

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS TRÓFICOS PRESENTES EN EL ESTIÉRCOL
BOVINO USADO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE
SOBRANTES ALIMENTICIOS DE RESTAURANTE

MARIA SOLEDAD ALZATE MONCADA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS TRÓFICOS PRESENTES EN EL ESTIÉRCOL
BOVINO USADO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE
SOBRANTES ALIMENTICIOS DE RESTAURANTE

MARIA SOLEDAD ALZATE MONCADA

Trabajo de Grado para optar al título de
Magister en Química Ambiental

Directora

MABEL JULIANA QUINTERO SILVA
Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA

2015

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradezco a Dios por este sueño de tantos años, hecho realidad. Una meta cumplida en el tiempo perfecto para mí y que sólo Él conocía.

Gracias a mi papá y mi mamá por todo lo que me han dado y que a veces no sé agradecer como ellos esperan y como debería. Les pido perdón por eso.

A mis hijos por ser esa parte tan importante de mi vida, porque lo han llenado todo, porque cada día me enseñan algo y sólo Dios sabe cuánto me cuesta dejarlos ir. Por eso, gracias Cristian por tu apoyo y tu independencia. Gracias Yesica por tu cariño, apoyo y ayuda en los momentos difíciles.

A mi hermana Claudia por su amistad y por darme ánimo para embarcarme en esta travesía cuando todavía no me decidía a iniciarla o cuando me arrepentía de haberlo hecho a estas alturas de la vida.

A mis profesores muchas gracias por todas sus enseñanzas, por todo lo que quisieron dar y compartir conmigo, no han perdido el tiempo. Gracias a todo el grupo de trabajo en digestión anaerobia por ayudarme cuando me daba cuenta que me hicieron falta cinco años de ingeniería química para resolver muchas dudas del proyecto. Todavía tengo muchas inquietudes, pero ahí voy.

A mi directora, muchas gracias profesora Mabel, por todo lo que me enseñó, por involucrarse directamente en este trabajo y por ser una chispa de alegría que enciende el laboratorio cuando aparece.

Gracias, profesor Escalante, por darme la oportunidad de realizar este proyecto que usted vio en ese momento como una simbiosis y creo que en verdad lo fue.

Gracias, profesora Liliana por recibirme con una sonrisa siempre que llegaba a su oficina con las dudas naturales de una microbióloga trabajando entre ingenieros químicos, en un área totalmente desconocida para mí antes. Por eso acepté entrar a este proyecto, no sabía en qué me estaba metiendo. Fue un trabajo arduo inicialmente, pero muy satisfactorio.

Gracias muy especiales a Omar por su trabajo responsable, a Jhon por su interés y colaboración, a Iván por su energía y disposición.

Gracias Luis, por tu ayuda y por ser tan tú, que eres único. A todos los chicos del laboratorio por ser tan agradables, que hacen muy especial ese lugar: Diana, Katherine, Ana María y Jose. Gracias también a Catalina por el tiempo compartido.

A los nuevos estudiantes: Bienvenidos, un panorama desconocido se abre ante ustedes, aprovechen esta oportunidad. Yo aproveché la mía y no me arrepiento.

Que Dios, los llene a todos de su favor para que su bendición se manifieste en sus vidas en todo lo que hagan y adondequiera que vayan.

Gracias a todos,

Marisol

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GENERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MARCO TEÓRICO	23
3.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA	23
3.1.1. Etapas de la DA	24
3.1.2. Factores que afectan la estabilidad de la DA	26
3.1.2.1. pH y alcalinidad	26
3.1.2.2. Nutrientes	26
3.1.2.3. Temperatura	27
3.1.2.4. Sustancias tóxicas	27
3.2. MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	28
3.2.1. Bacterias fermentativas	29
3.2.1.1. Hidrolíticas	30
3.2.1.2. Acidogénicas	30
3.2.2. Bacterias acetogénicas	31
3.2.3. Arqueas metanogénicas	32
3.3. INÓCULOS USADOS EN DIGESTIÓN ANAEROBIA	35
3.4. ACTIVIDADES INTRÍNSECAS DEL INÓCULO	37
3.4.1. Actividad Hidrolítica	38
3.4.2. Actividad Acidogénica	39

3.4.3. Actividad Acetogénica.....	39
3.4.4. Actividad Metanogénica Específica.....	39
3.5. BIOMASA USADA COMO SUSTRATO EN DIGESTIÓN ANAEROBIA	40
4. METODOLOGÍA	44
4.1.1. Sustrato.....	45
4.1.2. Inóculo	45
4.1.3. Medios de cultivo	46
4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	46
4.2.1. Determinación del potencial degradador del inóculo	46
4.2.1.1. Actividad Hidrolítica.....	47
4.2.1.2. Actividad Acidogénica	47
4.2.1.3. Actividad Acetogénica.....	48
4.2.1.4. Actividad Metanogénica Específica.....	49
4.2.2. Caracterización de grupos tróficos.....	49
4.2.2.1. Grupos tróficos del inóculo.....	51
4.2.2.2. Grupos tróficos del proceso de digestión anaerobia	51
4.2.3. Ensayo de digestión anaerobia y seguimiento al proceso	53
4.2.3.1. Condiciones operativas.....	53
4.2.3.2. Monitoreo de variables del proceso	53
4.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	54
4.3.1. Caracterización del sustrato.....	54
4.3.2. Caracterización del inóculo	54
4.3.3. Variables de control del proceso de DA.....	54
4.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	55
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE INÓCULO Y SUSTRATO.....	56
5.2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL INÓCULO	58
5.2.1. Microorganismos patógenos	58

5.2.2. Grupos tróficos.....	59
5.3. ACTIVIDADES DEL INÓCULO	62
5.3.1. Actividades evaluadas para las primeras etapas de la DA	62
5.3.2. Actividades específicas en función de la producción de metano	64
5.4. DINAMICA POBLACIONAL DURANTE LA DA DE SAR	68
5.4.1. Dinámica poblacional entre grupos tróficos	68
5.4.2. Dinámica poblacional entre dominios.....	72
5.5. DINÁMICA BIOQUÍMICA DURANTE LA DA DE SAR	74
5.6. INFLUENCIA DEL SINERGISMO/ANTAGONISMO MICROBIANO EN EL RENDIMIENTO DE LA DA	79
6. CONCLUSIONES	82
7. RECOMENDACIONES.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	84
ANEXOS	96

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Parámetros establecidos para evaluar las actividades del inóculo	48
Tabla 2. Características de los medios de cultivo para determinar el NMP	52
Tabla 3. Condiciones operativas establecidas para los biorreactores	53
Tabla 4. Resultados de la caracterización fisicoquímica de SAR y EB	56
Tabla 5. Resultados de análisis de microorganismos patógenos en EB	58
Tabla 6. Resultados de actividades evaluadas en función de ART y AGV	63
Tabla 7. Resultados de actividades evaluadas mediante producción de CH ₄	66
Tabla 8. Evolución del recuento total de la población caracterizada durante la DA	71

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Grupos microbianos involucrados en las etapas de la DA.....	29
Figura 2. Diagrama de flujo del desarrollo de las actividades del proyecto.....	44
Figura 3. Preparación de la muestra y siembra para recuento por NMP	50
Figura 4. Lectura de tubos positivos y uso de la tabla de McGrady	52
Figura 5. Resultados del recuento de grupos tróficos del inóculo	59
Figura 6. Cinética de la producción de ART en AH y AGV en AA.....	62
Figura 7. Cinética de producción de metano en AAc, AME(A) y AME(H)	65
Figura 8. Evolución de grupos tróficos y de la población total durante la DA.....	68
Figura 9. Gráficas de la dinámica poblacional por grupos metabólicos	69
Figura 10. Dinámica poblacional de grupos tróficos por dominios	73
Figura 11. Gráficas del seguimiento de las variables AGV y ART de la DA.....	74
Figura 12. Gráficas del seguimiento a la estabilidad del sistema.....	76
Figura 13. Gráficas del consumo de sólidos y la producción de CH ₄	77
Figura 14. Relación cuantitativa de arqueas metanogénicas con grupos fermentadores y sulfatorreductores e incidencia en la producción de CH ₄	80

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Medios de cultivo para evaluar las actividades del inóculo	96
ANEXO B. Medios de cultivo para caracterización microbiológica y preparación de soluciones	99
ANEXO C. Curva de calibración de glucosa	108
ANEXO D. Cálculos de las actividades del inóculo Actividad Hidrolítica	109
ANEXO E. Cálculos de las actividades del inóculo Actividad Metanogénica	110

RESUMEN

TITULO: IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS TRÓFICOS PRESENTES EN EL ESTIÉRCOL BOVINO USADO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE SOBRESALIENTES ALIMENTICIOS DE RESTAURANTE*

AUTOR: MARIA SOLEDAD ALZATE MONCADA**

PALABRAS CLAVE: GRUPOS TRÓFICOS, GRUPOS METABÓLICOS, ACTIVIDADES MICROBIANAS, NÚMERO MÁS PROBABLE, SOBRESALIENTES ALIMENTICIOS DE RESTAURANTE, RESIDUOS POSTCOCCIÓN, LODO DE ESTIÉRCOL BOVINO, DIGESTIÓN ANAEROBIA.

DESCRIPCIÓN:

En este estudio se evaluaron, identificaron y cuantificaron las poblaciones microbianas activas en el lodo de estiércol bovino -EB-, responsables de la degradación anaerobia de sobresalientes alimenticios de restaurante -SAR-, mediante pruebas de actividad y el método del Número Más Probable. La Actividad Hidrolítica, Acidogénica, Acetogénica y Metanogénica Específica, tanto Acetoclástica como Hidrogenotrófica, fueron evaluadas utilizando sustratos modelo: almidón, glucosa, butirato/propionato, acetato y formiato respectivamente. Las poblaciones identificadas corresponden a grupos de bacterias hidrolíticas-acidogénicas (fermentadoras de glucosa y lactosa), acetogénicas (del propionato y butirato) y sulfatorreductoras (del acetato y lactato), así como también algunos grupos de arqueas metanogénicas (acetogénicas, hidrogenotróficas y del metanol). La digestión anaerobia -DA- de los SAR se desarrolló durante 35 días en reactores discontinuos de 50 mL conteniendo una mezcla de inóculo y sustrato con una relación de 3. Se tomaron muestras cada 7 días para hacer seguimiento al sistema mediante análisis de variables de respuesta y estabilidad y evaluar las poblaciones microbianas cuantificando los grupos tróficos. Las variables evaluadas fueron pH, sólidos totales -ST-, sólidos volátiles -SV-, azúcares reductores totales -ART-, ácidos grasos volátiles -AGV- y alcalinidad total -AT-. Diariamente se cuantificó metano.

En el EB se encontraron todos los grupos tróficos investigados, los cuales se cuantificaron, tanto en el inóculo como durante el proceso de DA. Se demostró la relación existente entre la actividad de la biomasa y los grupos tróficos presentes. El lodo EB tiene cualidades para ser usado como inóculo para iniciar un proceso de DA. La interacción de arqueas metanogénicas -AM- con bacterias fermentadoras -FB- y bacterias sulfatorreductoras -BSR- son parámetros importantes para evaluar el desempeño del reactor. La DA de SAR alcanzó un rendimiento de $0.41 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$ usando lodo de EB como inóculo.

*Trabajo de Grado.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Mabel Juliana Quintero Silva. Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Mabel Juliana Quintero Silva. Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

ABSTRACT

TITLE: IDENTIFICATION OF TROPHIC GROUPS PRESENT IN COW MANURE SLUDGE USED FOR ANAEROBIC DIGESTION OF COOKED FOOD WASTE FROM RESTAURANT*

AUTHOR: MARIA SOLEDAD ALZATE MONCADA**

KEY WORDS: TROPHIC GROUPS, METABOLIC GROUPS, MICROBIAL ACTIVITIES, MPN, KITCHEN WASTE, COOKED FOOD WASTE, CATTLE MANURE SLUDGE, ANAEROBIC DIGESTION

DESCRIPTION:

This study evaluated, identified and quantified active populations in cattle manure sludge - CMS-, responsible for anaerobic degradation of kitchen waste using activity tests and Most Probable Number -MPN-. Hydrolytic Activity, Acidogenic Activity, Acetogenic Activity and Specific Methanogenic Activities, Acetoclastic and Hydrogenotrophic were evaluated using model substrates: Starch, glucose, propionate/butyrate, acetate and formate respectively. There were identified and quantified bacterial populations belonging to hydrolytic-acidogenic (glucose and lactose fermenting bacteria), acetogenic (from butyrate and propionate) and sulphate-reducing (from acetate and lactate) groups and also to methanogenic archaea (acetoclastic, hydrogenotrophic and from methanol). Anaerobic digestion from KW was developed during 35 days in batch reactors of 50 mL, containing an inoculum/substrate ratio of 3. Samples from digesters were taken every 7 days to follow the system's development through response and stability variables and to evaluate microbial populations by counting trophic groups. Variables analyzed were total solids -TS-, volatile solids -VS-, total reducing sugars -TRS-, volatile fatty acids -VFA- and total alkalinity -TA-. Methane production was measured daily.

It was found that CMS contains all the trophic groups searched, which were quantified, in inoculum as well as during AD process. It was demonstrated a relationship between biomass activities and trophic groups' population. CMS is an inoculum with high quality to start up an anaerobic process. Interactions among methanogenic archaea -MA-, fermenting bacteria -FB- and sulphate reducing bacteria -SRB- as MA/FB ratio and MA/SRB ratio are important microbial parameters to evaluate performance of reactor. AD from kitchen waste reached a yield coefficient of $0.41 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg VS}$ using CMS as inoculum.

* Magister Thesis

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Mabel Juliana Quintero Silva. Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

ABREVIATURAS

AA	Actividad acidogénica	BSRL	Bacterias sulfatorreductoras del lactato
AAc	Actividad acetogénica	DA	Digestión anaerobia
AGV	Ácidos grasos volátiles	DQO	Demanda Química de Oxígeno
AH	Actividad hidrolítica	DNS	Dinitrosalicílico
AMA	Arqueas metanogénicas del acetato	EB	Estiércol bovino.
AME	Actividad metanogénica específica	FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
AMH	Arqueas metanogénicas hidrogenotróficas	LEC	Lodo de estiércol de cerdo
AMM	Arqueas metanogénicas del metanol	LPTAR	Lodo de planta de tratamiento de aguas residuales
ART	Azúcares reductores totales	LR	Líquido ruminal
AT	Alcalinidad total	MCAB	Medio de cultivo anaerobio básico
BAB	Bacterias acetogénicas del butirato	NMP	Número más probable
BAE	Bacterias anaerobias estrictas	PBM	Potencial de biometanización
BAP	Bacterias acetogénicas del propionato	RIS	Relación inóculo - sustrato
BFG	Bacterias fermentadoras de glucosa	SAR	Sobrantes alimenticios de restaurante
BFL	Bacterias fermentadoras de lactosa	ST	Sólidos totales
BSRA	Bacterias sulfatorreductoras del acetato	SV	Sólidos volátiles
		SST	Sólidos suspendidos totales
		SSV	Sólidos suspendidos volátiles

INTRODUCCIÓN

Se denomina Digestión Anaerobia -DA- a la biodegradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, mediante un proceso bioquímico muy complejo, llevado a cabo por la coexistencia simbiótica de microorganismos de los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Los grupos tróficos involucrados en este proceso, pertenecen a tres grupos fisiológicos: bacterias hidrolíticas y acidogénicas, bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas (Madigan *et al.*, 2004, Angelidaki *et al.*, 2011). Adicionalmente, pueden estar presentes bacterias sulfatorreductoras que compiten con otros grupos tróficos por el hidrógeno, acetato y ácidos grasos de cadena corta, generando ácido sulfhídrico, un producto tóxico para grupos sensibles y el proceso eventualmente puede fallar (Appels *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista microbiológico, los investigadores en DA están utilizando herramientas moleculares para determinar cualitativamente la presencia de poblaciones microbianas y sus interacciones, mediante técnicas tales como DGGE, PCR, MAR y TRFLP, entre otras, denominadas así por sus siglas en inglés: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Polymerase Chain Reaction, Microautoradiography y Terminal Restriction Fragment Length Polimorfism respectivamente. Por otro lado, mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* -FISH- en combinación con MAR, es posible cuantificar microorganismos en cualquier nivel taxonómico. Sin embargo, algunas muestras presentan restricciones y su realización puede ser tediosa, subjetiva, compleja y costosa (Sanz *et al.*, 2007). Adicionalmente, cuantificar grupos tróficos mediante esta técnica es difícil, ya que no está basada en propiedades fisiológicas de los microorganismos (Ito *et al.*, 2012).

