vigilando que no hubiese agua libre estancada o aglomeraciones de material (las condiciones muy secas se observan típicamente por la ausencia de condensado en el espacio superior del recipiente de compostaje). Sin embargo el día 24 del ensayo, el nivel de agua de los recipientes bajó, la sosa caustica se solidificó y se produjo la obstrucción de los tubos (Figura 14). Debido a este incidente, se paró el ensayo⁷.

De forma similar al ensayo 1, se construyeron las curvas de gas producido y de biodegradación (Figura 15). En la Tabla 8 se presentan los resultados de la biodegradabilidad de cada uno de los materiales, teniendo sólo en cuenta el gas producido.

⁷ Actualmente, está en marcha una repetición del Ensayo 2. Se prevé que éste termine antes de la presentación del TFM ante el tribunal.



Figura 14 Ensayo 2: montaje e incidencia en el seguimiento (cristalización de sosa)

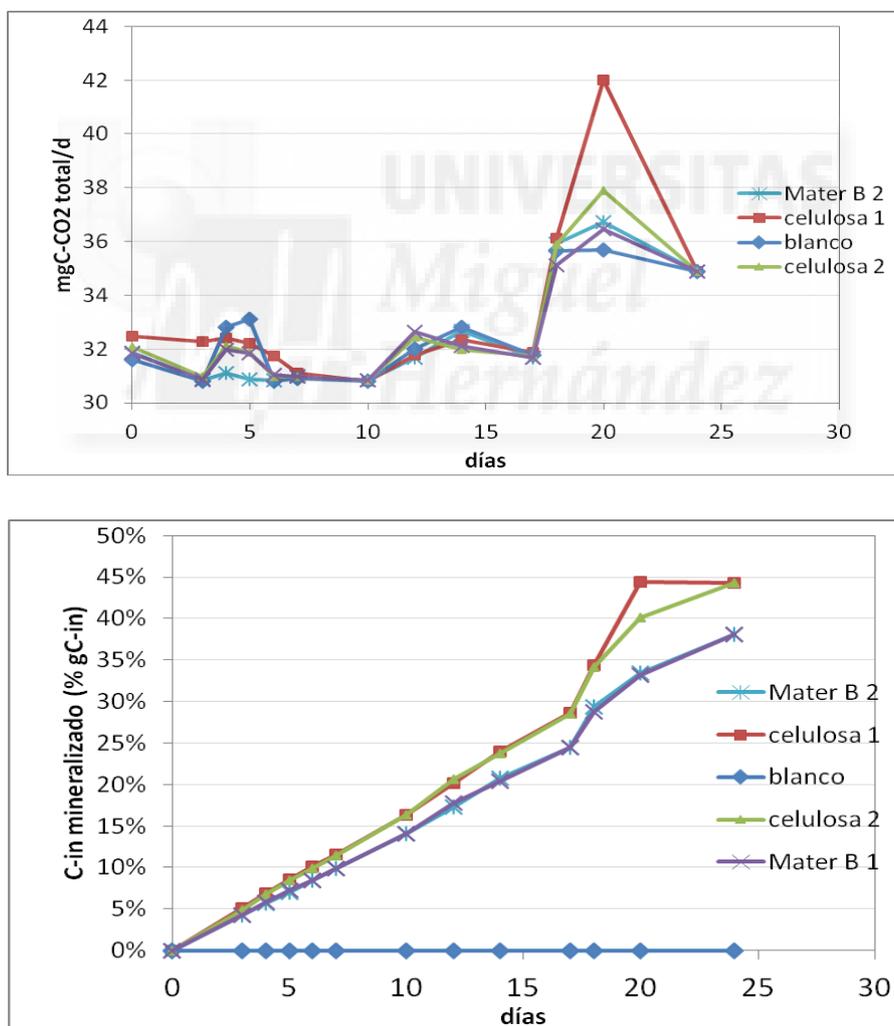


Figura 15 Ensayo 2: evolución del CO₂ producido (arriba) y del carbono total de la celulosa y Mater B (C-in) mineralizado (abajo)

Se calculó la cantidad de CO₂ en fase acuosa (Tabla 9) utilizando la ley de Henry, considerando que K_H es 2084 atm a 35°C. Se observa que el valor de biodegradación estimado es mayor que el valor de biodegradación determinado experimental. Esta diferencia aparece porque el porcentaje de biodegradación (experimental) no incluye y la cantidad de C-CO₂ en fase acuosa.

Tabla 8 Ensayo 2: biodegradabilidad en función del ratio inóculo - material

vial	Inóculo- Material (g:g)	ThCO2 (g C)	CO ₂ total (g C)	Duración (días)	Biodeg. (%C-in)
V1 (blanco)	20:1	-	2,31	24	-
V2 (cel 1)	20:1	6,93	2,44	24	44%
V3 (cel 2)	20:1	6,93	2,40	24	44%
V4 (mb 1)	20:1	8,07	2,43	24	38%
V5 (mb 2)	20:1	8,07	2,42	24	38%

Tabla 9 Ensayo 2: cálculo del CO₂ total

vial	C gas (mol)	C ac (g)	Biodeg. (%C-in)	C total (g)	C (mol)	CO2 (mol)	CO2 (g)
V1	9,82E-06	0,63	-	0,63	0,05	0,05	2,31
V2	9,93E-06	0,67	35%	0,67	0,06	0,06	2,44
V3	9,84E-06	0,66	35%	0,66	0,05	0,05	2,40
V4	9,81E-06	0,66	30%	0,66	0,06	0,06	2,43
V5	9,25E-06	0,66	30%	0,66	0,05	0,05	2,42

Conclusiones

- La determinación de CO₂ producido, en este ensayo, se hizo solo con el cromatógrafo de gases porque ofrece la posibilidad de cuantificar el CO₂ en intervalos de tiempo muy pequeños y constantes; los ensayos son menos laboriosos; posibilidad de detección de alteraciones en los ensayos de forma muy rápida, lo que permite mayor rapidez para realizar ajustes puntuales en los parámetros de ensayo; disminuye los posibles errores como puede ocurrir durante las valoraciones del CO₂.
- Los valores de biodegradación calculados teniendo en cuenta el CO₂ en fase gaseosa o el total (fase gaseosa y líquida) son parecidos a 35°C. Al final del ensayo (24 días), la biodegradación de la celulosa y el MaterBi era de 35% y 30%, respectivamente.



