

Requisitos para validar los ensayos de medición del Potencial Bioquímico de Metano (PBM)*

Christof Holliger, Hélène Fruteau de Laclos, Sasha D. Hafner,
Konrad Koch, Sören Weinrich, Sergi Astals, Madalena Alves,
Diana Andrade, Irini Angelidaki, Lise Appels, Samet Azman,
Alexandre Bagnoud Urs Baier, Yadira Bajon Fernandez, Jan Bartacek,
Federico Battista, David Bolzonella, Claire Bougrier, Camilla Braguglia,
Pierre Buffière, Marta Carballa, Arianna Catenacci, Vasilis Dandikas,
Fabian de Wilde, Sylvanus Ekwe, Elena Ficara, Ioannis Fotidis,
Jean-Claude Frigon, Agata Gallipoli, Jörn Heerenklage, Pavel Jenicek,
Judith Krautwald, Ralph Lindeboom, Jing Liu, Javier Lizasoain,
Rosa Marchetti, Florian Monlau, Mihaela Nistor, Hans Oechsner,
João Vítor Oliveira, André Pauss, Sébastien Pommier, Francisco Raposo,
Thierry Ribeiro, Christian Schaum, Els Schuman, Sebastian Schwede,
Mariangela Soldano, Anton Taboada, Michel Torrijos, Miriam van Eekert,
Jules van Lier, Isabella Wierinck

March 1, 2021

*Documento número 100. Esta es una traducción al español
realizada por Sergi Astals y Glen B. Madrigal del documento en
inglés (versión 1.9). En caso de duda el documento en inglés
prevalece sobre esta traducción. Este documento forma parte de
una serie de documentos dedicados a la estandarización de los
ensayos de medición del potencial bioquímico de metano.[†]*

*Citación recomendada: Holliger, C.; Fruteau de Laclos, H.; Hafner, S.D.; Koch, K.; Weinrich, S.; Astals, S.; et al. Requirements for measurement and validation of biochemical methane potential (BMP). Standard BMP Methods document 100, version 1.9. Available online: <https://www.dbfz.de/en/BMP> (accessed on February 24, 2021).

En <https://www.dbfz.de/en/projects/bmp/methods> encontraréis un documento BibTeX para importar la referencia al gestor de referencias.

[†]Para más información y otros documentos visite <https://www.dbfz.de/en/BMP>. Para ver el historial de versiones y proponer cambios visite <https://github.com/sashahafner/BMP-methods>.

1 Introducción

Este documento presenta los requisitos mínimos para la medición y validación del potencial bioquímico de metano (o potencial de biometanización (PBM)). Este documento representa el consenso de más de 50 investigadores en digestión anaeróbica. La lista de requisitos es la misma que en la publicación de acceso abierto de [Holliger et al. \[2021\]](#). Para obtener detalles sobre el desarrollo de estos requisitos, consulte los documentos de acceso abierto [Holliger et al. \[2016\]](#) y [Hafner et al. \[2020c\]](#).

2 Requisitos para validar los resultados

2.1 Análisis del inóculo y sustrato

Determinar la concentración de sólidos volátiles (SV) del inóculo y del sustrato es necesario para determinar la cantidad necesaria de ambos para alcanzar la relación inóculo-sustrato deseada y para calcular el potencial de biometanización. Documentos explicando detalladamente el protocolo de medición de sólidos totales (ST) y SV, incluye el manual de la US EPA [[EPA, 2001](#)] (acceso abierto) u otras fuentes (por ejemplo, [Strach \[2020\]](#) (acceso abierto) o [Baird et al. \[2017\]](#)). Brevemente:

1. Sólidos totales (ST). Medir para el inóculo y todos los sustratos por triplicado, secando una muestra representativa a 105°C hasta peso constante. Los ST solo se necesitan como paso previo a la determinación de los SV.
2. Sólidos volátiles (SV). Medir para el inóculo y todos los sustratos por triplicado, introduciendo la muestra seca en una mufla a 550°C hasta peso constante. Los SV se determinan a partir de la pérdida de masa.