Es importante la cuantificación de consorcios microbianos, debido a que permite estimar la calidad de un inóculo y su afinidad con un sustrato específico. Así

mismo, la caracterización de grupos tróficos permite determinar la interrelación existente entre un adecuado rendimiento de la DA y la presencia de comunidades metabólicas bien balanceadas y con alto nivel de actividad (Regueiro *et al.*, 2012).

Es por esto que el objetivo de esta investigación fue identificar poblaciones metabólicamente activas en el estiércol bovino -EB-, responsables de la degradación anaerobia de sobrantes alimenticios de restaurante -SAR-, por medio de la evaluación de sus actividades para todas las etapas del proceso de DA, la identificación y cuantificación de los grupos tróficos usando medios selectivos junto con la metodología del Número Más Probable -NMP-, a fin de conocer las interrelaciones existentes entre las comunidades microbianas antes y durante la digestión y su influencia en el desempeño del reactor.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Universidad Industrial de Santander en su sede principal posee una población de aproximadamente 1900 estudiantes inscritos para servicio de comedores. La prestación de este servicio, para el año 2010 generaba alrededor de 213 kg de desechos biodegradables diariamente, siendo 46 kg de residuos crudos y 167 kg correspondientes a residuos postcocción (Rodríguez, 2010). Con una población creciente, para el año 2014 el volumen se incrementó en un 17%, alcanzando un promedio de 195 kg postcocción diarios (Álvarez y Calderón, 2014).

Aunque durante algunos años los sobrantes alimenticios de restaurante -SAR- generados en el comedor Bienestar Universitario de la UIS, se entregaron para alimentar cerdos de pequeños criaderos particulares, pero el Instituto Colombiano Agropecuario -ICA-, prohibió esta práctica por medio de la Resolución 2640 de 2007. La alternativa es entregarlos a la empresa de aseo para llevarlos al sitio de disposición final, lo generara un costo para la universidad y contribuye al aumento de la problemática ambiental que se ha generado en torno a este lugar.

Teniendo en cuenta que los SAR poseen nutrientes aprovechables mediante su valorización energética, se propone la alternativa de utilizarlos para producción de biogás a través de la DA, dado que los residuos de alimentos generan un promedio de $0.385 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ adicionados (Raposo, 2011). Esta es una opción viable que aprovecha la energía remanente en los residuos para darles un valor agregado y adicionalmente, los lodos generados en el proceso contienen minerales que les permiten actuar como acondicionadores o mejoradores de suelos degradados (Appels *et al.*, 2008).

En la DA se llevan a cabo cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. En cada una de ellas intervienen diferentes grupos microbianos,

importantes para el buen desarrollo del proceso, debido a la sinergia que se desarrolla entre estos, ya que los productos generados por un grupo, sirven de sustrato para el metabolismo de otro (Madigan *et al.*, 2004). Cuando se conserva la proporción entre sustratos generados y grupos tróficos que los utilizan, se mantiene la estabilidad del proceso de DA, permitiendo que se alcance una alta eficiencia en la producción de metano, de acuerdo al residuo involucrado en el proceso.

El equilibrio de las reacciones mediadas por los microorganismos aportados por el inóculo, se deben mantener durante todo el proceso; por esto es fundamental monitorear el sistema y controlar las variables que pueden afectar la estabilidad del digestor, causando inhibición de la microbiota presente.

Por lo tanto, se considera necesario conocer los grupos tróficos presentes en el EB usado como inóculo para la DA de los SAR, con el fin de prever las diferentes reacciones que han de ocurrir dentro del digestor y conocer anticipadamente cómo va a ser su arranque y estabilidad.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los grupos tróficos presentes en el EB usado como inóculo para degradar los SAR mediante DA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente el EB (inóculo) y los SAR (sustrato) a utilizar en el proceso de digestión anaerobia.
- Determinar el potencial del inóculo para llevar a cabo las diferentes etapas de la DA.
- Cuantificar los grupos tróficos presentes en el inóculo y responsables del proceso de DA de los SAR.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA

La DA es un proceso biológico en el cual la materia orgánica es degradada por un consorcio microbiano en ausencia de oxígeno, obteniéndose como producto final un biogás compuesto básicamente por metano y dióxido de carbono. Como subproducto de esta degradación, se origina un lodo compuesto por sustrato no degradado completamente y restos de los microorganismos involucrados en el proceso; este lodo puede ser usado para acondicionar suelos degradados, debido a que conserva los nutrientes de la materia orgánica (Salminen y Rintala 2002; Díaz-Báez *et al.*, 2002; Appels *et al.*, 2008).

Este proceso puede ocurrir de forma natural por acción de una comunidad microbiana que trabaja simbióticamente de forma coordinada, como ocurre en pantanos, siembras de arroz, chimeneas submarinas, entre otros. Puede ser muy estable y autorregulado, dependiendo del tipo de sustrato que esté involucrado en el proceso, en el cual no debe estar presente el oxígeno, para la generación de un biogás altamente energético (Mussati *et al.*, 1999; Wang, 2008;).

La DA se ha usado para estabilizar los desechos orgánicos, controlar olores, hacer un manejo ambientalmente eficiente de nutrientes y una disposición controlada de los residuos. También para disminuir emisiones de efecto invernadero y producir energía limpia y renovable a partir de residuos que hoy en día son muy variados, tanto en diversidad como en complejidad (Labatut, 2013)

El metano presente en el biogás puede estar en un porcentaje entre 40 y 70%, dependiendo del sustrato utilizado y de la optimización que se alcance del

proceso. El porcentaje restante corresponde a CO₂ casi en su totalidad, con bajas proporciones de otros gases como H₂, O₂, CO y H₂S entre 0,1 y 0,5% (Appels *et al.*, 2008; Wang, 2008; Cepero *et al.*, 2012).

3.1.1. Etapas de la DA. Por la complejidad de las interacciones que ocurren dentro de un proceso de DA, se puede considerar como un ecosistema en el que es indispensable que todos los grupos microbianos participantes del proceso persistan a lo largo del tiempo, para que las condiciones sean estables y la población no resulte afectada, especialmente grupos más sensibles a los cambios. Se consideran cuatro etapas básicas dentro del proceso: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2004).

La DA se inicia con un proceso hidrolítico en el que los polímeros son transformados en monómeros por acción de diferentes enzimas secretadas al medio por microorganismos hidrolíticos presentes. Las proteínas se hidrolizan, por acción de proteasas, hasta aminoácidos, péptidos y azúcares; los lípidos dan origen a ácidos grasos de cadena larga y glicerol por rompimiento de los enlaces éster; los carbohidratos se transforman en azúcares simples por rompimiento de los enlaces glucosídicos (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Madigan *et al.*). En algunos casos, esta puede ser una etapa limitante del proceso, especialmente cuando los residuos a tratar están constituidos por estructuras muy complejas o de gran tamaño; en este caso, diferentes autores recomiendan realizar algún pretratamiento, como forma de acondicionamiento que facilita el rompimiento de la estructura polimérica. Algunos de los utilizados son mecánicos como la trituración, presión o ultrasonido; químicos, por adición de ácidos, álcalis, agentes oxidantes o líquidos iónicos; térmicos, mediante calor seco o húmedo; también por congelación/descongelación, radiación gama, electrovapor y microondas (Amani *et al.*, 2010; Huet *et al.*, 2005; Appels *et al.*, 2008; Mousdale, 2008; Carrère *et al.*, 2009).

La segunda etapa es acidogénesis y durante ella, los productos de la hidrólisis de los polímeros, son utilizados por un grupo muy heterogéneo de microorganismos fermentativos, para generar una mezcla muy variada de ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, cetonas, H₂ y CO₂. La excesiva formación de ácidos orgánicos origina caída del pH, afectando poblaciones sensibles, lo que disminuye la eficiencia del sistema al reducir la producción de metano, lo que podría hacer de esta etapa la limitante en el buen funcionamiento de un digester anaerobio, si el sistema no cuenta con buena capacidad buffer para absorber la acidificación (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Gerardi, 2003; Wang, 2008).

En la siguiente etapa, acidogénesis, se forma acetato, intermediario obligado durante la degradación anoxigénica de la materia orgánica, por dos grupos de bacterias acetogénicas, las sintróficas o productoras de hidrógeno y las homoacetógenas; las primeras a partir de ácidos grasos y las segundas de H₂ y CO₂. Esta etapa puede ser limitante en el proceso, debido a que la acumulación del H₂ producido por las bacterias acetogénicas sintróficas causa aumento en la presión parcial del sistema, inhibiendo esta misma población. Su reducción depende de la presencia de poblaciones consumidoras de H₂, como las homoacetógenas y las arqueas metanogénicas acetoclásticas, actuando en sintrofia (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Gerardi, 2003; Wang, 2008).

La metanogénesis es el último paso de la degradación de la materia orgánica hasta su forma más reducida, metano, a partir de los productos de las etapas anteriores, llevada a cabo por diversos grupos de microorganismos metanógenos. La energía producida durante el metabolismo de estas poblaciones, no es utilizada en formación celular, sino en la producción de metano, lo que se manifiesta en un crecimiento y multiplicación lentos. Si la población no es suficiente para utilizar los sustratos y generar metano, puede ocurrir rápida acidificación del sistema, lo que inhibe esta población sensible, haciendo que esta etapa también pueda limitar el proceso (Madigan *et al.*, 2004; Gerardi, 2003; Wang, 2008).

3.1.2. Factores que afectan la estabilidad de la DA. Para un adecuado funcionamiento del proceso, es necesario que el tiempo de contacto entre el sustrato y el inóculo sea suficiente, por lo que se deben monitorear variables de operación, con el fin de establecer parámetros para cada caso específico, los cuales se deben controlar y mantener para lograr la máxima producción de biogás en el menor tiempo posible. Entre estos parámetros, están principalmente el flujo de carga orgánica, el tiempo de retención hidráulico y otros como el tiempo de retención de masa, actividad biológica específica y la producción de biomasa; todos están determinados por la naturaleza del residuo utilizado (Wang, 2008; Appels *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2012).

El funcionamiento de un proceso de digestión anaerobia involucra algunas variables que deben ser controladas para evitar que se desestabilice, debido a la sensibilidad de los microorganismos a los cambios en su entorno. Algunos de los aspectos que inciden en la estabilidad del proceso, son:

3.1.2.1. pH y alcalinidad: Los cambios en el pH causan alteraciones en todo el funcionamiento del sistema, por lo que se debe mantener la alcalinidad del digester para neutralizar los ácidos formados por la fermentación. Esto favorece grupos metanogénicos, muy sensibles a la acidez, no así las bacterias fermentativas, las cuales pueden resistir pH entre 4.0 y 8.5 y son las que causan acidez del medio al generar los subproductos de su metabolismo. Si aumenta la cantidad de AGV sin que se compense el sistema con la alcalinidad que proveen otros grupos al generar amonio, bicarbonato y dióxido de carbono, puede colapsar el digester (Salminen y Rintala, 2002; Appels *et al.*, 2008; Amani *et al.*, 2010).

3.1.2.2. Nutrientes: Todos los organismos que participan en los procesos de degradación anaerobia necesitan por lo menos dos nutrientes básicos, después

del carbono fundamental, son nitrógeno y fósforo de forma soluble. Una adecuada DQO brinda a los microorganismos sustancias necesarias para su crecimiento, que implica multiplicación celular a expensas del alimento, que suple el carbono básico. Adicionalmente, necesitan elementos traza como cobalto, hierro, selenio, molibdeno, bario, níquel, manganeso, sodio, entre otros (Appels *et al.*, 2008; Amani *et al.*, 2010).

3.1.2.3. Temperatura: Aunque todos los microorganismos pueden sobrevivir y adaptarse a diferentes rangos de temperatura, se desarrollan y funcionan más eficientemente a ciertos rangos. De acuerdo a esta condición, se han clasificado en tres grupos: psicrófilos, entre 5 y 20°C, mesófilos entre 20 y 45°C y termófilos entre 45 y 80°C (Madigan *et al.*, 2004). Cambios bruscos pueden diezmar la población, pero en general se ha observado que se logra una adaptación lenta a otros rangos, aunque el rendimiento puede ser menor. Por otro lado, con temperaturas superiores a 50°C se consigue incremento en la producción de metano, baja producción de lodos y reducción en el tiempo de retención, lo que aumenta la capacidad de carga del sistema y reducción de patógenos, pero se incrementa el consumo de energía (Appels *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

3.1.2.4. Sustancias tóxicas: Entre las sustancias que producen inhibición, se encuentra el exceso de amonio producto de la degradación de proteínas y compuestos nitrogenados; acumulación de ácidos grasos de cadena larga por la descomposición de las grasas; acumulación de ácidos orgánicos por fermentación de azúcares; también compuestos azufrados, sodio, potasio y metales pesados. Un buen parámetro para controlar la inhibición por acumulación de AGV, es determinar la relación AGV/AT (Mata-Alvárez, 2003; Amani *et al.*, 2010).

3.2. MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

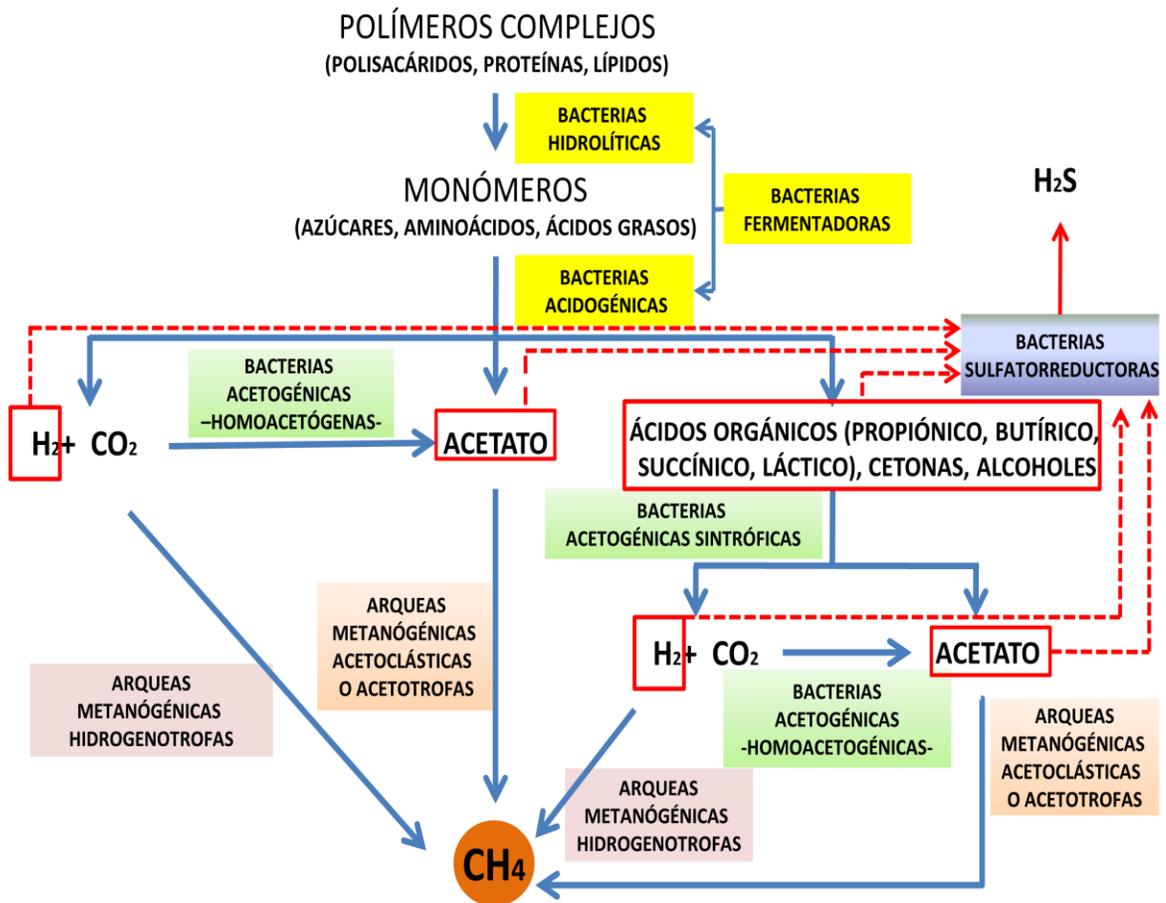
La DA es un proceso de interacciones químicas y bioquímicas muy complejas, mediadas por microorganismos, en las que intervienen también factores operativos que pueden afectar su funcionamiento. Aunque en el proceso intervienen diversos grupos de microorganismos que tienen condiciones de crecimiento, propiedades fisiológicas y actividades metabólicas muy diferentes y específicas, el buen funcionamiento de un digestor depende del balance de las relaciones que ocurren entre los diferentes consorcios microbianos (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Wang, 2008).