5. CONCLUSIONES

5.1. Revisión bibliográfica

La biodegradabilidad es la capacidad que tienen las sustancias y los materiales orgánicos de descomponerse en sustancias más simples mediante la actividad (enzimática) de microorganismos.

Cuando el proceso biológico se concluye se obtiene una transformación total de las sustancias orgánicas iniciales en moléculas inorgánicas simples: agua, anhídrido carbónico y metano.

La biodegradación está influenciada por la naturaleza química de la sustancia, o material que se quiere biodegradar, y por el ambiente de biodegradación. Los ambientes del compostaje y de la digestión anaeróbica favorecen un ritmo elevado de biodegradación a nivel industrial.

La normalización de las pruebas de biodegradabilidad enfrenta un problema que es inherente a cualquier intento de simulación ambiental in vitro. Cuando se pretende integrar en el laboratorio el mayor número de variables, buscando reflejar la complejidad real de los fenómenos naturales, disminuye también la posibilidad de construir métodos reproducibles y por lo tanto susceptibles de normalización. Así, las pruebas de biodegradabilidad normalizadas deben contar con metodologías experimentales simples y al mismo tiempo aproximarse lo más posible a los fenómenos que realmente suceden en la naturaleza.

5.2. Metodología propuesta

El método propuesto se ha basado fundamentalmente en la norma ISO 14855 (ISO 2005), que evalúa la biodegradabilidad de los plásticos a partir de la cantidad de CO₂ producido mediante la degradación de las muestras en composta madura, mantenida artificialmente a temperaturas elevadas. Este procedimiento presenta el inconveniente que su costo es elevado y la duración de la prueba es de hasta seis meses, lo que lo hace

poco viable para su aplicación cotidiana en la evaluación de los plásticos. El método propuesto en este trabajo pretende ser más general que dicha norma, siendo aplicable a otros materiales orgánicos.

Los principales factores que diferencian la norma ISO 14855 y la metodología propuesta son:

- Proporción inóculo y material. En este ensayo se propuso una relación de la masa seca del inóculo con la masa seca del material del ensayo de 20:1, porque tuvo el mayor porcentaje de mineralización (ensayo 1) y una mayor velocidad de biodegradación, mientras que la norma ISO 14855 propone un ratio de inóculo-material de ensayo de 6:1.
- Seguimiento del CO₂ producido. El seguimiento del CO₂ producido se realizó mediante dos procedimientos, la determinación cromatográfica de la composición de la fase gas de cada vial (Ensayo 1, 2) y la determinación de la alcalinidad en el vial V4 del montaje (Ensayo 1). Sin embargo, se hizo estimó de forma teórica (equilibrio gas-líquido a la presión y temperatura de cada vial) y se tuvo en cuenta en el cálculo del porcentaje de biodegradación.

5.3. Comprobación experimental

En el presente trabajo se ha determinado la biodegradabilidad de materiales de referencia, como forma de validación de la metodología propuesta. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos de biodegradabilidad sobre distintos tipos de polímeros, en concreto la acetato de celulosa y un polímero comercial MaterBi. En base a los ensayos y los resultados correspondientes, se indican las siguientes conclusiones:

- Montaje y seguimiento. El ratio inóculo material que mejoró la velocidad y el porcentaje de mineralización mayores fue el correspondiente al ratio 20:1 (Ensayo 1). Por tanto, se eligió este ratio para el ensayo siguiente. Se ajustó la humedad, antes de la utilización del compost mediante la adición de agua (el contenido en sólidos secos totales debe estar entre 50% y 55%). Se comprobó mediante observación visual que la humedad de la mezcla de ensayo en los

recipientes de compostaje no sea ni demasiado alta ni demasiado baja. Se comprobó el flujo de aire regularmente en cada salida para asegurarse de que no hay fugas en ninguna parte del sistema. Se agitaron regularmente los recipientes de compostaje para asegurar una distribución uniforme y homogénea de humedad. Se midió el pH a intervalos regulares. Durante el seguimiento de este ensayo en particular, fue muy importante el control del nivel de agua y solución de sosa.

- Seguimiento del CO₂ producido. Para calcular el valor de biodegradación (estimado) se tuvo en cuenta el CO₂ total (en fase gaseosa y líquida). Se observó que el valor de biodegradación estimado es mayor que el valor de biodegradación determinado experimental.
- Materiales de referencia. Una vez optimizado el ratio inóculo – material desde el punto de vista de la velocidad de degradación, se obtuvo que la biodegradabilidad de la celulosa era 35 %C, tras 24 días a 35°C, siendo bastante parecido al valor de 35-50 %C en ensayos anaerobios tras 30 días y algo menor al 40-60% C obtenido en ensayos aerobios tras 21 días (Puls y col., 2011; Gu y col., 1993; Gartiser y col., 1998). Respecto al MaterBi, el porcentaje de biodegradación tras 24 días a 35°C fue 30 %C, valor dentro del 25-40 % reportado previamente para polímeros de polilactato como el MaterBi (Chuensangjun y col., 2013). El valor reportado⁸ por el fabricante de MaterBi indica un valor de biodegradación de 15-30% tras 30 días y de 75-100% tras 195 días de ensayo EN 13432:2000 (condiciones aerobias).