2.2 Dispositivo experimental y duración del *batch*

1. Experimento. Todos los experimentos tienen que incluir tres tipos de ensayos: ensayo que solo contienen inóculo (“blanco”), ensayo con inóculo y celulosa microcristalina (control positivo)¹, y un ensayo con inóculo y sustrato para cada uno de los sustratos.
2. Replicas. Todos los ensayos deben realizarse, como mínimo, por triplicado.² El número mínimo de botellas para un ensayo de biometanización es 9, incluyendo 3 de blanco, 3 de control positivo (celulosa) y 3 de sustrato.

¹Otros compuestos pueden ser usados como control positivo pero, a día de hoy, solo la celulosa ha sido analizada extensivamente para poder establecer los criterios de validación de la Sección 4 [[Hafner et al., 2020c](#)].

²Si una botella se daña durante el ensayo, quedando solo 2 para esa condición, los resultados no podrán ser validados. Consecuentemente, se recomienda incluir 4 replicados para cada condición, especialmente para el blanco. Los *outliers* se pueden eliminar si hay un motivo para sospechar que hubo un error en la medición (p.ej. fuga), pero para poder validar los resultados el número de replicas con la que se calcula el PBM debe ser, como mínimo, 3.

3. Duración. Los ensayos *batch* se pueden finalizar cuando la producción diaria de metano (CH_4) durante 3 días consecutivos sea inferior al 1.0% de la producción total neta de CH_4 del sustrato (CH_4 producido por el sustrato después de restar la producción de metano promedio de los blancos). Para métodos manuales u otro tipo de métodos en donde las mediciones no son realizadas diariamente, los ensayos se pueden finalizar cuando la producción de metano en un intervalo de tiempo superior a 3 días represente menos del 1% del total (o cuando varios intervalos que engloben más de 3 días represente menos del 1%). Cuando se analizan varios sustratos, un sustrato se puede dejar de analizar cuando todas las replicas del sustrato alcanzan este criterio. Los blancos deben ser analizados hasta que todos los otros ensayos hayan alcanzado el criterio del 1%. Finalizar los ensayos después de que se haya alcanzado el criterio del 1% no supone ningún problema, es más, puede ayudar a alcanzar los criterios de validación descritos en la Sección 4.

3 Cálculos

1. Tratamiento de datos. El volumen de CH_4 en condiciones estándar (seco, 0°C , 101.325 kPa) se calcula utilizando datos experimentales y ambientales siguiendo cálculos estandarizados.³
2. Unidades. El PBM es expresado como el volumen de CH_4 estandarizado (seco, 0°C , 101.325 kPa, también denominado volumen “normal”) por unidad de masa orgánica añadida del sustrato (normalmente sólidos volátiles pero también se puede usar la demanda química de oxígeno (DQO)). Los resultados normalmente se reportan como $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \text{ gSV}^{-1}$.
3. Cálculo del PBM. El PBM de los sustratos (incluyendo la celulosa) se calcula restando la producción promedio de CH_4 del inóculo (de los blancos) de la producción de CH_4 total de los ensayos con inóculo y sustrato, normalizando por la masa de SV añadida. En el cálculo del PBM se debe tener en cuenta diferencias de masa de inóculo y sustrato en los diferentes ensayos y botellas. Los cálculos deben seguir un protocolo estandarizado⁴.
4. Cálculo de la desviación estándar. La desviación estándar de cada PBM ($n \geq 3$) debe considerar la variabilidad de los blancos y del ensayo en cuestión, así como la variabilidad en la determinación de los SV⁵.

³Esta colección de documentos (<https://www.dbfz.de/en/BMP>) incluye documentos donde se describe detalladamente los cálculos para diferentes sistemas de medición del PBM: volumétrico (documento 201) [Hafner et al., 2020f], manométrico (documento 202) [Hafner et al., 2020a], gravimétrico (documento 203) [Hafner et al., 2020g], y densidad de gases (documento 204) [Hafner et al., 2020d].

⁴Los cálculos necesarios para calcular el PBM se describen en el documento 200 de esta colección [Hafner et al., 2020b].