Las actividades que ocurren durante las diferentes etapas de la DA, son llevadas a cabo por tres grupos de microorganismos de los dominios *Bacteria* y *Archaea*: bacterias fermentadoras, que incluye hidrolíticas y acidogénicas; bacterias acetogénicas, que involucra homoacetógenas y sintróficas o productoras obligadas de hidrógeno; y arqueas metanogénicas, que son acetoclásticas, hidrogenotróficas y metilotrofas. Estas interacciones se pueden observar en la Figura 1 (Madigan *et al.*, 2004; Angelidak *et al.*, 2011).

Con los grupos anteriores, pueden coexistir bacterias sulfatorreductoras -BSR-; son anaerobias estrictas y utilizan los sulfatos, sulfitos o tiosulfatos presentes en el medio, como aceptores de electrones, reduciéndolos a ácido sulfhídrico. Se han dividido en dos grupos, oxidadoras completas e incompletas, debido a que durante su metabolismo, las primeras utilizan compuestos como lactato y producen acetato y CO₂; y las segundas oxidan el acetato convirtiéndolo en CO₂ y HCO₃. Las BSR tienen sustratos en común con algunos grupos tróficos presentes en los DA; con las bacterias acetogénicas sintróficas compiten por propionato y butirato, con las homoacetógenas por el H₂ y con las arqueas metanogénicas, por el formiato, acetato e hidrógeno. Esta característica metabólica puede hacer que desvíen la

ruta metabólica para formar H_2S en lugar de CH_4 (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2004; Appels *et al.*, 2008). Además de la inhibición primaria que ocurre por la competencia de sustratos, se origina otra por la toxicidad debida a los sulfuros producidos por la reducción de los compuestos azufrados (Appels *et al.*, 2008).

Figura 1. Grupos microbianos involucrados en las etapas de la DA



Fuente: Madigan *et al.*, 2004. Proceso global de la descomposición anóxica. Modificado por el autor.

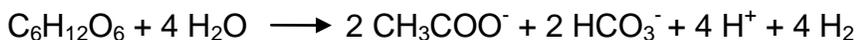
3.2.1. Bacterias fermentativas. Este grupo se ha denominado hidrolítico-fermentativo o fermentador primario y está conformado por dos subgrupos.

3.2.1.1. Hidrolíticas: Dentro de este grupo se encuentran muy diversos géneros y sus actividades hidrolíticas pueden ir encaminadas a diferentes polímeros o a uno específico. La hidrólisis de proteínas se ha identificado que puede ser llevada a cabo por especies como: *Clostridium sp.*, *Proteus vulgaris*, *Peptococcus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Bacillus sp.*, *Vibrio sp.*, las cuales generan aminoácidos y azúcares. La hidrólisis de carbohidratos para la generación de azúcares, se ha registrado que se realiza por *Clostridium sp.*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Staphylococcus sp.*, *Bacteroides sp.* La hidrólisis de lípidos hasta la formación de ácidos grasos de cadena larga, alcoholes y aminoácidos, se ha observado que se efectúa por *Clostridium sp.*, *Micrococcus sp.* Adicionalmente, para la hidrólisis de ácidos nucleicos, se ha identificado *Staphylococcus sp.* en ARN y *Bacillus sp.* para ADN, generando azúcares, purinas y pirimidinas como productos de la hidrólisis (Amani *et al.*, 2010).

3.2.1.2. Acidogénicas: Las bacterias que se encuentran en este grupo, son las encargadas de la fermentación de los azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga generados durante la hidrólisis de las macromoléculas. Tienen un metabolismo acelerado, por lo tanto su duplicación es muy rápida, por lo menos cada 30 minutos y producen diferentes ácidos orgánicos como acético, propiónico, fórmico, láctico y butírico, lo que podría causar su acumulación si los grupos involucrados en las otras etapas, no los utilizan eficientemente o su degradación es muy lenta (Mussati *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2004).

Algunas reacciones bioquímicas llevadas a cabo por este grupo, son (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Gerardi, 2003; Madigan *et al.*, 2004;):

- Glucosa a acetato:



- Glucosa a butirato:



Dentro el grupo que metaboliza aminoácidos generando valerato, isovalerato, butirato y propionato, se han encontrado *Lactobacillus sp.*, y *Escherichia coli*; *Staphilococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, entre otros géneros, forman acetato, H₂ y ácidos grasos de cadena larga a partir del mismo sustrato. *Eubacterium sp.* Utiliza azúcares formando acetato, butirato, formato, CO₂ y H₂, *Escherichia coli*, utiliza el mismo sustrato y genera casi los mismos productos, pero en lugar de butirato produce lactato y etanol; y *Bifidobacterium sp* formato, acetato, lactato y etanol; *Acetobacterium sp* forma sólo acetato a partir del mismo sustrato. En la degradación de ácidos grasos hasta butirato, propionato, valerato, isovalerato, acetato e H₂ se ha identificado a *Clostridium sp.* y en utilización de alcoholes a *Syntrophomonas wolfei* (Amani *et al.*, 2010).

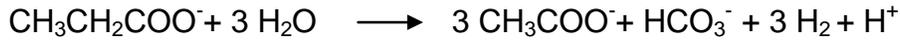
3.2.2. Bacterias acetogénicas: Dependiendo del sustrato que utilicen, este grupo de microorganismos, se subdivide en dos. Un grupo usa los AGV y alcoholes formados en la etapa anterior, para convertirlos en acetato, H₂ y CO₂ y se denominan bacterias acetogénicas productoras obligadas de H₂, o también sintróficas, ya que requieren de otro grupo que trabaje paralelamente utilizando el H₂ que ellas generan, para que su acumulación no inhiba su desarrollo. Por otro lado, las bacterias acetogénicas homoacetógenas producen acetato a partir de H₂ y CO₂, pero su duplicación es más lenta que las del grupo anterior, de 1.5 a 4 días y las reacciones que llevan a cabo son complejas y fácilmente perturbables (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2004; Wang, 2008).

Algunas reacciones bioquímicas de este grupo, son (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2004):

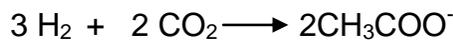
- Butirato a acetato:



- Propionato a acetato:



- H₂ y CO₂ a acetato:



En el grupo de bacterias sintróficas, se han identificado algunas especies acuerdo al ácido orgánico utilizado para la formación de acetato, los cuales son principalmente butirato y propionato. A partir de butirato, se ha identificado a *Syntrophobacter wolinii*; y se ha encontrado que *S. fumaroxidans* también utiliza butirato, pero origina formiato, H₂ y CO₂. A partir de propionato, se generan los mismos productos por parte de *Syntrophomonas wolfei*, *Pelotomaculum thermopropionicum* y *P. schinkii*; este mismo sustrato es utilizado por *Smithella propionica* para producir butirato y acetato. Por otro lado, en la utilización de H₂ y CO₂ como sustrato para formar acetato, se ha identificado *Clostridium aceticum* (Amani *et al.*, 2010).

3.2.3. Arqueas metanogénicas: Los microorganismos pertenecientes a este grupo se encuentran en una clasificación filogenética muy diferente a la de las bacterias, aunque comparten con ellas algunas características en común, pero pertenecen a un dominio diferente, denominado *Archaea* y al reino *Euryarchaeota*. Se han clasificado en este grupo aparte por sus características, que las hacen completamente diferentes de las células de los otros dos dominios; entre ellas está que su pared celular carece de ácido murámico y su membrana lipídica tiene una

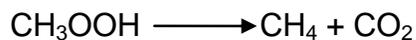
composición característica, que le confiere alguna rigidez y resistencia a las condiciones del entorno (Madigan *et al.*, 2004; Whitman *et al.*, 2006).

Utilizando análisis filogenéticos modernos, se identificaron inicialmente cinco órdenes, de arqueas metanogénicas: *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanopyrales* y *Methanococcales*, pero se ha descrito un nuevo orden, *Methanocellales*. A su vez se han identificado familias con más de 30 géneros y especies involucrados en la degradación de diferentes sustancias (Whitman *et al.*, 2006; Hedderich *et al.*, 2006, Sakai *et al.*, 2010).

Los sustratos utilizados para la formación de metano son acetato, H₂/CO₂ y compuestos de un solo carbono, lo que divide a las arqueas metanogénicas en tres grupos (Madigan *et al.*, 2004).

El grupo acetotrofo o acetoclástico utiliza el acetato y produce CH₄ y CO₂, en un proceso que genera alrededor del 70% del metano del sistema, aunque su desarrollo es muy lento, debido a que la duplicación de sus células ocurre cada 2 a 3 días (Mussati *et al.*, 1999; Gerardi, 2003; Amani, 2010). A pesar de su baja tasa de crecimiento y la poca diversidad de especies, son altamente eficientes. Las especies identificadas son *Methanotherix soehngeni*, *Methanosaeta concilii* y *Methanosarcina acetivorans* (Amani *et al.*, 2010).

La reacción que ocurre por parte del grupo acetoclástico, es la siguiente



El grupo hidrogenotrofo o hidrogenotrófico forma metano a partir de la reducción del CO₂ utilizando el H₂ como donador de electrones, lo que lo convierte en controlador del potencial redox del sistema, regulando la velocidad de formación de ácidos y la conversión de éstos en acetato. Esta regulación se ve favorecida

por su desarrollo más rápido que el acetoclástico, ya que su duplicación ocurre alrededor de cada seis horas (Mussati *et al.*, 1999; Whitman *et al.*, 2006).

Existe una relación de dependencia mutua entre acetógenos y metanógenos, denominada interacción sintrófica, debido a que durante la fermentación de ácidos grasos hasta acetato, con formación de H₂ y CO₂, el grupo acetógeno denominado productor obligado de hidrógeno, trabaja eficientemente mientras la presión parcial del H₂ se mantenga por debajo de 10⁻³ atm. Esto ocurre sólo si los metanógenos hidrogenotrofos utilizan el H₂ para reducir el CO₂ y formar metano. Esta relación sintrófica se conoce también como transferencia de hidrógeno interespecies y su desequilibrio puede ser limitante del proceso de DA (Whitman *et al.*, 2006; Wang, 2008; Amani *et al.*, 2010).

La reacción bioquímica llevada a cabo por el grupo hidrogenotrofo es:



La transformación de acetato, H₂ y CO₂ en metano y dióxido de carbono por las arqueas metanogénicas, ocurre a través de la respiración anaerobia, en la cual el CO₂ es el aceptor final de los electrones liberados durante la degradación del sustrato. Alrededor del 30% del metano producido durante la DA proviene de la reducción del CO₂ por los hidrogenotrofos y el restante por descarboxilación del acetato llevada a cabo por acetoclásticos (Gerardi, 2003; Angelidaki *et al.*, 2011).

Otro grupo se denomina metilotrofo y tiene la capacidad de oxidar compuestos que no contengan enlaces carbono-carbono o compuestos C1, como metanol, metilamina, formiato, dimetiléter, trimetilsulfonio, monóxido y dióxido de carbono, entre otros. Algunos de estos microorganismos son metanotrofos, pero dado que la reacción que ocurre es oxidación del metano, requieren de la presencia de oxígeno (Whitman *et al.*, 2006; Hedderich *et al.*, 2006).

3.3. INÓCULOS USADOS EN DIGESTIÓN ANAEROBIA

La elección de un adecuado inóculo es fundamental para iniciar las reacciones que ocurren en el proceso de DA y llevar a cabo el proceso de degradación de materia orgánica y es que, desde el punto de vista microbiológico, es importante la proporción de los diferentes grupos de microorganismos que intervienen en el proceso, de forma que tengan la capacidad de interactuar entre ellos y adaptarse a las condiciones cambiantes del medio en que se encuentran, a medida que se generan los diferentes subproductos y se mantiene un adecuado suministro de nutrientes para el buen funcionamiento del sistema (Liu *et al.*, 2009).

Cada inóculo presenta un potencial diferente para degradación de sustratos, de acuerdo a la microbiota presente; esto ocurre debido a que los diferentes microorganismos sólo se desarrollan en ambientes en donde encuentren los nutrientes necesarios para su multiplicación y que puedan acceder a ellos a través de sus enzimas específicas, degradando las sustancias con las cuales están en contacto y estableciendo asociaciones sinérgicas con otras comunidades para beneficio común. De esta forma pueden originar cambios graduales en los constituyentes físicos y químicos de su entorno, para adaptar el ecosistema a sus necesidades (Madigan *et al.*, 2004).

La especificidad está dada por la presencia de enzimas en los microorganismos que conforman los consorcios, como ocurre en el rumen y el estiércol de los rumiantes, ya que permiten la fácil degradación de la celulosa y hemicelulosa, parte importante en su alimentación. Inclusive se puede hidrolizar la lignina si se acondiciona el sustrato mediante algún pretratamiento (Callaghan *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; Amon *et al.*, 2006; Amon *et al.*, 2007; Marañón *et al.*, 2012).

A través de diversos estudios se ha evidenciado esta especificidad de los inóculos, especialmente para la hidrólisis, como ocurre con el EB, líquido ruminal –LR- o contenido ruminal para sustratos ricos en lignocelulosa, como son material de jardinería, residuos agrícolas, bagazos, residuos de alimentos como frutas y verduras, desechos de alimentos mezclados, fracción orgánica de residuos sólidos urbanos -FORSU- y sobrantes de cafetería (Callaghan *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004; Terry *et al.*, 2004; Amon *et al.*, 2007; Quintero, 2012; Castro, 2012; Mantilla *et al.*, 2012).

Por otra parte, los lodos provenientes tanto de tratamiento de aguas residuales municipales o procesos de animales, han mostrado mayor potencial en la producción de metano, debido a que los microorganismos presentes, por los ecosistemas de donde se obtienen, tienen una mayor microbiota para las etapas acetogénica y metanogénica. Cuando se utilizan para la DA de residuos vegetales, de alimentos o para aguas residuales de industria alimentaria, el rendimiento es alto (Murto *et al.*, 2004; Demirer y Chen, 2005; Kaparaju y Rintala, 2005; De la Rubia *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2010; Arenas, 2012).

Se han utilizado lixiviados producidos durante la descomposición de algunos residuos, pero el rendimiento no han sido alto, comparado con otros inóculos, debido a una baja densidad poblacional de microorganismos encargados de la biometanización (Fantozzi y Buratti, 2011; Abassi-Guendouz *et al.*, 2013).

También se han usado por separado diversos tipos de inóculo, como lodo de estiércol de cerdo -LEC- (Carrère *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2010; Fantozzi y Buratti, 2011; Astals *et al.*, 2012), EB (Callaghan *et al.*, 2002; Amon *et al.*, 2007; El-Mashad y Zhang, 2010; Luo y Angelidaki, 2013), contenido ruminal (Hu *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Álvarez y Lidén, 2008), lixiviado de residuos sólidos municipales (Abassi-Guendouz *et al.*, 2013), lodo de laguna anaerobia de lechería (Demirer y Chen, 2005), lodo de planta de tratamiento de aguas residuales -LPTAR- (Liu *et al.*, 2009; Long *et*

al., 2012; De la Rubia *et al.*, 2011) y lodo de una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos (Fernández *et al.*, 2005; Fantozzi y Buratti, 2011).