⁸ Informe descargado de la web de Novamont Spa (<http://novamont.com/mater-bi>).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1. Bibliografía científica

Abad, M., Puchades, R. 2002. Compostaje de residuos orgánicos generados en la hoya de buñol (Valencia) con fines hortícola. Ed. Asociación para la Promoción Socioeconomica Interior Hoya de Buñol, Valencia.

Abad, M., Noguera, P., Noguera, V., Roig, A., Cegarra, J. y Paredes, C. 1997. Reciclado de residuos orgánicos y su aprovechamiento como sustratos de cultivo. *Actas de Horticultura* 19:92-109.

Aiyuk, S., Amoako J., Raskin, L., van Haandel, A., Verstraete, W., 2004. Removal of carbon and nutrients from domestic wastewater using a low investment, integrated treatment concept. *Water Res.*, 38, 13, 3031-3042.

Amatya, P.L., 1996. Anaerobic treatment of tapioca starch industry wastewater by bench scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. M. Eng. Thesis. Bangkok. Thailand.

Anderson RT, Lovley RD (2000). Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature* 404: 722-723.

Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR, Starkey M. (1999). An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.

Bidlingmaier, W. (1996). Odour emissions from composting plants. En: De Bertoldi, Sequi, P.; Lemmes, B. y Papi, T (Eds.). *The Science of Composting*, vol I, pp. 71-79. Blackie Academic & Professional, London.

Brunetti A, Boari G, Passino R, Rozzi A (1983). Physico-chemical factors affecting start-up in UASB digestors. In *Proceedings of European Symposium on Anaerobic Wastewater Treatment*; Noordwijkerhout, Netherlands, p. 317.

Bueno Márquez, P., Diaz Blanco, M.J., Cabrera, F. (2008). Factores que afectan al proceso de compostaje. En: *Compostaje*, (eds) Moreno Casco, J. y Moral Herrero, R. Mundi Prensa, pp. 111-140.

- Caldwell ME, Garrett RM, Prince RC, Suflita JM. (1998). Anaerobic biodegradation of long chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2191-2195.
- Castaldi, P., Alberti G, Merella, R. y Melis, P. (2005). Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evolution of composting maturity. *Waste Manag.*, 25:209-213.
- Chen Y, Chen JJ, Creamer KS (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technol.*; 99: 4044–4064.
- Chuensangjun Ch., Pechyen Ch., Sirisansaneeyakul S. 2013. Degradation behaviors of different blends of polylactic acid buried in soil. *Energy Procedia* 34: 73-82.
- Climent, M.D., Abad, M. y Aragón, P. 1996. *El Compost de Residuos Sólidos Urbanos (RSU). Sus Características y Aprovechamiento en Agricultura.* Ediciones y Promociones LAV S.L., Valencia.
- Colleran E, Pender S. (2002). Anaerobic biodegradability, methanogenic activity and toxicity test systems: defining the test conditions. En Ligthart J, Nieman H (Eds.) *Proceedings of the Workshop on Harmonisation of Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition Assays*, Lago d'Orta, Italy. pp. 1-10.
- Díaz, M. J., Jiménez, L., Cabrera, F. y De Bertoldi, M. (2004). Using a second order polynomials model to determine the optimum vinasse/grape marc ratio for in vessel composting. *Compost Sci. Util.*, 12(3):273-279.
- Ekinci, K., Keener, H. M. y Elwell, D. L. (2004). Effects of aeration strategies on the composting technology during the 20th century. *Horttechnology*, 15(1): 1697-1708.
- Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, R.C., Harrison, S.H., Euzéby, J., Tindall, B.J., 2007. *Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea, Release 7.7.* Michigan State University.
- Gartiser S, Wallrabenstein M, Stiene G. 1998. *J Environ. Polym. Degrad.* 6:159–173.
- Gu JD., Eberiel DT., S. P. McCarthy, and Gross RA. 1993 Cellulose acetate biodegradability upon exposure to simulated aerobic composting and anaerobic bioreactor environments. *J. Environm. Polym. Degrad.* 1, 143-153.

- Gu JD., Eberiel D., McCarthy SP., Gross RA. 1993. Degradation and mineralization of cellulose acetate in simulated thermophilic compost environments. *J. Environ. Polym. Deg.* 1(4):281-291.
- Haug, R. T. (1993). *The practical Handbook of Compost Engineering*. Lewis Publishers. Boca Ratón. Florida.
- Hee-Sung B, Young-Gyun C, Sang-Eun O, In-Soo K, James ML, Sung-Taik L. (2002). Anaerobic degradation of pyrrolidine and piperidine coupled with nitrate reduction. *Chemosphere* 48: 329-334.
- Hoitink, H. A. J., Tseng, D. Y., Chalmers, J. J. y Tuovinen, O.H. (1995). Characterization of A Bench-Scale System from studying the Biodegradacion of Organic Solid Wastes. *Biotechnol. Progress*, 11(4): 443-51.
- Jhorar, B. S., Phogat, V y Malik, E. (1991). Kinetics of composting rice Straw with glue waste at different C/N ratios in a semiarid environment. *Arid Soil Rest. Rehabil.*, 5:297-306.
- Kaiser KLE (1998). Review of biodegradability tests for developing regulations. *Water Qual. Res. J. Canada* 33: 85-211.
- Kiehl, F. J. (1985). *Fertilizantes orgánicos*. Editora Agronómica Ceres Ltda, São Paulo.
- Liang, C., Das, K. C. y McClendon, R. W. (2003). The influence of temperatura and moisture Contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Biores. Technol.*, 86:136-137.
- Madejón, E., Díaz, M. J., López, R. y Cabrera, F. (2001). Co-composting of sugarbeet vinasse: Inluence of the organic matter nature of the bulking agenst used. *Biores. Technol.*, 76:275-278.
- Madejón, E., Díaz, M. J., López, R. y Cabrera, F. (2002). New approaches to establish optimum moisture content for compostable materials. *Biores. Technol.*, 85:73-78.
- Martí, N., (2006). Phosphorus precipitation in anaerobic digestion process. *Dissertation.com*. Boca Raton, Florida.