⁵Ver documento 200 [Hafner et al., 2020b].

4 Criterios de validación

Los ensayos de biometanización que cumplan *todos* los criterios que se describen a continuación se podrán considerar “validados”⁶. Si no se cumplen todos los criterios, los resultados no se considerarán validados y se deberá repetir el experimento (o los ensayos que no hayan cumplido los criterios).

1. Todos los requisitos descritos en la Sección 2 se cumplen (incluyendo la duración del ensayo) y los cálculos se han realizado como se describe en la Sección 3.
2. El PBM promedio de la celulosa está entre 340 and 395 NmL_{CH₄} gSV⁻¹.
3. La desviación estándar relativa del PBM de la celulosa (desviación estándar, incluyendo la variabilidad de los blancos, sustratos, y SV, dividido por el PBM promedio) es igual o inferior al 6%.

References

- R. B. Baird, A. D. Eaton, and E. W. Rice. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Water Works Association, 2017. ISBN 978-1-62576-240-5.
- EPA. Method 1684 Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids. Technical Report EPA-821-R-01-015, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division (4303), Washington DC, 2001. URL https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1684_draft_2001.pdf.
- S. D. Hafner, S. Astals, P. Buffiere, N. Løjborg, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Manometric Measurements. Standard BMP Methods document 202, version 2.5., 2020a. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Biochemical Methane Potential (BMP). Standard BMP Methods document 200, version 1.6., 2020b. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, H. Fruteau de Laclos, K. Koch, and C. Holliger. Improving inter-laboratory reproducibility in measurement of biochemical methane potential (BMP). *Water*, 12(6):1752, June 2020c. doi: 10.3390/w12061752. URL <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/6/1752>.

⁶The criteria listed above are duplicated in document 101 [Hafner et al., 2020e], which was created to simply make it easier to find these required criteria.

- S. D. Hafner, C. Justesen, R. Thorsen, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Gas Density-Based Measurements. Standard BMP Methods document 204, version 1.5., 2020d. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, K. Koch, H. Fruteau de Laclos, and C. Holliger. Validation criteria for measurement of biochemical methane potential (BMP). Standard BMP Methods document 101, version 1.0., 2020e. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, N. Løjborg, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Volumetric Measurements. Standard BMP Methods document 201, version 1.5., 2020f. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, B. K. Richards, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Gravimetric Measurements. Standard BMP Methods document 203, version 1.0., 2020g. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- C. Holliger, M. Alves, D. Andrade, I. Angelidaki, S. Astals, U. Baier, C. Bougrier, P. Buffière, M. Carballa, V. de Wilde, F. Ebertseder, B. Fernández, E. Ficara, I. Fotidis, J.-C. Frigon, H. Fruteau de Laclos, D. S. M. Ghasimi, G. Hack, M. Hartel, J. Heerenklage, I. Sarvari Horvath, P. Jenicek, K. Koch, J. Krautwald, J. Lizasoain, J. Liu, L. Mosberger, M. Nistor, H. Oechsner, J. V. Oliveira, M. Paterson, A. Pauss, S. Pommier, I. Porqueddu, F. Raposo, T. Ribeiro, F. Rüsch Pfund, S. Strömberg, M. Torrijos, M. van Eekert, J. van Lier, H. Wedwitschka, and I. Wierinck. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11):2515–2522, 2016. doi: 10.2166/wst.2016.336.
- C. Holliger, S. Astals, H. F. de Laclos, S. D. Hafner, K. Koch, and S. Weinrich. Towards a standardization of biomethane potential tests: A commentary. *Water Science and Technology*, 83(1):247–250, 2021. ISSN 0273-1223. doi: 10.2166/wst.2020.569. URL <https://doi.org/10.2166/wst.2020.569>.
- K. Strach. Determination of total solids (dry matter) and volatile solids (organic dry matter). In J. Liebetrau and D. Pfeiffer, editors, *Collection of Methods for Biogas*, volume 7 of *Biomass Energy Use*. DBFZ, Leipzig, Germany, second edition, 2020. URL <https://www.dbfz.de/projektseiten/chinares/downloads/>.