Dependiendo del tipo de sustrato, algunos autores han utilizado mezcla de inóculos y en comparación con los resultados por separado, se evidencia la sinergia de algunas mezclas. Se ha usado EB y LEC (Amón, 2006); LEC junto con LPTAR (Murto *et al.*, 2004;Kaparaju y Rintala, 2005; Sandoval *et al.*, 2009; Arenas, 2012);lixiviado de FORSU y estiércol de cerdo -EC- (Fantozzi y Buratti, 2011), EB y LPTAR (Marañón *et al.*, 2012), EB y lodo del despulpado de café (Terry *et al.*, 2004), LR y LEC (Mantilla *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2012) y un estudio que utilizó un consorcio de dos microorganismos propiedad de una universidad (Fotidis *et al.*, 2013).

Se podría utilizar casi cualquier tipo de inóculo, pero el arranque del proceso podría ser muy lento por la adaptación de los microorganismos, hasta establecer una densidad poblacional suficiente y eficiente, como ocurre gradualmente de forma natural (Díaz-Báez *et al.*, 2002). De hecho, se ha inducido la aclimatación de los microorganismos a diferentes factores ambientales, lo que lleva a cambios en la composición de las poblaciones y se puede evidenciar a través de cambios moleculares, que las poblaciones resultantes son significativamente distintas a las iniciales (Wilson *et al.*, 2013).

3.4. ACTIVIDADES INTRÍNSECAS DEL INÓCULO

El funcionamiento de un sistema de DA depende de la calidad del inóculo que se use para su arranque, por lo tanto, su caracterización permite entender la forma en que evolucionan las diferentes etapas y el comportamiento global del sistema en

cada una de ellas, por generación de sustratos aptos para otros grupos tróficos, lo que se evidencia por el rendimiento energético (Díaz-Báez *et al.* 2002).

El término *actividad* se refiere a la capacidad inherente de una población microbiana para llevar a cabo la degradación de un compuesto o sustrato específico y se puede medir por anabolismo o catabolismo, es decir, a través de la generación de productos o consumo del sustrato por la cantidad de biomasa presente por unidad de tiempo (Rozzi and Remigi, 2004).

Aunque inicialmente el enfoque estaba centrado en la etapa metanogénica, hoy en día se ha extendido hacia las otras etapas, dada la interrelación existente entre los grupos que las realizan. Es por esto que se han diseñado algunos ensayos que permiten conocer previamente la capacidad de la microbiota presente en el inóculo para llevar a cabo las diferentes etapas de la DA, adaptándolas a las necesidades del estudio mediante la utilización de sustratos específicos similares al que se quiere tratar. Como resultado, ya se encuentra información disponible y se busca la estandarización de protocolos que permitan obtener datos comparables (Rozzi and Remigi, 2004; Angelidaki *et al.*, 2009).

3.4.1. Actividad Hidrolítica -AH-. Ha sido ampliamente evaluada, debido a que puede ser limitante del proceso, dependiendo de las características del sustrato, ya que puede retardar su arranque y así la disponibilidad de fuentes de carbono para microorganismos de etapas sucesivas. Mide la capacidad microbiana para degradar una fuente de carbono polimérica y se cuantifica en función de la velocidad de consumo de un sustrato determinado por los microorganismos presentes en el inóculo o de generación del producto formado. Este producto puede ser el puntual de la etapa, como glucosa por hidrólisis del almidón; o como resultado final de todo el proceso de DA, en forma de metano (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004, Angelidaki *et al.*, 2009).

3.4.2. Actividad Acidogénica -AA-. Aunque la etapa acidogénica no es con frecuencia una limitante del proceso de DA, la determinación de la AA provee información importante sobre la dinámica del desarrollo de la biomasa y del comportamiento general del sistema previo a su montaje definitivo. Se ha empleado como sustrato específico la glucosa, por ser el intermediario común en la vía de la digestión anaerobia de carbohidratos, utilizando una concentración preestablecida de sustrato. Es útil para conocer la máxima velocidad de consumo de glucosa por unidad de tiempo por parte de la microbiota presente, o mediante la formación de ácidos grasos volátiles -AGV- (MMLBA, 2009). Se puede también monitorear la actividad en función de la producción de metano, como resultado de la sinergia de los consorcios presentes en el inóculo (Angelidaki *et al.*, 2009).

3.4.3. Actividad Acetogénica -AAc-. La etapa acetogénica no se ha reportado como limitante en DA, dado que una vez producidos los AGV, H₂ y CO₂, los grupos acetógenos presentes los utilizan rápidamente. Pero con el fin de conocer la capacidad del inóculo para producir metano a partir de ellos, se puede medir la AAc como la máxima velocidad de formación de acetato a partir de ácidos orgánicos con concentración conocida, usados como sustrato específico para la prueba. Esto es debido a que las bacterias acetogénicas sintróficas originan acetato, H₂ y CO₂ a partir de ácidos orgánicos de más de tres carbonos, de modo que una mezcla de éstos, como propiónico y butírico o sus sales, pueden ser utilizadas como sustrato específico para su valoración, usando como variable de respuesta la cuantificación del metano producido (Angelidaki *et al.*, 2009).

3.4.4. Actividad Metanogénica Específica -AME-. Ha sido la actividad más estudiada de todas, ya que permite elegir el inóculo adecuado para el arranque de un DA y optimizar variables operacionales desde antes de iniciar el proceso. Evalúa la habilidad de los microorganismos presentes en el inóculo, para utilizar

un sustrato determinado y generar metano, en condiciones controladas en el laboratorio, de modo que se alcance la máxima actividad bioquímica de conversión. Algunos sustratos usados son acetato, metanol, formiato o H₂ y CO₂ lo que define el grupo trófico al que se dirige. La Actividad Metanogénica Específica -AME- se expresa como la masa de sustrato, como DQO, que es convertida a metano por unidad de biomasa como SSV por unidad de tiempo: g DQO-CH₄/g SSV día (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Mata-Álvarez, 2003; Sandoval *et al.*, 2009; Angelidaki *et al.*, 2009).

Adicionalmente se mide el Potencial de Biometanización -PBM-, que se ha definido como la susceptibilidad de una sustancia a ser degradada biológicamente y está determinado básicamente en función de la estructura molecular sustrato (Rozzi and Remigi, 2004). Pero también puede estar condicionada por la presencia y cantidad de microorganismos capaces de llevar a cabo la degradación y producir metano a partir de este compuesto. Esto significa que mide la capacidad de biodegradación del sustrato, en función de la producción de metano. Se puede expresar en términos de m³ CH₄/kg SV, esto es, el volumen de metano acumulado en función de la cantidad de sustrato utilizado como sólidos volátiles -SV- (Raposo *et al.*, 2006; Angelidaki *et al.*, 2009; Angelidaki *et al.*, 2011).

3.5. BIOMASA USADA COMO SUSTRATO EN DIGESTIÓN ANAEROBIA

Se denomina biomasa toda clase de materia orgánica proveniente de organismos vivos, razón por la cual, sus fuentes son muy diversas, como los residuos agrícolas directamente de los cultivos o de su procesamiento industrial. También son biomasa el estiércol de diferentes animales, los residuos sólidos municipales y las aguas residuales domésticas e industriales y su característica común, sin

importar si provienen de un proceso biológico espontáneo o provocado, es que pueden ser utilizados como fuente de energía (Bhattacharya *et al.*, 2005).

La biomasa vegetal almacena la energía solar a través de la fotosíntesis, en sus enlaces químicos y puede ser liberada en forma de energía química cuando los enlaces entre carbonos adyacentes, moléculas de hidrógeno y de oxígeno se rompen por procesos de digestión, combustión o descomposición. Es por esto que, a través de la historia, este residuo ha sido la mayor fuente de energía para el hombre y actualmente se estima que aporta entre el 10 y 14% del total consumido en el mundo (McKendry, 2002).

En la estructura de la biomasa vegetal se encuentran polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, almidón y pectina, que son carbohidratos constituidos por unidades monoméricas unidas entre sí por enlaces glucosídicos. El rompimiento de estos enlaces, se lleva a cabo por enzimas diferentes, debido a la variación en la configuración de los enlaces; para la celulosa y hemicelulosa intervienen enzimas extracelulares llamadas celulasas y para el almidón y la pectina, actúan amilasas y pectinasas respectivamente, las cuales son enzimas constitutivas de las células microbianas (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

Gran parte de los residuos de restaurante, están constituidos por este tipo de biomasa, especialmente polisacáridos tipo almidón, lo que los hace un sustrato fácilmente biodegradable por enzimas hidrolíticas de microorganismos presentes. Alimentos como la papa, contienen 70-80% de agua, y la mayor parte de su materia seca es almidón; su degradación ocurre muy fácilmente y son convertidos en ácidos grasos tan rápido, que si el sistema no tiene suficiente capacidad buffer, cae el pH y la población metanogénica puede ser inhibida (Kaparaju y Rintala, 2005).

La biomasa de origen animal, además de carbohidratos, contiene proteínas, de las cuales hay de dos clases, unas globulares o proteínas funcionales, que son

fácilmente hidrolizables y las otras son fibrosas o proteínas estructurales, de mayor dificultad para la hidrólisis y por lo tanto, menos biodegradables. Ambos tipos están constituidos por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que pueden ser hidrolizados por proteasas, dando origen a péptidos y aminoácidos, los cuales son fermentados fácilmente hasta ácidos orgánicos, amonio y CO₂ (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Wang, 2008; Labatut, 2013).

En lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales, de sacrificio animal y de residuos industriales, se pueden encontrar, además, grasas o aceites. Químicamente, los lípidos están formado por ácidos grasos unidos por un enlace éster a una molécula de glicerol. Al ser hidrolizados, se rompe el enlace, quedando libres los ácidos grasos de cadena larga y las moléculas de glicerol, los cuales son convertidos en ácidos grasos volátiles y posteriormente en metano (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Wang, 2008; Labatut, 2013).

Las aguas residuales provenientes de empresas de alimentos, son aptas para DA, ya que contienen abundante materia orgánica y bajos niveles de sustancias inhibitoras. El principal factor para determinar su capacidad generadora de metano, es la cantidad de materia orgánica degradable presente y los parámetros usados para medirla son Demanda Biológica de Oxígeno -DBO- y Demanda Química de Oxígeno -DQO-, aunque una carga muy alta de éstos también inhibe la biometanización (Bhattacharya *et al.*, 2005).

Los lodos de aguas residuales que pueden generar problemas para su manejo y disposición final, podrían usarse como fuente de energía, como en el caso de producción de energía mediante DA, que ha propuesto la Organización de las Naciones Unidas en búsqueda de la sostenibilidad global (ONU, 2008).

Debido a la gran variedad de sustratos existentes como productos residuales de diferentes procesos y actividades, tanto naturales como antropogénicas y a la

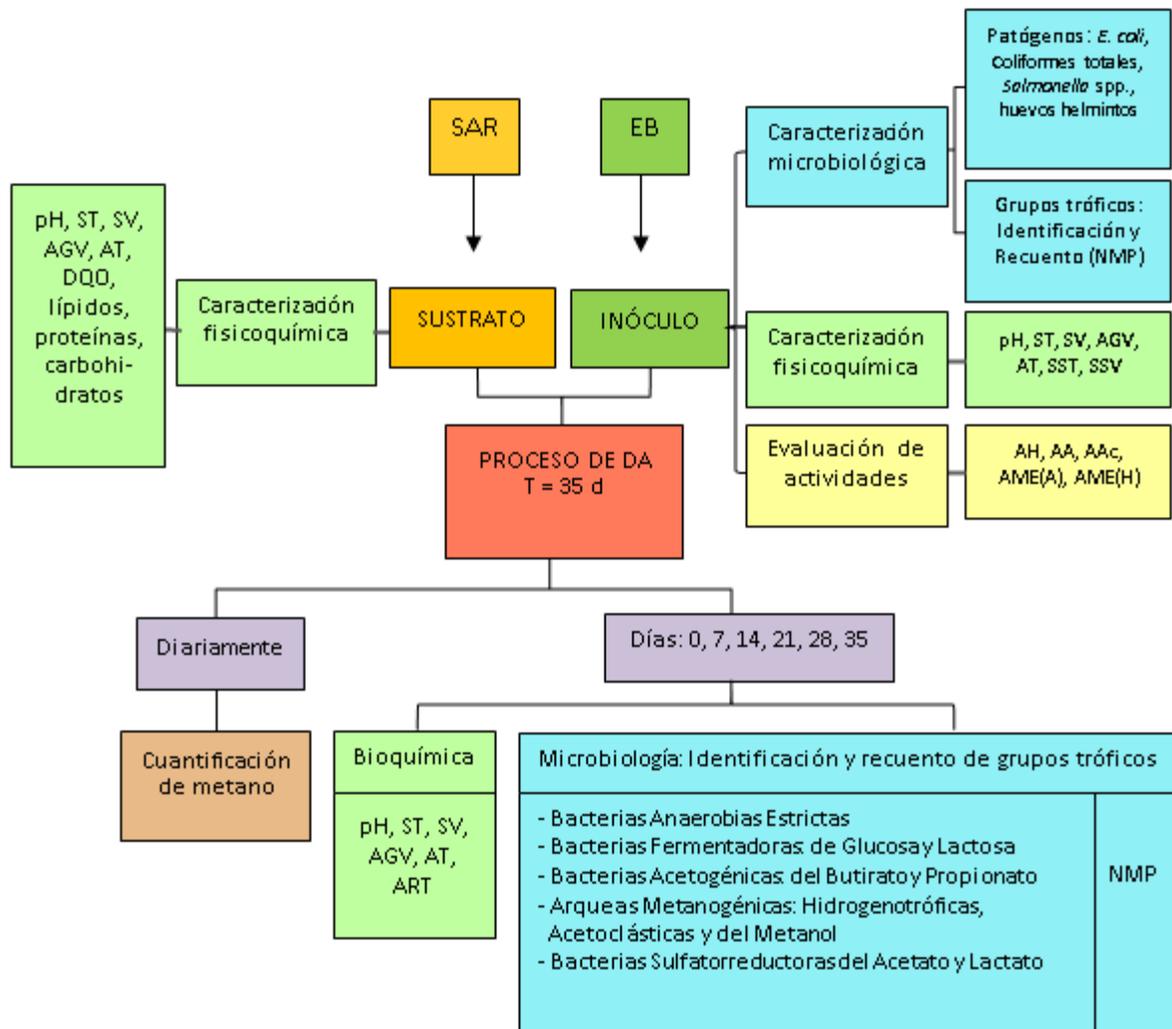
diversidad de sus componentes, una de las formas de mayor aplicación en DA es la co-digestión, en donde uno de los sustratos suple las carencias nutricionales del otro y se pueden reducir los efectos adversos de sustancias tóxicas, estabilizando el proceso, que de otra forma podría resultar inhibido (Mata-Álvarez *et al.*, 2000; Álvarez y Lidén, 2008; Álvarez *et al.*, 2010).

El tipo de sustrato usado en un sistema de DA, determina la comunidad trófica que se desarrolla, ya que cada grupo se desarrolla o reduce proporcionalmente al flujo del correspondiente sustrato en el digestor. El predominio de una ruta metabólica está determinado por la permanencia del sustrato específico para el grupo microbiano que la realiza y en la medida que éste disminuye, lo hará el grupo trófico, dando paso a otro que continúa el proceso y se multiplica a expensas de los subproductos resultantes (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

4. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se muestra el diagrama del diseño experimental del proyecto con las actividades desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos propuestos para el desarrollo del presente trabajo.

Figura 2. Diagrama de flujo del desarrollo de las actividades del proyecto



4.1. MATERIALES

4.1.1. Sustrato. Los SAR usados para el proceso de DA fueron recolectados del restaurante de Bienestar Universitario de la UIS. Las muestras se recogieron diariamente durante cuatro semanas, previa homogenización de los sobrantes en los recipientes en donde son habitualmente almacenados. En el laboratorio fueron triturados diariamente para ser guardados en congelación en contenedores plásticos y posteriormente hacer muestras compuestas a las que se hizo caracterización fisicoquímica.