- Michel, F. C., Pecchia, J.A y Rigot, J. (2004). Mass and nutrient losses during the Composting of dairy manure amended with sawdust or straw. *Compost Sci.Util.* 12(4):323-334.
- Miyatake, F. y Iwabuchi, K. (2006). Effect of compost temperatura on oxygen uptake rate, specific growth rate and enzymatic activity of microorganisms in dairy cattle manure. *Biores. Technol.*, 97:961-965.
- Nähle, C. (1987). La fermentación metánica de aguas residuales y su aplicación a la industria azucarera. *Tecnología del agua.* 33, 69-85.
- Nyholm, N. (1991). The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1237-1246.
- Ottenbrite RM., Albertsson AC. (1992). Discussion on degradation terminology. En Vert M, Feijen J, Albertsson A, Scott G, Chiellini E (Eds.) *Biodegradable Polymers and Plastics.* The Royal Society of Chemistry. Cambridge, RU. pp. 73-92.
- Painter HA, Reynolds P, Comber S (2003). Application of the headspace CO₂ method to the assessment of the ultimate biodegradability of surfactants: results of a calibration exercise. *Chemosphere* 50: 29-38.
- Painter HA. (1995). Detailed review paper on biodegradability testing. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris, Francia.
- Puls J., Wilson S., Höltel D. 2011. Degradation of cellulose acetate-based materials: a review. *J.Polym.EnvIRON.* 19:152-165.
- Raviv, M. 1998. Horticultural uses of composted material. *Acta Horticulturae* 469: 225-234.
- Reuschenbach P, Pagga U, Strotmann U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related methods. *Water Res.* 37: 1571-1582.
- Richterich K, Steber J. (2001). The time-window - an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants. *Chemosphere* 44: 1649-1654.

Sánchez-Monedero, M.A., Roig A., Paredes, C y Bernal, M. P. (2001). Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Biores. Technol.*, 78(3):301-308.

Siles, J.A., 2010. Reciclado de residuos orgánicos derivados de la industria de fabricación de zumo de naranja y de obtención de biodiesel. Ph.D. Thesis. Universidad de Córdoba, Spain.

Soliva, M. 2001. Compostatge i gestió de residus orgànics. Estudis i Monografies 21. Diputació de Barcelona, Àrea de Medi Ambient, Barcelona.

Strevett K, Davidova I, Suflita JM. (2002). A comprehensive review of the screening methodology for anaerobic biodegradability of surfactants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 143-167.

Suler, D. J. y Finstein, S. (1977). Effect of Temperature, Aeration, and Moisture on CO₂ Formation in Bench-Scale, continuously Thermophilic Composting of Solid Waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(2):345-350.

Thaveesri J (1995). Granulation and stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to substrates and liquid surface tension. Ph.D. Thesis. Ghent University, Belgium.

Wheatley A (1990). *Anaerobic digestion: a Waste Treatment Technology*. Elsevier, London, UK.

Zhu, N. W. (2006). Composting of high moisture content swine manure with corncob in a pilot-scale aerated static bin system. *Biores. Technol.*, 97(15):1870-1875.

6.2. Normas consultadas

OCDE (1992). Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.

OCDE (2001c). Proposal for a New Guideline 310. Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test). Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.

OCDE (2002a). Guidelines for the Testing of Chemicals 307. Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil. Organisation for Economic Cooperation and Development. París, Francia.

UNE 13432: 2001/AC. Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programas de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje.

UNE-EN ISO 14851:2005. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de los materiales plásticos en medio acuoso. Método según la medición de la demanda de oxígeno en un respirómetro cerrado (ISO 14851:1999).

UNE-EN ISO 14852:2005. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final y desintegración de materiales plásticos en condiciones de compostaje controladas. Método según el análisis de dióxido de carbono generado (ISO 14852:1999).

UNE-EN ISO 14852:2005. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de los materiales plásticos en medio acuoso. Método según el análisis de dióxido de carbono generado (ISO 14852:1999).

UNE-EN ISO 14855-1: 2005. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en condiciones de compostaje controladas, método según el análisis de Carbono generado. Parte I. Método General.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1. Determinación del CT

Hoja de cálculo para determinación del análisis elemental de CHN

DATA	Analista	CODI	Peso (g)	Posició	Método	C (%)	C (mg)	H (%)	H (mg)	N (%)	N (mg)	N (Area)	U. Promi	Desve st	% error	U. Promi	Desve st	% error	N. Promi	Desve st	% error	Obs.
																						Repetir
																						Repetir

7.2. Anexo 2. Determinación del contenido de ST y SV del compost

Hoja de cálculo para determinación

CODI	DATA	Analista	n° Caps.	Tara Caps. (A)	Cáp.-Mostra (B)	Pes 105°C (C)	Pes 550°C (D)	N (% en pes)	ST (miliones)	Desviant	Error (%)	SV (% en pes)	SV (miliones)	Desviant	Error (%)	Obs.
16-02850	21/06/16	LTE	2	25.8724	2.0633	30.0924	26.0992	69.11	753.11	200.00	-27%	-32.48	-32.48	-788.43	206.40	-26%
16-02850	29/06/16	LTE	2	35.3444	43.5191	40.9381	39.8513	66.85	66.97	0.24	0%	27.61	27.61	27.63	0.03	0%

7.3. Anexo 3. Determinación del contenido de ST y SV de la glucosa

Hoja de cálculo para determinación

Control	n° Capa	CARR	Glucosa	Celda	Agua	Cap-Muestra (g)	Pesa 105°C (C)	Pesa 500°C (C)	ST (% en seco)	ST (% en agua)	% ST exp	% ST fact	% SV exp	% SV fact	% SV factor
Blanco															
COD	DATA	Analista	n° Capa	Tarea Capa	Cap-Muestra (g)	Pesa 105°C (C)	Pesa 500°C (C)	ST (% en seco)	ST (% en agua)	Decolor	Acido (%)	SV (% en seco)	SV (% en agua)	Decolor	Acido (%)
R-02877-L1	22/06/16	LTE	1	22-8516	25-4123	25-4110	22-8530	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95

7.4. Anexo 4. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Inoculo 2 (compost 2), celulosa, MaterBi

Hoja de cálculo para determinación

CODI	DATA	Analista	DQO Total (mg/l)	Tabo	Peso (g)	Factor MgO4/2H2 (g/l)	EXMOR Muestra (g)	Dilución	Abs	DQO (mg O2/g)	DQO (mg O2/g)	Promig redondead	Desv
Hanco celti					0,1990			1,0	0,000				
Hanco MgSi					0,1997			1,0	0,000	-540	-541	-541	-541
celulosa					0,0500	0,1000	2,4728	0,1943	24,7	0,457	17,032	1739,543	1739,543
compost					0,0520	0,1040	2,3572	0,1993	24,4	0,174	6,037	1067,719	1067,719

7.5. Anexo 5. Medición del CO₂ por cromatografía del Ensayo 1

fecha	t(d)	vial	cg (umoles)			fracción molar (X)		
			N ₂	CH ₄	CO ₂	N ₂	CH ₄	CO ₂
23/06/2016	0	C1	8,74E-06	1,66E-07	6,28E-08	0,97	0,02	0,01
23/06/2016	0	C2	8,40E-06	1,66E-07	6,07E-08	0,97	0,02	0,01
23/06/2016	0	C3	7,86E-06	1,66E-07	6,33E-08	0,97	0,02	0,01
23/06/2016	0	C4	8,87E-06	1,66E-07	6,25E-08	0,97	0,02	0,01
23/06/2016	0	C5	8,51E-06	1,66E-07	6,10E-08	0,97	0,02	0,01
27/06/2016	4	C1	8,97E-06	1,66E-07	6,99E-08	0,97	0,02	0,01
27/06/2016	4	C2	8,82E-06	1,66E-07	6,09E-08	0,97	0,02	0,01
27/06/2016	4	C3	8,24E-06	1,66E-07	7,03E-08	0,97	0,02	0,01
27/06/2016	4	C4	9,10E-06	1,66E-07	5,79E-08	0,98	0,02	0,01
27/06/2016	4	C5	8,86E-06	1,66E-07	5,96E-08	0,98	0,02	0,01
28/06/2016	5	C1	9,20E-06	1,66E-07	7,12E-08	0,97	0,02	0,01
28/06/2016	5	C2	8,33E-06	1,66E-07	7,16E-08	0,97	0,02	0,01
28/06/2016	5	C3	9,04E-06	1,66E-07	8,42E-08	0,97	0,02	0,01
28/06/2016	5	C4	7,84E-06	1,66E-07	6,66E-08	0,97	0,02	0,01
28/06/2016	5	C5	8,05E-06	1,66E-07	6,69E-08	0,97	0,02	0,01
29/06/2016	6	C1	8,78E-06	1,66E-07	5,97E-08	0,97	0,02	0,01
29/06/2016	6	C2	7,91E-06	1,66E-07	6,04E-08	0,97	0,02	0,01
29/06/2016	6	C3	8,63E-06	1,66E-07	6,93E-08	0,97	0,02	0,01
29/06/2016	6	C4	8,88E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
29/06/2016	6	C5	8,88E-06	1,66E-07	6,05E-08	0,98	0,02	0,01
30/06/2016	7	C1	8,33E-06	1,66E-07	6,04E-08	0,97	0,02	0,01
30/06/2016	7	C2	8,50E-06	1,66E-07	6,67E-08	0,97	0,02	0,01
30/06/2016	7	C3	8,81E-06	1,66E-07	6,75E-08	0,97	0,02	0,01
30/06/2016	7	C4						
30/06/2016	7	C5	8,13E-06	1,66E-07	6,25E-08	0,97	0,02	0,01

7.6. Anexo 6. Cantidad acumulada de CO₂ en el Ensayo 1

V1 - ratio inculo: sustrato 6:1

								3,08
tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,28E-08	0,22	15,92	0,23	16,58	32,50	0%
4	1,66E-07	6,99E-08	0,22	15,92	0,26	18,46	34,38	4%
5	1,66E-07	7,12E-08	0,22	15,92	0,26	18,80	34,72	6%
6	1,66E-07	5,97E-08	0,22	15,92	0,22	15,75	31,68	6%
7	1,66E-07	6,04E-08	0,22	15,92	0,22	15,93	31,86	7%