4.1.2. Inóculo. El EB usado como inóculo, fue recolectado en la planta de sacrificio del Frigorífico Vijagual, ubicada en el Km. 8 de la vía Bucaramanga-Rionegro, Santander y transportado al laboratorio en recipientes herméticos. Debido al alto contenido de materia orgánica en un estiércol fresco, se alimentó con éste un reactor con capacidad para 23 L, manteniendo un volumen máximo de 18 L en condiciones de anaerobiosis, a temperatura ambiente y con agitación intermitente cada 30 minutos durante dos meses, para de permitir su estabilización por degradación de materia orgánica endógena (Angelidaki *et al.*, 2009). A fin de conocer la composición del EB, se hizo caracterización fisicoquímica y determinación cualitativa y cuantitativa de grupos tróficos relevantes en DA, como bacterias hidrolíticas-acidogénicas y acetogénicas, arqueas acetogénicas, hidrogenotróficas (Rozzi and Remigi, 2004) y del metanol, así como de grupos que pueden causar inhibición, bacterias sulfatorreductoras (Díaz- Báez *et al.*, 2002). Adicionalmente, debido al potencial del EB para aportar microorganismos patógenos causando de salud pública por ser un estiércol (Demirer y Chen, 2005;), en caso de ser usado como mejorador de suelos (Nicholson *et al.*, 2005; Martensa y Böhm, 2009), se realizaron análisis para determinar la presencia de organismos

patógenos, como coliformes totales, *E.coli*, *Salmonella* spp, y huevos de helmintos, lo que limitaría su uso.

4.1.3. Medios de cultivo. Se prepararon medios de cultivo anaerobios básicos - MCAB- de acuerdo a protocolos de Díaz-Báez *et al.*, (2002), que se fueron adaptando junto con otros reportados, de acuerdo a lo que se quería evaluar (MMLBA, 2009; Angelidaki *et al.*, 2009; Sandoval *et al.*, 2009). Se adicionaron macro y micronutrientes, vitaminas, bicarbonato como tampón, sulfito de sodio y cisteína como reductores de oxígeno y resazurina como indicador de anaerobiosis. Para evaluar las actividades del inóculo, se prepararon medios con sustratos específicos (Anexo 1). Para lograr la selectividad del crecimiento microbiano de acuerdo a los grupos metabólicos que se buscaba identificar y cuantificar, se adicionaron sustratos y sustancias indicadoras de crecimiento (Anexo 2). Los medios se envasaron en frascos de vidrio en condiciones de anaerobiosis, desplazando el oxígeno por remplazo con nitrógeno, se sellaron con tapones de butilo y agrafes de aluminio y se esterilizaron en autoclave (Díaz-Báez *et al.*, 2002; MMLBA, 2009; Angelidaki *et al.*, 2009).

4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.2.1. Determinación del potencial degradador del inóculo. Con el propósito de determinar el potencial del inóculo para llevar a cabo la DA, se hicieron ensayos específicos para cada etapa. En la Tabla 1 se muestra un resumen de las variables, con las características más relevantes de cada actividad. Todos los experimentos y los blancos sin sustrato se hicieron por triplicado.

4.2.1.1. Actividad Hidrolítica: La evaluación de la AH se fundamentó en la capacidad degradadora del almidón por parte de los consorcios microbianos. Se eligió este polisacárido, debido a que durante la recolección de los residuos se observó que la mayor proporción de los SAR postcocción originados en el restaurante de Bienestar Universitario UIS, es papa, yuca y arroz. El almidón es el mayor componente encontrado en tubérculos, leguminosas, cereales y frutas (Satin, 1998; Hernández-Medina *et al.*, 2008).

Los ensayos se realizaron en botellas con una capacidad de 500 mL y volumen de operación de 391 mL, compuesto por 300 mL de MCAB y 91 mL de inóculo. El volumen de inóculo se calculó para adicionar 1.5 g de SSV/L, teniendo en cuenta que los reactores no tenían agitación (Díaz-Báez *et al.*, 2002). Se adicionó almidón a razón de 10 g/L de medio (MMLBA, 2009). Se prepararon blancos del inóculo sin sustrato, a fin de sustraer la AH debida a materia orgánica endógena. Todas las pruebas se hicieron por triplicado (Angelidaki *et al.*, 2009). Se incubaron a $39 \pm 2^\circ\text{C}$ y se tomaron 2 mL de muestra cada 40 minutos durante 16 horas para hacer seguimiento de la actividad por análisis de ART, dado que por hidrólisis del almidón se originan unidades de glucosa y éste es un azúcar reductor. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos para analizarlas por el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico –DNS- y se leyeron a 540 nm en un espectrofotómetro GENESYS 20 ThermoSpectronics (Miller, G., 1959). Con los datos obtenidos, se hicieron los cálculos de acuerdo a la curva de calibración de la glucosa (Anexo 3) y los resultados fueron graficados. Se determinó la AH teniendo en cuenta los puntos de la pendiente más pronunciada, en razón de la máxima velocidad de formación de ART, como g DQO glucosa/g SSV*día (Anexo 4).

4.2.1.2. Actividad Acidogénica: La AA se evaluó de la misma forma descrita para la AH. La experimentación se evaluó con base en la máxima velocidad de formación de AGV a partir de glucosa como sustrato específico. Ésta se usó

debido a que es el carbohidrato más simple y es intermediario común en la vía de degradación de azúcares complejos, además su utilización por parte de microorganismos fermentadores produce ácidos orgánicos.

Tabla 1. Parámetros establecidos para evaluar las actividades del inóculo

ACTIVIDAD	SIGLA	SUSTRATO	VARIABLE EVALUACIÓN	MÉTODO	FRECUENCIA
Hidrolítica	AH	Almidón	ART	Colorimétrico (DNS)	40 min.
Acidogénica	AA	Glucosa	AGV	Titrimétrico (HCl-NaOH)	40 min.
Acetogénica	Aac	Propionato-Butirato	Producción de CH ₄	Desplazamiento alcalino	Diaria
Metanogénica Específica (Acetoclástica)	AME (A)	Acetato	Producción de CH ₄	Desplazamiento alcalino	Diaria
Metanogénica Específica (Hidrogenotrófica)	AME (H)	Ácido fórmico	Producción de CH ₄	Desplazamiento alcalino	Diaria

Para los ensayos se adicionaron 10 g/L de sustrato. El volumen de operación de los reactores fue de 326 mL: 250 mL de MCAB y 76 mL de inóculo. Se tomaron 8 mL de muestra cada 40 minutos durante 16 horas para hacer seguimiento de la actividad por análisis de AGV. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 30 minutos para analizarlas por titulación con HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N (Anderson, G.K. y Yang, G., 1992). Con los datos obtenidos se hicieron los cálculos, los resultados fueron graficados y se determinó la AA para el punto de la máxima pendiente, en función de la velocidad de formación de AGV, como g DQO ácido acético/g SSV*día.

4.2.1.3. Actividad Acetogénica: Para la determinación de la AAc se utilizó una mezcla de ácidos orgánicos, propiónico y butírico, a razón de 5 g/L de cada uno, como sustrato específico y se calculó la actividad en el punto máximo de la pendiente de producción de metano, como resultado del metabolismo de bacterias

acetogénicas sintróficas que transforman los ácidos en acetato y éste es convertido a CH₄ por arqueas metanogénicas (Angelidaki *et al.*, 2009).

Las pruebas se realizaron utilizando frascos de vidrio para un volumen 50 mL, con 30 mL de MCAB y 9,1 mL de inóculo, calculado para adicionar 1.5 g SSV/L. La variable de respuesta para el seguimiento esta actividad fue cuantificación de metano por desplazamiento alcalino, medido cada 24 horas (Díaz-Báez *et al.*, 2002). Se graficaron los datos obtenidos y se determinó la AAc en el punto de la máxima pendiente, correspondiente a la mayor velocidad de formación de metano, como g DQO CH₄/g SSV*día.

4.2.1.4. Actividad Metanogénica Específica: Para la determinación de la AME, se diseñaron los reactores con los mismo volúmenes de la actividad anterior, al igual que el monitoreo también, con diferentes sustratos. Se hicieron las gráficas de los datos obtenidos; para determinar la AME se buscó el punto de máxima pendiente correspondiente a la mayor velocidad de formación de metano, dados como g DQO CH₄/g SSV*día.

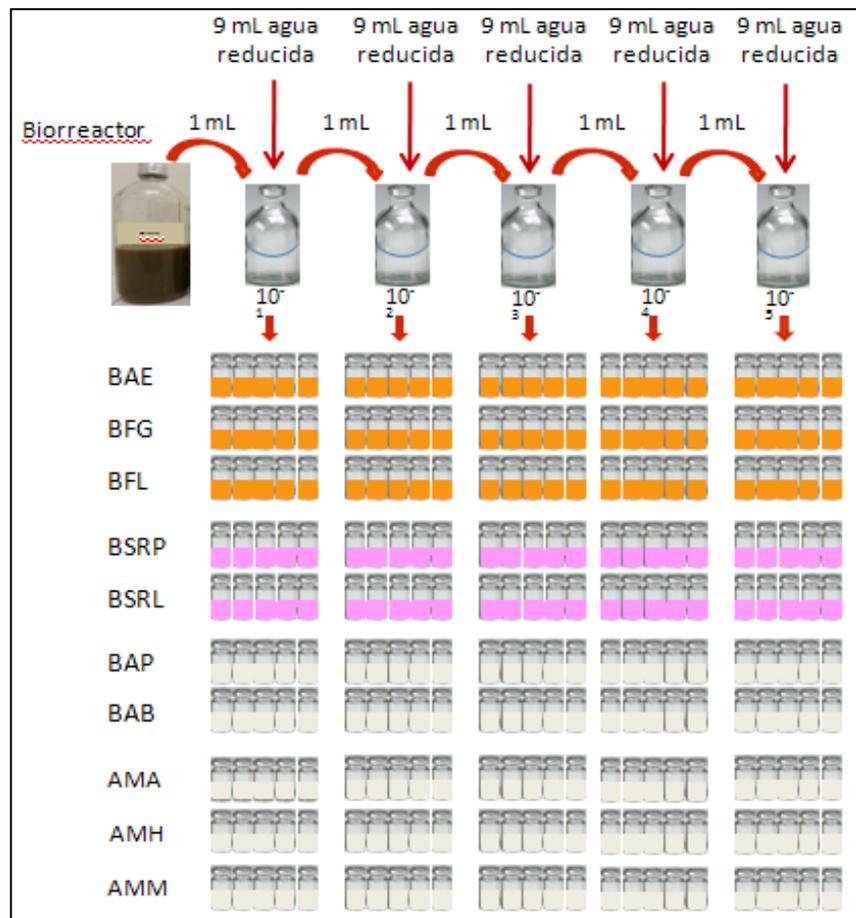
- **Acetoclástica:** El sustrato específico para esta actividad fue acetato, teniendo en cuenta que el metano formado por arqueas metanogénicas acetoclásticas se debe a rompimiento de esta molécula (Díaz-Báez *et al.*, 2002; Angelidaki *et al.*, 2009).

- **Hidrogenotrófica:** Para la determinación de esta actividad, se usó ácido fórmico como sustrato, ya que el rompimiento de esta molécula origina H₂ y CO₂ y éste último es reducido a metano por arqueas hidrogenotróficas (Madigan *et al.*, 2004; Sandoval *et al.*, 2009).

4.2.2. Caracterización de grupos tróficos. Con el fin de identificar y cuantificar los diversos grupos metabólicos relevantes para el proceso de DA, se prepararon

diluciones sucesivas de la muestra en agua reducida y se hizo siembra en medios de cultivo selectivos para los grupos que se querían identificar, junto con la metodología del Número Más Probable –NMP-, una forma probabilística de estimar una población microbiana cuando no es posible hacer la evaluación cuantitativa individual. Se sembraron cinco réplicas por dilución en cada medio, con 0.2 mL de ocho diluciones sucesivas y se llevaron a incubación a $39 \pm 2^\circ\text{C}$ por el tiempo establecido para cada grupo. Su lectura se hizo por presencia o ausencia de crecimiento y se repitió el procedimiento para los diez grupos (Figura 3) (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

Figura 3. Preparación de la muestra y siembra para recuento por NMP



4.2.2.1. Grupos tróficos del inóculo: Para conocer la población microbiana presente en el EB solo, se prepararon las diluciones a partir de 1 mL del EB y se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Las lecturas se hicieron de acuerdo al cambio establecido como positivo en el medio, como se puede observar en la Tabla 2. Cuando el crecimiento fue positivo en todas las diluciones sembradas, se repitieron hasta llegar hasta a las diluciones en que no hubo crecimiento y se anotaron los valores correspondientes a los tubos positivos de las últimas tres diluciones en que sí lo hubo. La combinación de estos tres dígitos se buscó en la Tabla de McGrady para hallar el número de bacterias correspondiente, como se ve en el ejemplo de la Figura 4 (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

Con este dato, se procedió a calcular un número probable de células viables en la muestra, por gramo de SSV del inóculo, de acuerdo a la ecuación dada en el protocolo de Díaz-Báez *et al.*, 2002:

$$\text{NMP/g SSV} = \frac{\text{Número de bacterias} * \text{Máxima dilución positiva} * 5000}{\text{g SSV}}$$

4.2.2.2. Grupos tróficos del proceso de digestión anaerobia: El anterior procedimiento se repitió con las muestras tomadas cada 7 días de los biorreactores en donde se hizo el experimento de la DA de SAR con EB, con el fin de hacer seguimiento a la actividad microbiana y específicamente a las interacciones que ocurren entre los diferentes grupos tróficos a lo largo de los 35 días de digestión.

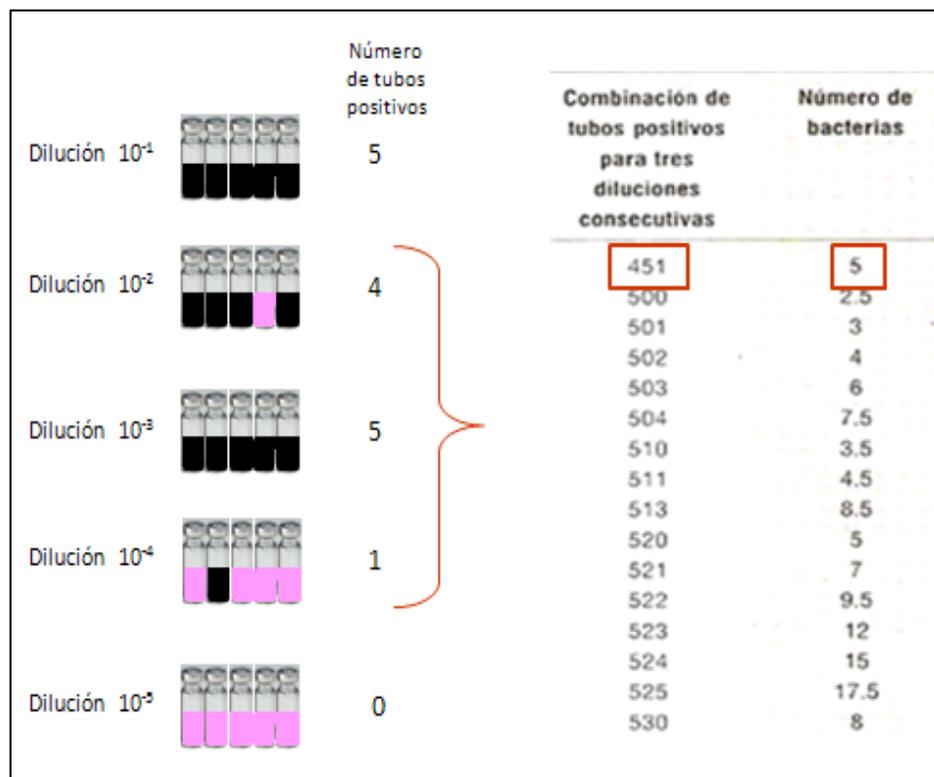
Tabla 2. Características de los medios de cultivo para determinar el NMP

GRUPOS TRÓFICOS	SUSTRATO	INCUBACIÓN (días)	LECTURA/CAMBIO
*B. Anaerobias Estrictas (BAE)	Glucosa	5 a 8	Verde a amarillo
*B. Fermentadoras de Glucosa (BFG)	Glucosa	5 a 8	Verde a amarillo
*B. Fermentadoras de Lactosa (BFL)	Lactosa	5 a 8	Verde a amarillo
*B. Acetogénicas del Propionato (BAP)	Propionato	30 a 60	Producción de CH ₄
*B. Acetogénicas del Butirato (BAB)	Butirato	30 a 60	Producción de CH ₄
*A. Metanogénicas Acetoclásticas (AMA)	Acetato	30 a 60	Producción de CH ₄
*A. Metanogénicas Hidrogenotróficas (AMH)	H ₂ CO ₂	15 a 45	Producción de CH ₄
*A. Metanogénicas del Metanol (AMM)	Metanol	30 a 60	Producción de CH ₄
*B. Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA)	Acetato	7 a 15	Precipitado negro
*B. Sulfatorreductoras del Lactato (BSRL)	Lactato	7 a 15	Precipitado negro

*B: Bacterias *A: Arqueas

Fuente: Díaz-Báez *et al.*, 2002

Figura 4. Lectura de tubos positivos y uso de la tabla de McGrady



4.2.3. Ensayo de digestión anaerobia y seguimiento al proceso. Para el estudio de la DA de los SAR con el EB, se definieron previamente las condiciones operativas de los reactores, las cuales se resumen en la Tabla 3.