V2 - ratio inculo: sustrato 10:1

								1,85
tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,07E-08	0,22	15,92	0,22	16,03	31,96	0%
4	1,66E-07	6,09E-08	0,22	15,92	0,22	16,09	32,01	7%
5	1,66E-07	7,16E-08	0,22	15,92	0,26	18,91	34,83	9%
6	1,66E-07	6,04E-08	0,22	15,92	0,22	15,93	31,86	10%
7	1,66E-07	6,67E-08	0,22	15,92	0,24	17,62	33,54	13%

V3 - ratio inculo: sustrato 3:1

								6,16
tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,33E-08	0,22	15,92	0,23	16,71	32,63	0%
4	1,66E-07	7,03E-08	0,22	15,92	0,26	18,56	34,48	2%
5	1,66E-07	8,42E-08	0,22	15,92	0,31	22,23	38,16	3%
6	1,66E-07	6,93E-08	0,22	15,92	0,25	18,31	34,23	3%
7	1,66E-07	6,75E-08	0,22	15,92	0,25	17,81	33,74	4%

V4 - ratio inculo: sustrato 1:1

								18,48
tiempo (d)	moles CH4	moles CO2	ngC-CH4	mgC-CH4/d	ngC-CO2	mgC-CO2/d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,25E-08	0,22	15,92	0,23	16,51	32,43	0%
4	1,66E-07	5,79E-08	0,22	15,92	0,21	15,29	31,21	1%
5	1,66E-07	6,66E-08	0,22	15,92	0,24	17,59	33,51	1%
6	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,92	0,21	14,90	30,82	1%
Anulado								

V5 - ratio inculo: sustrato 20:1

								0,74
tiempo (d)	moles CH4	moles CO2	ngC-CH4	mgC-CH4/d	ngC-CO2	mgC-CO2/d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,10E-08	0,22	15,92	0,22	16,12	32,04	0%
4	1,66E-07	5,96E-08	0,22	15,92	0,22	15,72	31,65	17%
5	1,66E-07	6,69E-08	0,22	15,92	0,25	17,67	33,60	23%
6	1,66E-07	6,05E-08	0,22	15,92	0,22	15,96	31,89	26%
7	1,66E-07	6,25E-08	0,22	15,92	0,23	16,51	32,43	31%

7.7. Anexo 7. Valoración alcalinidad en el Ensayo 1

Valoración CO₂ generado – método de absorción completa en una disolución básica

mL HCL (Recipiente 900 ml con 250 mL NaOH 40%)	mL HCL (Recipiente 250 ml con 250 mL NaOH 40%)	(g) Cantidad acumulada de CO ₂
69,7	70,1	2,85
60,8	63,8	3,08
59	68,5	3,13
70,4	60,5	2,83
65	62,4	2,97

7.8. Anexo 8. Medición del CO₂ por cromatografía del Ensayo 2

fecha	t(d)	vial	cg (umoles)			fracción molar (X)		
			N2	CH4	CO2	N2	CH4	CO2
01/07/2016	0	C1	7,84E-06	1,66E-07	5,93E-08	0,97	0,02	0,01
01/07/2016	0	C2	8,73E-06	1,66E-07	6,27E-08	0,97	0,02	0,01
01/07/2016	0	C3	8,82E-06	1,66E-07	6,11E-08	0,97	0,02	0,01
01/07/2016	0	C4	7,85E-06	1,66E-07	6,03E-08	0,97	0,02	0,01
01/07/2016	0	C5	8,75E-06	1,66E-07	6,04E-08	0,97	0,02	0,01
04/07/2016	3	C1	9,23E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
04/07/2016	3	C2	8,93E-06	1,66E-07	6,20E-08	0,98	0,02	0,01
04/07/2016	3	C3	8,60E-06	1,66E-07	5,70E-08	0,97	0,02	0,01
04/07/2016	3	C4	8,89E-06	1,66E-07	5,66E-08	0,98	0,02	0,01
04/07/2016	3	C5	8,71E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
05/07/2016	4	C1	8,90E-06	1,66E-07	6,39E-08	0,97	0,02	0,01
05/07/2016	4	C2	8,84E-06	1,66E-07	6,24E-08	0,97	0,02	0,01
05/07/2016	4	C3	8,82E-06	1,66E-07	6,13E-08	0,97	0,02	0,01
05/07/2016	4	C4	8,88E-06	1,66E-07	6,07E-08	0,98	0,02	0,01
05/07/2016	4	C5	8,74E-06	1,66E-07	5,74E-08	0,98	0,02	0,01
06/07/2016	5	C1	8,95E-06	1,66E-07	6,51E-08	0,97	0,02	0,01
06/07/2016	5	C2	8,84E-06	1,66E-07	6,17E-08	0,97	0,02	0,01
06/07/2016	5	C3	8,91E-06	1,66E-07	6,04E-08	0,98	0,02	0,01
06/07/2016	5	C4	8,93E-06	1,66E-07	6,03E-08	0,98	0,02	0,01
06/07/2016	5	C5	9,12E-06	1,66E-07	5,66E-08	0,98	0,02	0,01
07/07/2016	6	C1	1,19E-05	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,01	0,00
07/07/2016	6	C2	9,61E-06	1,66E-07	5,99E-08	0,98	0,02	0,01
07/07/2016	6	C3	9,17E-06	1,66E-07	5,69E-08	0,98	0,02	0,01
07/07/2016	6	C4	9,17E-06	1,66E-07	5,72E-08	0,98	0,02	0,01
07/07/2016	6	C5	9,12E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
08/07/2016	7	C1	9,24E-06	1,66E-07	5,68E-08	0,98	0,02	0,01
08/07/2016	7	C2	8,93E-06	1,66E-07	5,75E-08	0,98	0,02	0,01
08/07/2016	7	C3	9,08E-06	1,66E-07	5,70E-08	0,98	0,02	0,01
08/07/2016	7	C4	8,91E-06	1,66E-07	5,69E-08	0,98	0,02	0,01
08/07/2016	7	C5	9,02E-06	1,66E-07	5,71E-08	0,98	0,02	0,01
11/07/2016	10	C1	1,04E-05	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
11/07/2016	10	C2	1,00E-05	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01

11/07/2016	10	C3	9,52E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
11/07/2016	10	C4	9,08E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
11/07/2016	10	C5	9,31E-06	1,66E-07	5,64E-08	0,98	0,02	0,01
13/07/2016	12	C1	8,61E-06	1,66E-07	6,09E-08	0,97	0,02	0,01
13/07/2016	12	C2	8,79E-06	1,66E-07	6,00E-08	0,97	0,02	0,01
13/07/2016	12	C3	7,64E-06	1,66E-07	6,25E-08	0,97	0,02	0,01
13/07/2016	12	C4	7,77E-06	1,66E-07	6,33E-08	0,97	0,02	0,01
13/07/2016	12	C5	7,98E-06	1,66E-07	5,96E-08	0,97	0,02	0,01
15/07/2016	14	C1	9,23E-06	1,66E-07	6,39E-08	0,98	0,02	0,01
15/07/2016	14	C2	9,17E-06	1,66E-07	6,22E-08	0,98	0,02	0,01
15/07/2016	14	C3	9,07E-06	1,66E-07	6,08E-08	0,98	0,02	0,01
15/07/2016	14	C4	9,02E-06	1,66E-07	6,12E-08	0,98	0,02	0,01
15/07/2016	14	C5	8,99E-06	1,66E-07	6,34E-08	0,98	0,02	0,01
18/07/2016	17	C1	9,25E-06	1,66E-07	6,01E-08	0,98	0,02	0,01
18/07/2016	17	C2	9,28E-06	1,66E-07	6,05E-08	0,98	0,02	0,01
18/07/2016	17	C3	8,36E-06	1,66E-07	5,99E-08	0,97	0,02	0,01
18/07/2016	17	C4	8,66E-06	1,66E-07	5,96E-08	0,97	0,02	0,01
18/07/2016	17	C5	8,45E-06	1,66E-07	5,96E-08	0,97	0,02	0,01
19/07/2016	18	C1	9,38E-06	1,79E-07	7,00E-08	0,97	0,02	0,01
19/07/2016	18	C2	9,50E-06	1,79E-07	7,18E-08	0,97	0,02	0,01
19/07/2016	18	C3	9,98E-06	1,79E-07	7,09E-08	0,98	0,02	0,01
19/07/2016	18	C4	9,50E-06	1,79E-07	6,79E-08	0,97	0,02	0,01
19/07/2016	18	C5	1,08E-05	1,79E-07	7,10E-08	0,98	0,02	0,01
21/07/2016	20	C1	8,86E-06	1,79E-07	7,01E-08	0,97	0,02	0,01
21/07/2016	20	C2	9,26E-06	1,79E-07	9,40E-08	0,97	0,02	0,01
21/07/2016	20	C3	7,95E-06	1,79E-07	7,85E-08	0,97	0,02	0,01
21/07/2016	20	C4	8,22E-06	1,79E-07	7,30E-08	0,97	0,02	0,01
21/07/2016	20	C5	8,59E-06	1,79E-07	7,40E-08	0,97	0,02	0,01
25/07/2016	24	C1	9,41E-06	1,79E-07	6,70E-08	0,97	0,02	0,01
25/07/2016	24	C2	9,36E-06	1,79E-07	6,70E-08	0,97	0,02	0,01
25/07/2016	24	C3	9,52E-06	1,79E-07	6,70E-08	0,97	0,02	0,01
25/07/2016	24	C4	9,40E-06	1,79E-07	6,70E-08	0,97	0,02	0,01
25/07/2016	24	C5	9,47E-06	1,79E-07	6,70E-08	0,97	0,02	0,01

7.9. Anexo 9. Cantidad acumulada de CO₂ en el Ensayo 2

V1- Compost C1 - Blanco:

tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	5,93E-08	0,22	15,92	0,22	15,67	31,59	#DIV/0!
3	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,92	0,21	14,90	30,82	#DIV/0!
4	1,66E-07	6,39E-08	0,22	15,92	0,23	16,87	32,80	#DIV/0!
5	1,66E-07	6,51E-08	0,22	15,92	0,24	17,20	33,12	#DIV/0!
6	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,92	0,21	14,90	30,82	#DIV/0!
7	1,66E-07	5,68E-08	0,22	15,92	0,21	14,99	30,92	#DIV/0!
10	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,92	0,21	14,90	30,82	#DIV/0!
12	1,66E-07	6,09E-08	0,22	15,92	0,22	16,07	32,00	#DIV/0!
14	1,66E-07	6,39E-08	0,22	15,92	0,23	16,87	32,80	#DIV/0!
17	1,66E-07	6,01E-08	0,22	15,92	0,22	15,86	31,79	#DIV/0!
18	1,79E-07	7,00E-08	0,24	17,18	0,26	18,47	35,65	#DIV/0!
20	1,79E-07	7,01E-08	0,24	17,18	0,26	18,50	35,68	#DIV/0!
24	1,79E-07	6,70E-08	0,24	17,18	0,25	17,69	34,87	#DIV/0!