4.2.3.1. Condiciones operativas: Se hicieron los cálculos de acuerdo a los SV de la caracterización de los SAR y el EB, para determinar los volúmenes necesarios para mantener la relación inóculo-sustrato –RIS- 3 (g SV inóculo/ g SV sustrato), establecida de acuerdo a estudios previos realizados en el laboratorio. Se midieron 28 mL de inóculo y 1.4 mL de sustrato en frascos de vidrio de 50 mL, se hizo desplazamiento del oxígeno con N₂ para asegurar anaerobiosis y se sellaron con tapones de butilo y agrafes de aluminio. El experimento se hizo por triplicado.

4.2.3.2. Monitoreo de variables del proceso: El seguimiento al proceso de DA con el fin de controlar su estabilidad y evolución, se hizo analizando muestras de los biodigestores cada 7 días para determinar pH, ST, SV, ART, AGV, AT y diariamente se cuantificó metano.

Tabla 3. Condiciones operativas establecidas para los biorreactores

PARÁMETRO	VALOR
Sustrato	Sobrantes alimenticios de restaurante
Inóculo	Estiércol Bovino
RIS	3
Volumen reactor	50 mL
Volumen operación	29.4 mL
Espacio de cabeza	20.6 mL
Temperatura	39±2°C
Tiempo de digestión	35 días
Agitación	Intermitente/manual

4.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.3.1. Caracterización del sustrato. En la caracterización fisicoquímica del sustrato se hizo el análisis elemental para C, H, O, N y S por cálculos porcentuales, al igual que para carbohidratos, celulosa, holocelulosa y lignina. El análisis de pH se hizo por método potenciométrico. La determinación de ST y de SV se realizó por técnicas gravimétricas, de acuerdo a los protocolos NTC 35 y NTC 5167 respectivamente. DQO se determinó con la técnica Walkle y Black según norma NTC 5167 y proteínas por Kjeldahl. AGV y AT se determinaron por la técnica titrimétrica con HCL 0.1N y NaOH 0.1N (Anderson, G.K. y Yang, G., 1992).

4.3.2. Caracterización del inóculo. Para la caracterización fisicoquímica del EB se hizo análisis del pH por una técnica potenciométrica de acuerdo a la NTC 5167. Para determinación de sólidos, se analizaron ST, SST y SSV mediante técnicas gravimétricas y los protocolos seguidos fueron SM 2540, SM 2540B y SM 2540E respectivamente. La determinación de AT se realizó por método volumétrico.

En la caracterización microbiológica para patógenos, se analizó una muestra del EB estabilizado, para coliformes totales y *E. coli* por siembra en superficie en medio con sustrato enzimático *Chromocult*, acorde al protocolo SM 9223B. Para analizar presencia de *Salmonella* spp. se realizó siembra en superficie en medio SS -Salmonella-Shigella-. Se incubaron a 37°C por 48 horas. La determinación de huevos de helmintos se hizo siguiendo el protocolo de flotación en solución salina saturada y presencia o no de huevos por observación microscópica.

4.3.3. Variables de control del proceso de DA: El análisis de las muestras para determinación de pH por el método potenciométrico se hizo según norma SM

4500B. Para ST y SV por métodos gravimétricos, se procesaron las muestras de acuerdo a los protocolos SM 2540 y SM 2450E respectivamente (APHA 2005). La cuantificación de ART se hizo por el método colorimétrico previamente descrito, al igual que la determinación de AGV y AT por la técnica titrimétrica. Adicionalmente se determinó la relación AGV/AT para establecer la capacidad buffer del sistema. Para monitorear la producción de metano del proceso de DA, diariamente se hizo su cuantificación por el método de desplazamiento alcalino (Díaz-Báez *et al.*, 2002). La normalización de los datos se hizo con la ecuación:

$$V_{NTP} = V * \frac{P_0 - P_V}{P_{atm} * T}$$

En donde:

V_{NTP} = Volumen de gas en condiciones normales (mL)

V = Volumen de gas generado (mL)

P_0 = Presión del CH₄ en condiciones normales (mbar)

P_V = Presión de vapor del agua (mbar)

P_{atm} = Presión atmosférica

T = Temperatura al momento de medir

4.4. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, se halló la media aritmética y se determinaron sus desviaciones estándar. A partir de estos datos se realizaron las gráficas y el análisis estadístico de los resultados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE INÓCULO Y SUSTRATO

Los resultados de las caracterizaciones se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la caracterización fisicoquímica de SAR y EB

PARÁMETROS	UNIDADES	SAR	EB
pH	-	4.095	7.6
ST	g / kg	220.80	47.41
SV	g / kg	165.22	20.00
SST	g SST /L	N.D.	5.44
SSV	g SSV /L	N.D.	4.92
AGV	g AGV /L	3.41	1.20
AT	gCaCO ₃ /L	1.90	5.66
DQO	g O ₂ /kg	1257.25	N.D.
Proteínas	g /kg	3.115	N.D.
Lípidos	g /kg	26,37	N.D.
Carbohidratos	g /kg	112,45	N.D.
Holocelulosa	% p/p	6.165	N.D.
Lignina	% p/p	< 0.01	N.D.
C	% p/p	43.28	N.D.
H	% p/p	5.19	N.D.
O	% p/p	36.345	N.D.
N	% p/p	3.115	N.D.
S	% p/p	0.45	N.D.
Poder calorífico inf.	Kcal /kg	783.5	N.D.
Fórmula empírica	-	C ₁₆ H ₂₃ O ₁₀ N	-

*N.D. No Determinado

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que el pH de los SAR es ácido y el del inóculo está ligeramente por encima de la neutralidad, muy similares a los reportados por Callahan *et al.*, (2002) para EB y residuos de frutas y verduras de su estudio; esto permite que la mezcla, especialmente a una RIS 3,

forme un efecto tampón, que no inhibe microorganismos metanogénicos, los cuales son sensibles a alteraciones en este parámetro. Los AGV del EB está mucho más bajo que los reportados para otros inóculos, como Quintero *et al.*, (2012) con valores entre 2.3 y 20.9 g/L, dentro de los cuales se ubica el dato de los SAR. Se observa una buena capacidad buffer, característica en estiércoles, que puede amortiguar la caída del pH cuando los carbohidratos, abundantes, sean hidrolizados y transformados en AGV. La AT es significativamente más alta, que en los inóculos analizados por Quintero *et al.*, (2012), con valores entre 1.7 y 4.1 gCaCO₃/L para estiércol porcino y líquido ruminal respectivamente.

Los SSV de 4.92 g/L del EB son mucho más bajos que reportados en anterior estudio, con valores entre 4 y 58 g/L para líquido ruminal y EB fresco respectivamente. Dado que los SSV del inóculo representan la biomasa microbiana contenida en el inóculo, podría dudarse de su potencial para iniciar el proceso de DA, pero en el mencionado estudio, el inóculo usado fue una mezcla y uno de ellos presentaba el valor más bajo para este parámetro. Por otro lado, en el estudio realizado por Demirer y Chen, (2005) usando como inóculo lodos de lagunas anaerobias junto con un EB que tenía una concentración de SSV de 4.5 g/L, se incrementó el rendimiento del sistema en dos fases, un 25%. Por otro lado, el trabajo de Regueiro *et al.*, 2012, evaluó varios inóculos, cuyos valores de SSV estuvieron muy cercanos a los de este estudio, excepto por uno proveniente de industria cervecera con una concentración de SSV de 34.9 g/L y otro de industria azucarera con 1.3 g/L.

Como se esperaba por lo observado durante la recolección de los SAR, debido al tipo de residuo, predominan carbohidratos, en menor proporción están lípidos y por último proteínas; la lignina está casi ausente. La relación C/N es de 13.9, valor que se encuentra dentro del rango reportado por la literatura como óptimo para alcanzar el máximo potencial de producción de metano (Amon *et al.*, 2007). El bajo contenido de sulfuros favorece la vía metanogénica, debido a que, sin éstos las

bacterias sulfatorreductoras no desvían la ruta metabólica hacia la producción de H₂S (Khanal, 2008). En estas circunstancias, utilizan los ácidos orgánicos, principalmente propionato, para generar acetato (Elferink *et al.*, 1998).

5.2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL INÓCULO

5.2.1. Microorganismos patógenos. Se hicieron análisis para detectar la presencia de microorganismos patógenos que pueden encontrarse en los biosólidos de procesos de DA y particularmente en este caso, por tratarse de EB. De acuerdo a los resultados obtenidos, el inóculo estabilizado no presenta ninguno de los microorganismos patógenos para los que se practicaron análisis, como se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de análisis de microorganismos patógenos en EB

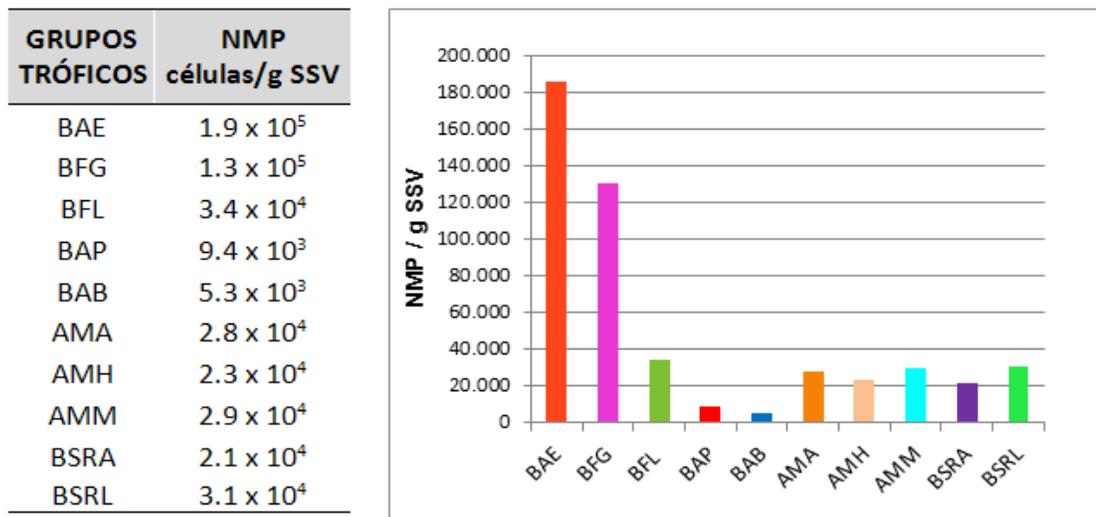
PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADO
Coliformes totales	UFC/g	0
<i>E. coli</i>	UFC/g	0
<i>Salmonella</i> spp.	UFC/g	0
Huevos de helmintos	Unidades/g	0

Estos resultados son acordes con una de las ventajas que se promueve de la DA, en relación con la eliminación o por lo menos reducción de la microbiota patógena. De acuerdo a las investigaciones, parece estar relacionado con la deshidratación de los lodos y con la temperatura de operación del reactor, cuando trabaja en rango termófilo (Appels *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha encontrado que el tiempo de retención hidráulico tiene una alta influencia en la reducción de los patógenos presentes en sistemas anaerobios que tratan EB, por lo que puede ser

una forma de control (Alves *et al.*, 2014). Esto podría deberse a la ausencia de oxígeno o a la competencia por nutrientes y explica la ausencia de estos microorganismos en la muestra analizada, dado el tiempo de estabilización que ha permanecido dentro del reactor del laboratorio.

5.2.2. Grupos tróficos. Teniendo en cuenta los datos obtenidos, en la Figura 5 se observa que el recuento más alto es para las BAE, lo cual se esperaba, debido a que este es un medio enriquecido con glucosa, lo cual permite el crecimiento de los microorganismos presentes y la selectividad está dada exclusivamente por la ausencia de oxígeno del medio.

Figura 5. Resultados del recuento de grupos tróficos del inóculo



De los grupos metabólicos, el correspondiente a bacterias hidrolíticas-fermentativas, es el que se encuentra en mayor proporción, principalmente las BFG, como puede observarse en la Figura 5, en donde se presentan los resultados de la caracterización de los grupos tróficos del inóculo y su proporción

se puede observar representada en la gráfica. Las BFL, aunque tienen una población mayor que la de otros grupos, equivale sólo al 26% del grupo fermentador de glucosa. En el estudio de Cardinali-Rezende *et al.*, (2012) hallaron, mediante PCR cuantitativo, que la comunidad bacteriana predominante en una laguna con lodo anaerobio porcino, fue la de oxidadores de carbohidratos y Quintero (2012) mediante NMP, encontró poblaciones de 8×10^{11} y 1.7×10^9 para BFG y BFL respectivamente, lo que coincide con los valores más altos de SSV de su inóculo, 23.6 g/L, lo que es casi cinco veces mayor del valor obtenido para el EB del presente estudio.

El siguiente grupo en proporción es el de arqueas metanogénicas, las cuales cuentan con poblaciones bastante similares entre sí, pero la mayor es AMM, la población acetoclástica es sólo un 3.5% menor y la hidrogenotrófica lo es en un 20,7%. Un valor muy semejante encontró Quintero (2012) en su estudio para AMM, pero para AMA y AMH los valores fueron 5 y 3 órdenes de magnitud más altos respectivamente. Muy cercana a esta población, en número, se encuentra la de bacterias sulfatorreductoras, siendo la del lactato 68% mayor que la del acetato. Dado que la presencia de sulfatos en los SAR es baja, la población sulfatorreductora también lo es y su comportamiento puede ser acetogénico, como se discutió anteriormente. El grupo del acetato en el estudio de Quintero (2012) fue de 1.75×10^6 .

De todos los grupos, el menor número de células lo presentan las bacterias acetogénicas, de las cuales BAP tiene un 53% más que BAB. El recuento para la población BAP en el estudio de Quintero (2012) fue negativo y BAB no fue cuantificado. En este punto, cabe recordar la dependencia de estos grupos con los consumidores de H_2 para reducir su presión parcial en el medio, ya que su número real dentro del consorcio puede ser subestimado a nivel de laboratorio debido a inhibición, en ausencia de la contraparte consumidora. Esto ocurre teóricamente, pero Visser *et al.*, (1993) demostraron que estos bajos recuentos ocurren inclusive

cuando los metanógenos hidrogenotrofos exceden en número los acetógenos. Por otro lado, en ausencia de sulfatos, las BSR utilizan propionato para su metabolismo, reduciendo su disponibilidad y compitiendo con las BAP por este sustrato común, de acuerdo a los resultados de Elferink *et al.*, (1998), lo que también podría explicar la escasa población.

Dado que el metabolismo dentro del rumen tiene como fin la producción de AGV para su asimilación en este mismo sitio, el H₂ generado puede ser utilizado principalmente por la vía de la acetogénesis homoacetógena para generar más acetato asimilable, lo que limitaría la metanogénesis hidrogenotrófica; esto puede explicar que este grupo tenga la menor proporción de todas las arqueas caracterizadas. Esta selección natural de grupos tróficos dependientes del hidrógeno, fue estudiado por Wang *et al.*, (2013) al alimentar un reactor anaerobio con una mezcla de hidrógeno y monóxido de carbono simulando gas proveniente de horno a carbón, encontrando predominio de bacterias homoacetógenas y arqueas hidrogenotróficas.