V2- Celulosa 1:

tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,27E-08	0,22	15,92	0,23	16,55	32,48	0%
3	1,66E-07	6,20E-08	0,22	15,92	0,23	16,36	32,28	5%
4	1,66E-07	6,24E-08	0,22	15,92	0,23	16,48	32,41	7%
5	1,66E-07	6,17E-08	0,22	15,92	0,23	16,30	32,22	9%
6	1,66E-07	5,99E-08	0,22	15,92	0,22	15,82	31,75	10%
7	1,66E-07	5,75E-08	0,22	15,92	0,21	15,19	31,11	12%
10	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,92	0,21	14,90	30,82	16%
12	1,66E-07	6,00E-08	0,22	15,92	0,22	15,85	31,77	20%
14	1,66E-07	6,22E-08	0,22	15,92	0,23	16,41	32,34	24%
17	1,66E-07	6,05E-08	0,22	15,92	0,22	15,96	31,89	29%
18	1,79E-07	7,18E-08	0,24	17,18	0,26	18,94	36,12	34%
20	1,79E-07	9,40E-08	0,24	17,18	0,34	24,83	42,01	44%
24	1,79E-07	6,70E-08	0,24	17,18	0,25	17,69	34,87	44%

V3- Celulosa 2:

								1,89
tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,11E-08	0,22	15,94	0,22	16,13	32,07	0%
3	1,66E-07	5,70E-08	0,22	15,94	0,21	15,05	30,98	5%
4	1,66E-07	6,13E-08	0,22	15,94	0,22	16,18	32,12	7%
5	1,66E-07	6,04E-08	0,22	15,94	0,22	15,95	31,88	8%
6	1,66E-07	5,69E-08	0,22	15,94	0,21	15,02	30,96	10%
7	1,66E-07	5,70E-08	0,22	15,94	0,21	15,05	30,98	11%
10	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,94	0,21	14,89	30,83	16%
12	1,66E-07	6,25E-08	0,22	15,94	0,23	16,50	32,44	21%
14	1,66E-07	6,08E-08	0,22	15,94	0,22	16,05	31,99	24%
17	1,66E-07	5,99E-08	0,22	15,94	0,22	15,81	31,75	29%
18	1,79E-07	7,09E-08	0,24	17,18	0,26	18,72	35,90	34%
20	1,79E-07	7,85E-08	0,24	17,18	0,29	20,72	37,91	40%
24	1,79E-07	6,70E-08	0,24	17,18	0,25	17,69	34,87	44%

V4 - Mater B 1:

								2,20
tiempo (d)	moles CH ₄	moles CO ₂	ngC-CH ₄	mgC-CH ₄ /d	ngC-CO ₂	mgC-CO ₂ /d	mgC/d	%gC-in
0	1,66E-07	6,03E-08	0,22	15,94	0,22	15,92	31,86	0%
3	1,66E-07	5,66E-08	0,22	15,94	0,21	14,94	30,88	4%
4	1,66E-07	6,07E-08	0,22	15,94	0,22	16,02	31,96	6%
5	1,66E-07	6,03E-08	0,22	15,94	0,22	15,92	31,86	7%
6	1,66E-07	5,72E-08	0,22	15,94	0,21	15,10	31,04	8%
7	1,66E-07	5,69E-08	0,22	15,94	0,21	15,02	30,96	10%
10	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,94	0,21	14,89	30,83	14%
12	1,66E-07	6,33E-08	0,22	15,94	0,23	16,71	32,65	18%
14	1,66E-07	6,12E-08	0,22	15,94	0,22	16,16	32,09	20%
17	1,66E-07	5,96E-08	0,22	15,94	0,22	15,73	31,67	24%
18	1,79E-07	6,79E-08	0,24	17,18	0,25	17,93	35,11	29%
20	1,79E-07	7,30E-08	0,24	17,18	0,27	19,27	36,46	33%
24	1,79E-07	6,70E-08	0,24	17,18	0,25	17,69	34,87	38%

V5- Mater B 2:

								2,20
tiempo (d)	moles CH4	moles CO2	ngC-CH4	mgC-CH4/d	ngC-CO2	mgC-CO2/d	mgC/d	% gC-in
0	1,66E-07	6,04E-08	0,22	15,94	0,22	15,95	31,88	0%
3	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,94	0,21	14,89	30,83	4%
4	1,66E-07	5,74E-08	0,22	15,94	0,21	15,15	31,09	6%
5	1,66E-07	5,66E-08	0,22	15,94	0,21	14,94	30,88	7%
6	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,94	0,21	14,89	30,83	8%
7	1,66E-07	5,71E-08	0,22	15,94	0,21	15,07	31,01	10%
10	1,66E-07	5,64E-08	0,22	15,94	0,21	14,89	30,83	14%
12	1,66E-07	5,96E-08	0,22	15,94	0,22	15,73	31,67	17%
14	1,66E-07	6,34E-08	0,22	15,94	0,23	16,74	32,67	21%
17	1,66E-07	5,96E-08	0,22	15,94	0,22	15,73	31,67	24%
18	1,79E-07	7,10E-08	0,24	17,18	0,26	18,74	35,93	29%
20	1,79E-07	7,40E-08	0,24	17,18	0,27	19,54	36,72	33%
24	1,79E-07	6,70E-08	0,24	17,18	0,25	17,69	34,87	38%