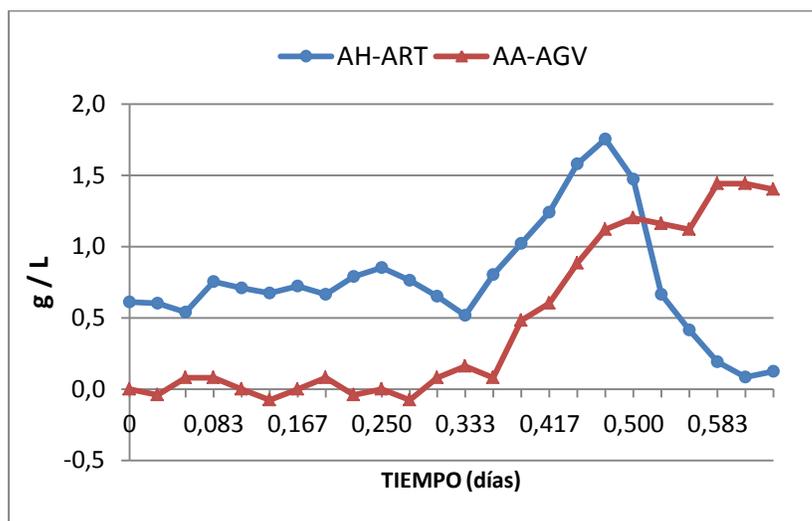
Estos datos coinciden con los reportados por Ito *et al.*, 2012 en donde se determinaron las poblaciones degradadoras de glucosa, propionato y acetato mediante técnicas moleculares (RNA-SIP y MAR-FISH), encontrando que la población más abundante fue la de microorganismos degradadores de glucosa, seguida por la población de degradadores del acetato y la población menor fue la de microorganismos degradadores del propionato. Por otra parte, los valores resultan bajos si se comparan con los recopilados por Díaz-Báez (2002) a partir de algunos estudios de lodos de diferentes industrias, en los cuales los valores estuvieron por encima de 10⁶ para los grupos tróficos evaluados por NMP.

Las poblaciones se mantienen en función del sustrato; un grupo trófico se reduce o prolifera proporcionalmente a la presencia del sustrato que utiliza; si éste abunda, también lo hace la población que lo consume (Díaz-Báez *et al.*, 2002).

5.3. ACTIVIDADES DEL INÓCULO

5.3.1. Actividades evaluadas para las primeras etapas de la DA. Los resultados de los análisis realizados para el seguimiento de las actividades hidrolítica y acidogénica del inóculo, por formación de productos, ART y AGV respectivamente, se graficaron y las cinéticas obtenidas para el tiempo de seguimiento, se muestran en la Figura 6.

Figura 6. Cinética de la producción de ART en AH y AGV en AA



Con los valores de ART obtenidos para la AH usando como sustrato modelo el almidón, se observa un tiempo de adaptación de 8 horas para los microorganismos, dado que los valores de ART muestran una leve oscilación entre 570 y 810 mg/L durante este tiempo. Inician su ascenso partiendo de 480 mg/L hasta alcanzar un máximo de 1700 mg/L en 4.2 horas. No se observa fase estacionaria, por el contrario, el descenso es abrupto.

En la curva de seguimiento de la AA, los datos correspondientes a los AGV analizados, muestran que la población microbiana tuvo un tiempo de adaptación similar al anterior, de 8.4 horas. Durante las primeras 8 horas los valores de AGV oscilaron entre 0 y 80 mg/L, con un ascenso hasta 160 mg/L a los 40 minutos, pero volvieron a caer a 80 mg/L, para tener un ascenso continuo durante 3.6 horas, hasta 1200 mg/L a las 12 horas. El descenso no fue continuo, sino que por el contrario, presentó nuevamente una pendiente hasta las 14 horas. Después de esta hora, los valores se estabilizaron mostrando la fase estacionaria de la cinética microbiana. Luego se inicia el descenso correspondiente a la muerte celular por consumo del sustrato y acumulación de subproductos tóxicos.

Se calcularon los datos para estas actividades (Ver Anexo 4) y se obtuvieron valores de 1.98 y 1.96 gDQO/gSSV.día para AH y AA respectivamente, los cuales muestran correlación con los recuentos de los dos grupos tróficos relacionados con estas actividades, BFG y BFL, las poblaciones más altas, como se puede ver en la Tabla 6. La similitud de resultados en ambas actividades se debe a que éstas son llevadas a cabo por los mismos grupos microbianos, ambos son fermentadores primarios, intervienen conjuntamente en las dos etapas y están representados en este estudio por BFG y BFL, los cuales son las poblaciones más abundantes en el EB, los metabólicamente más activos y con una velocidad de duplicación celular cada 30 minutos aproximadamente (Mussati *et al.*, 1999).

Tabla 6. Resultados de actividades evaluadas en función de ART y AGV

ACTIVIDAD MICROBIANA	SUSTRATO	VARIABLE DE SEGUIMIENTO	VALOR (gDQO/gSSVdía)	GRUPOS TRÓFICOS	NMP células /g SSV
Hidrolítica	Almidón	ART	1.98	BFG	1.3×10^5
Acidogénica	Glucosa	AGV	1.96	BFL	3.4×10^4

Los resultados obtenidos para la AH son más altos que los obtenidos por Quintero (2012) para varias muestras analizadas, cuyos valores estuvieron entre 0.009 y 0.095 gDQO/gSSV.día, pero el sustrato usado fue celulosa. Por otro lado, se encuentra dentro de los rangos reportados por Regueiro *et al.*, (2012) con 0.8 y 2.18 gDQO/gSSV.día para varios inóculos usando almidón como sustrato. Con respecto a la AA, el valor obtenido en el citado estudio fue un poco más bajo, cuyos resultados estuvieron entre 1.39 y 2.95 gDQO/gSSV.día.

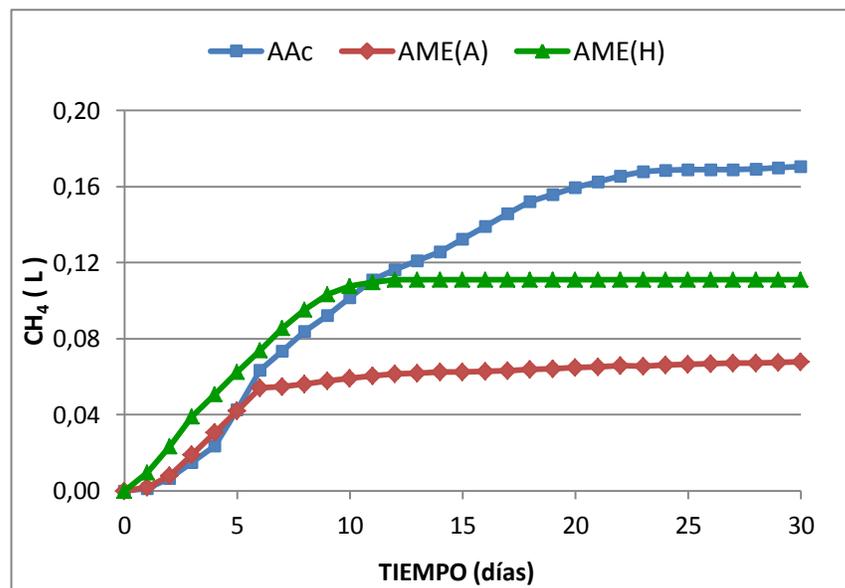
Se puede inferir que estos microorganismos cuentan con las enzimas constitutivas específicas, amilasas, para la hidrólisis del almidón y utilizan eficientemente el sustrato disponible en el medio como glucosa, en la AA (Díaz-Báez *et al.*, 2002). Por lo tanto, se espera que durante la DA puedan degradar rápidamente el almidón que se encuentra en los SAR para su biometanización.

5.3.2. Actividades específicas en función de la producción de metano. En la cinética para la AAc a partir de butirato y propionato mostrada en la Figura 7, se observa una etapa de adaptación de un día y a partir del segundo se inicia un ascenso rápido hasta el día 6. El volumen de metano casi se duplica diariamente durante los primeros 5 días, alcanzando los 63.4 mL al día 6. Para el día 24, se ha producido el 99% del metano total, la producción se ralentiza y después es mínima. El valor obtenido en los cálculos (Ver Anexo 5), fue 0.85 gDQO/gSSV.día y corresponde a un 44% más del publicado por Regueiro *et al.*, (2012), de 0.1-0.48 gDQO/gSSV.día para los inóculos estudiados, aunque su mezcla de AGV contenía adicionalmente acetato, como también hizo Torres *et al.*, (2007), cuyos valores estuvieron entre 0.001 y 0.42 gDQO/gSSV.día.

Las bacterias acetogénicas son las responsables de esta actividad y en el presente estudio están representadas por BAB y BAP, las cuales no son poblaciones muy abundantes inicialmente, como se observa en la Tabla 7. Sin

embargo, se debe tener en cuenta que las poblaciones acetogénicas sintróficas, a partir de los AGV producen acetato y adicionalmente H_2 y CO_2 . Estos últimos pueden ser a su vez utilizados por dos grupos microbianos, bacterias homoacetógenas para formar más acetato y arqueas hidrogenotróficas para generar metano. De modo que la generación de metano se puede dar también por la vía acetoclástica, a partir del acetato producido por las dos rutas, lo que puede explicar la velocidad de esta actividad y su alta producción de metano.

Figura 7. Cinética de producción de metano en AAc, AME(A) y AME(H)



En esta misma gráfica se observa la cinética para la AME(A). Durante el día 1 casi no hubo producción de metano a partir de acetato, lo que se puede atribuir a la etapa de adaptación de las arqueas metanogénicas acetoclásticas. Del día 2 al 6 ocurre un ascenso rápido, con una producción de metano de alrededor de 11 mL diariamente, con volumen acumulado de 54.1 mL. De este día hasta el 30 sólo se incrementa 14 mL, para un volumen total de 68 mL de CH_4 a los 30 días.

Con los datos obtenidos, se puede inferir que el casi 80% de metano producido entre el día 2 y 5, fue debido a la población presente inicialmente, ya que la multiplicación de este grupo demora de 2 a 3 días (Mussati *et al.*, 1999). La producción de metano se incrementó lentamente, en la medida en que crecía la población, lo que se refleja en la velocidad de la actividad, 0.6 gDQO/gSSV.día. Este valor es significativamente más alto que el reportado por Regueiro *et al.*, (2012), entre 0.01 y 0.33 gDQO/gSSV.día y por Quintero *et al.*, (2012) con valores entre 0.017 y 0.146 gDQO/gSSV.día para varios inóculos. En contraste, es mucho más bajo que el de Sandoval *et al.*, (2009), quien reportó 2.39 gDQO/gSSV.día para el inóculo estudiado.

Tabla 7. Resultados de actividades evaluadas mediante producción de CH₄

ETAPA BIOQUÍMICA	ACTIVIDAD MICROBIANA	SUSTRATO	VALOR (gDQO/gSSVdía)	GRUPOS TRÓFICOS	NMP células /g SSV
Acetogénesis	AAc	Propionato y Butirato	0.85	BAP	9.4 x 10 ³
				BAB	5.3 x 10 ³
Metanogénesis	AME(A)	Acetato	0.6	AMA	2.8 x 10 ⁴
	AME(H)	Formiato	0.68	AMH	2.3 x 10 ⁴

En la misma figura se observa la cinética para AME(H), a partir de formiato. No se observa fase de adaptación, sino un ascenso vertiginoso del volumen de metano, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos, ya que el tiempo de duplicación de este grupo es relativamente rápido, mínimo cada 6 horas (Mussati *et al.*, 1999). El volumen de CH₄ acumulado hasta el día 11 fue de 111 mL y alcanza la fase estacionaria. El 97% del metano producido a partir del H₂ y CO₂ del formiato, se generó durante los primeros 10 días, con una velocidad de 0.68 gDQO/gSSV.día. Debido a que éstos son los mismos sustratos para

bacterias homoacetógenas en su metabolismo, parte del metano podría estarse produciendo por arqueas metanogénicas por la vía acetoclástica.

El valor obtenido está dentro de los rangos reportados por Regueiro *et al.*, (2012), con 0.37-0.84 gDQO/gSSV.día, pero es más bajo que el obtenido por Sandoval *et al.*, (2009), de 0.94 gDQO/gSSV.día.

Es de resaltar que durante la prueba de AME(A) se empieza a producir metano antes que las otras actividades, pero su rendimiento es menor. La AAc no tiene un ascenso abrupto, pero tiene la más alta producción. La AME(H) está en un punto intermedio de rendimiento, pero la velocidad es semejante a las anteriores y la población de los grupos tróficos relacionados con ellas son similares.

Las actividades del inóculo, medidas por producción de metano reflejan la velocidad de biometanización de un sustrato dentro del digestor, como resultado de las interrelaciones establecidas entre las diferentes comunidades microbianas y la sinergia de los grupos tróficos presentes en el inóculo. Como el proceso de DA requiere un inóculo de alta calidad que provea un buen balance entre las diferentes poblaciones microbianas en términos de actividad hidrolítica, acidogénica, acetogénica y metanogénica, los resultados obtenidos muestran que el EB utilizado es apropiado para iniciar la digestión anaerobia.

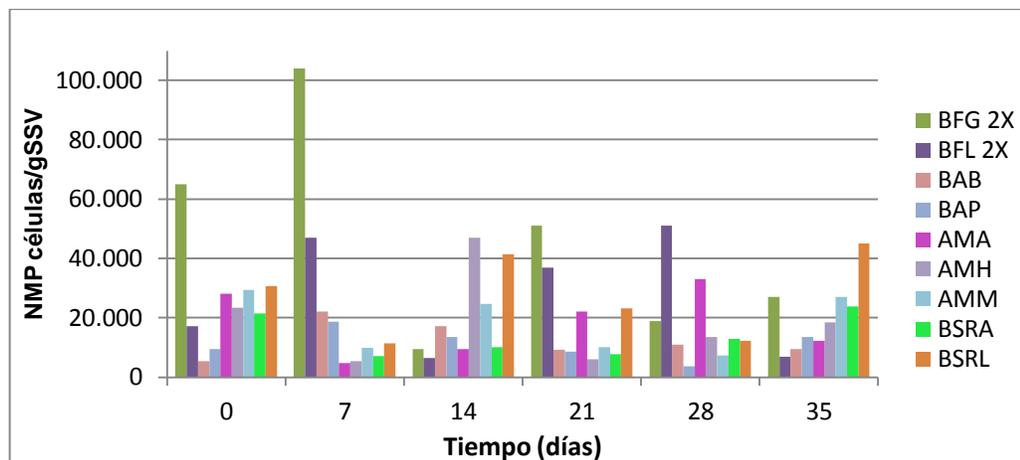
Por otro lado, el paralelismo entre el número de microorganismos de cada grupo trófico, con sus actividades, evidencia que el recuento de las poblaciones microbianas en un lodo, por medio del NMP es un método estadístico tan confiable como las modernas pruebas moleculares.

5.4. DINAMICA POBLACIONAL DURANTE LA DA DE SAR

Los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica de muestras analizadas cada siete días a los biorreactores del proceso de DA de los SAR con EB, se analizaron entre los diversos grupos tróficos y luego la predominancia entre los dominios Bacteria y Archaea.

5.4.1. Dinámica poblacional entre grupos tróficos. Los resultados que se obtuvieron durante los recuentos microbianos del proceso de DA por el método del NMP, se presentan en la Figura 8, permitiendo ver la variación poblacional de los grupos tróficos a lo largo del tiempo de operación del biorreactor.

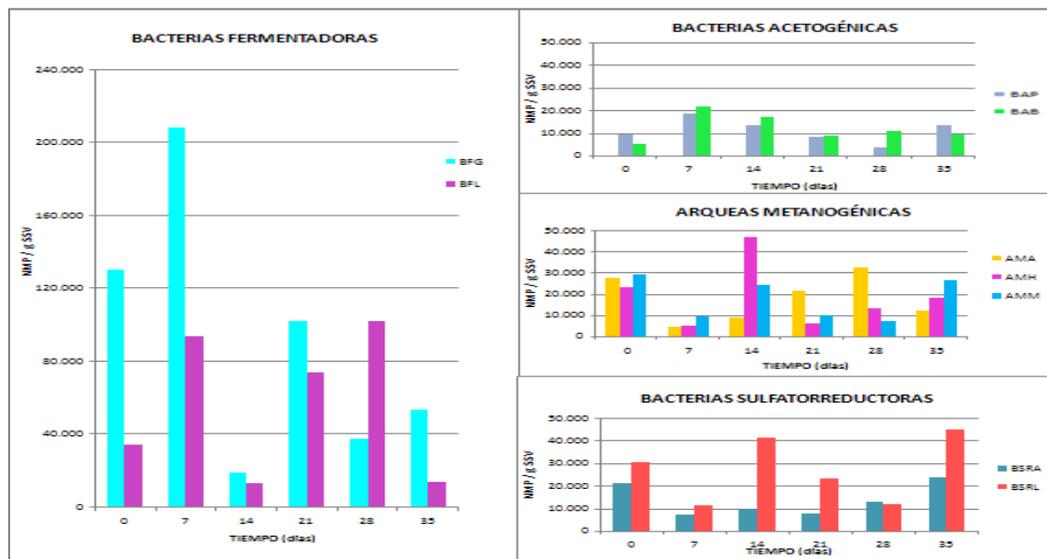
Figura 8. Evolución de grupos tróficos y de la población total durante la DA



Es de resaltar que los dos grupos tróficos más abundantes desde el inicio del proceso, BFG y BFL, una semana después aumentaron su población 1.6 y 2.8 veces respectivamente, presumiblemente debido a la disponibilidad de un sustrato fácilmente asimilable que permitió su rápida multiplicación. En el día 14 las dos

presentaron una caída drástica, quedando sólo el 10% de la primera y el 14% de la segunda, probablemente por consumo del sustrato que lleva a competencia de las poblaciones y muerte microbiana. En el día 21 se observa recuperación de ambas poblaciones, con otra leve caída para las BFG el día 28, pero no para BFL. Finalmente, el día 35 ambos grupos tróficos tienen una población ligeramente por debajo del 50% de la inicial. Con estos datos se puede inferir que los grupos BFG y BFL, pertenecientes a los fermentadores primarios y muy abundantes en el EB, inician eficientemente su trabajo hidrolítico y acidogénico, el cual se refleja en aumento de las poblaciones. Cuando se reduce la disponibilidad de sustrato por su consumo y empieza la competencia, se refleja en la caída drástica de las cifras, pero no lo suficiente como para que desaparezcan. Se inicia la recuperación y con ésta los altibajos cíclicos, como se puede ver en la Figura 9 para cada gran grupo metabólico.

Figura 9. Gráficas de la dinámica poblacional por grupos metabólicos



El grupo de fermentadores secundarios, las bacterias acetogénicas, aunque presentan una baja población al inicio del proceso, también se incrementan el día

7. El aumento para las BAP fue de 2.1 veces y para BAB 4.4. Al igual que ocurrió con los fermentadores primarios, en el día 14 se observa reducción de las poblaciones, quedando un 68% de las acetogénicas del propionato y 77% del butirato. El día 21 hay otra caída de los valores para ambas, pero el día 28 las BAB aumentan su población y las BAP sufren otra reducción.

Al finalizar el tiempo de la DA, ambos grupos tróficos presentaban un NMP de individuos mayor de la inicial, 40% más para BAP y 80% más para BAB. Al igual que con BFG y BFL, la disponibilidad de sustrato abundante favorece la multiplicación celular, pero un mayor número de microorganismos causa rápida reducción de nutrientes con la consiguiente muerte celular que reduce la población, pero logran estabilizarse, lo que permite finalizar el proceso con una población un poco mayor que la inicial para ambos grupos tróficos.

Al contrario de los grupos anteriores, las arqueas metanogénicas, presentaron reducción de su población a los 7 días, en 5.6 veces para AMA, 4.6 para AMH y 2.9 para AMM. También para el día 14 tienen comportamiento contrario, es por esto que los tres grupos presentaron incremento de la población, siendo significativamente alta para AMH, que aumentó 9.4 veces, AMM lo hizo 2.5 veces y AMA 0.8. En el día 21 el grupo trófico del acetato continúa creciendo, pero los otros dos sufren caídas drásticas en sus cifras. El día 28 la población de AMM continúa en descenso, pero las otras dos se incrementan. Finalmente, el día 35 las poblaciones continúan con cifras inferiores a las iniciales, pero no muy bajas para AMM con una reducción de sólo el 7% de sus células, AMH 28% menos y AMA presenta la cifra más baja, 57% menor.

Las arqueas metanogénicas son la población más sensible de las comunidades involucradas en la DA, de manera que los cambios ocurridos dentro de un digestor las afecta, lo que se evidencia en la producción de metano. En este caso, al estar monitoreando los cambios poblacionales mediante el recuento de los grupos

tróficos, la evidencia en primera instancia es la reducción de la población, pero esto se ha observado en todos los grupos metabólicos, con una recuperación posteriormente. Es de resaltar que aunque todos los grupos metanogénicos se vieron diezmos en la primera semana, se fueron recuperando y presentaron oscilación de las cifras, lo que evidencia un metabolismo activo y participativo dentro de las comunidades tróficas. Aunque al final del estudio presentaban pérdida de población, las cifras no fueron tan bajas como en semanas anteriores.

De forma similar ocurrió con el grupo de bacterias sulfatorreductoras, representadas por BSRA y BSRL, las cuales también presentaron reducción de su población en la primera semana, pero fue más drástica, quedando con sólo un tercio de la inicial. El día 14 presentaron recuperación, dado que las BSRL aumentaron 3.7 veces su población y las del acetato 0.43 veces. Para ambos grupos las cifras nuevamente bajaron el día 21 y continuaron bajando para las del lactato la siguiente semana, pero las del acetato incrementan su población y continuaron así el día 35. También las del lactato se recuperaron y finalizaron con una población 45% mayor que la inicial y las del acetato 14%.

Si se observa la sumatoria de los recuentos de todos los grupos tróficos caracterizados a lo largo del proceso de DA, se observa que no hubo mayores cambios en el recuento total, como se puede observar en la Tabla 8. Se resalta el hecho de que unos grupos metabólicos aumentaron su número, mientras otros se reducían, lo que le dio a la dinámica poblacional una funcionalidad de acuerdo a la disponibilidad de sustratos y la evolución del proceso, manteniéndose la población total dentro del mismo orden de magnitud a lo largo de todo el proceso, 10^5 .

Tabla 8. Evolución del recuento total de la población caracterizada durante la DA

RECuento TOTAL (NMP células/g SSV)	DIA 0	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28	DIA 35
	3.1×10^5	3.8×10^5	2.0×10^5	2.6×10^5	2.3×10^5	2.2×10^5

Todos estos datos demuestran que los grupos fermentadores primarios y los secundarios tienen un comportamiento similar en su evolución a lo largo del tiempo del proceso de DA. De la misma forma ocurre entre los grupos de arqueas metanogénicas con los de sulfatorreductoras, los cuales presentan oscilaciones semejantes entre sí, pero inversas a las de grupos fermentadores.

Este comportamiento se debe a la utilización de sustratos similares resultantes de los procesos metabólicos, pero no se evidencia inhibición total de algún grupo, que pueda atribuirse a competencia por sustrato. En lugar de esto, se observa una muy buena dinámica entre todas las comunidades, tal como se requiere para lograr el desempeño apropiado de un digestor anaerobio.

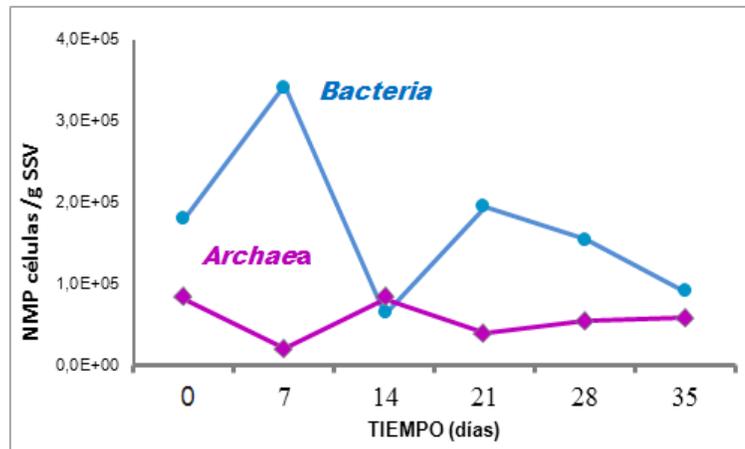
En este punto, se debe tener en cuenta la baja proporción de sulfatos en el sustrato (0.45%), de acuerdo a la caracterización fisicoquímica, como limitante para la vía de la sulfatorreducción por parte de este grupo, pero cambia temporalmente su trofismo y actúa en sinergia con el sistema, debido a que empieza a metabolizar ácidos orgánicos, especialmente propionato, para generar acetato, favoreciendo la metanogénesis, como se discutió anteriormente.

En la bibliografía consultada no se encontró un trabajo que hiciera el estudio de grupo tróficos a lo largo del proceso de DA similar. El más cercano es el estudio de un reactor en dos fases con FORSU, pero hicieron los recuentos cada 30 días (Sandoval *et al.*, 2009), lo cual no es comparable.

5.4.2. Dinámica poblacional entre dominios. La interacción de las poblaciones microbianas de acuerdo al dominio al que pertenecen, se muestran en la Figura 10. Se observa la abundancia del dominio *Bacteria*, al que pertenecen grupos de fermentadores primarios y secundarios (grupo hidrolítico-acidogénico y bacterias acetogénicas), en contraste con la población perteneciente al dominio *Archaea*

(metanogénicas), que se encuentra en menor proporción en casi todas las muestras analizadas, excepto el día 14, cuando se observó una caída drástica en las poblaciones fermentadoras, pero aumentó la de metanógenos.

Figura 10. Dinámica poblacional de grupos tróficos por dominios



Este mismo comportamiento fue evidenciado utilizando las técnicas MAR-FISH, en un estudio realizado con lodo proveniente de un digester anaerobio alimentado con glucosa para monitorear la degradación de diferentes subproductos a lo largo de 48 horas de digestión (Ito *et al.*, 2012). También fue observado en la investigación de Regueiro *et al.*, (2012) utilizando DGGE, secuenciación genética y FISH para detectar poblaciones metabólicamente activas en varios inóculos y en el estudio de Cardinali-Rezende *et al.*, (2012) con PCR cuantitativo para caracterizar la comunidad procariota de una laguna de lodo anaerobio porcino, en donde hallaron una diferencia poblacional con más de tres órdenes de magnitud.

5.5. DINÁMICA BIOQUÍMICA DURANTE LA DA DE SAR

El seguimiento a la dinámica bioquímica del proceso se hizo a través de la medición de las variables de respuesta ART, AGV, consumo de sólidos, cuantificación de metano y de estabilidad por pH y relación AGV/AT.

En la Figura 11 se observa la cinética de ART durante el proceso de DA. Se observa un descenso del 35% de su concentración durante las dos primeras semanas, con incremento nuevamente a partir del día 14 hasta el 21, para volver a caer el día 28; a partir de este punto se recuperan y presentan otra vez valores altos el día 35.

Dada la disponibilidad de sustrato fácilmente degradable y una alta población fermentadora presente en un inóculo con muy baja carga orgánica, ávido de alimento, inicia su metabolismo consumiendo rápidamente los azúcares como la glucosa, lo que explica el descenso inicial hasta el día 14.

Figura 11. Gráficas del seguimiento de las variables AGV y ART de la DA



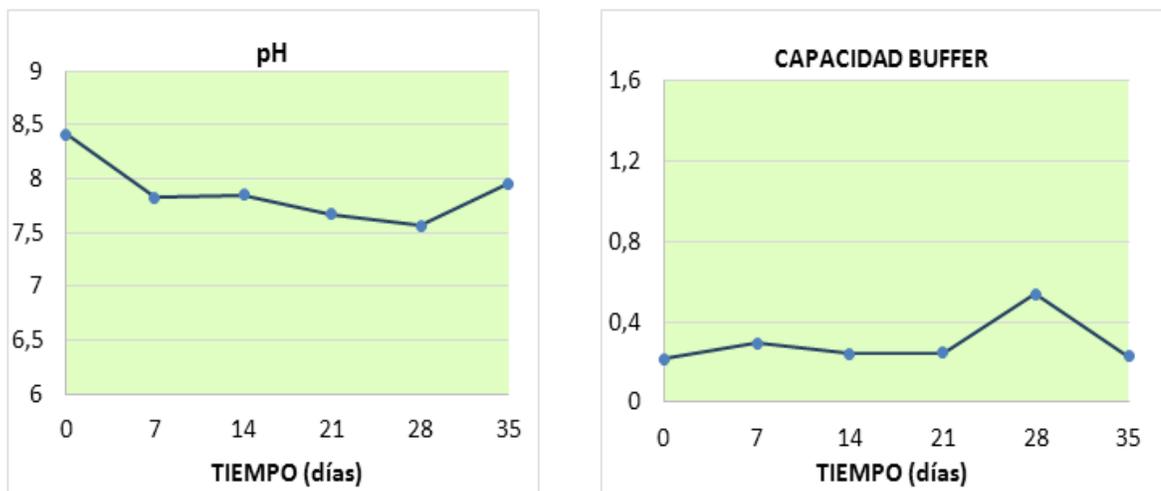
La asimilación de nutrientes por parte de los microorganismos, trae como consecuencia multiplicación celular, lo que se pudo observar en el recuento de grupos tróficos durante la DA, con un rápido aumento de las poblaciones fermentadoras durante la primera semana. Como la abundante biomasa necesita más sustrato, se limita el crecimiento celular y causa la muerte de la población para el día 14. La degradación de esta nueva biomasa aportada al sistema, aumenta los ART y se repite el ciclo, ya que los ART producidos son nuevamente consumidos por los microorganismos y observa la gráfica con altibajos.

Los resultados para AGV se muestran en la misma figura y se observa un ascenso de su concentración en la primera semana, con descenso las dos siguientes. El día 21 los valores vuelven a ascender, pero en el día 35 caen casi al mismo valor inicial. El comportamiento es muy coherente con lo que ocurre en el sistema como consecuencia del consumo de sustrato disponible, por parte de los consorcios microbianos, los cuales hidrolizan macromoléculas, fermentan los azúcares disponibles y abundantes en los SAR, formando AGV, que concuerda con el ascenso durante la primera semana. El descenso evidencia que fueron consumidos por los grupos de arqueas metanogénicas y su segundo ascenso muestra la dinámica bioquímica como respuesta a la dinámica poblacional entre los diferentes grupos tróficos, por más formación de ART del sustrato mientras está disponible o cuando el inicial escasea, por aporte de biomasa microbiana proveniente de la muerte celular ocurrida durante la segunda semana, como se observó en el recuento de grupos tróficos del día 14 del proceso de DA.

Como se observa en la Figura 12, el proceso inicia con un pH de 8.4, el cual se encuentra dentro de los valores reportados por Raposo *et al.*, (2006), como propicio para el arranque de la DA, porque ofrece a los microorganismos el ambiente ideal para su multiplicación, especialmente los grupos sensibles, como arqueas metanogénicas. Desciende inicialmente hasta 7.8 al día 7 y se estabiliza hasta el día 14. Continúa bajando hasta 7.6 el día 28 y vuelve a ascender a 8 el

día 35. El descenso inicial ocurre como consecuencia del consumo de la materia orgánica, lo que genera ácidos grasos que disminuyen el pH, aunque la carga orgánica no fue suficientemente alta, como para ocasionar acidificación del sistema, dado que se usó RIS 3, por lo tanto, el pH mínimo alcanzado fue 7.6 en el día 28. Los valores de pH evidencian muy buena estabilidad del sistema.

Figura 12. Gráficas del seguimiento a la estabilidad del sistema

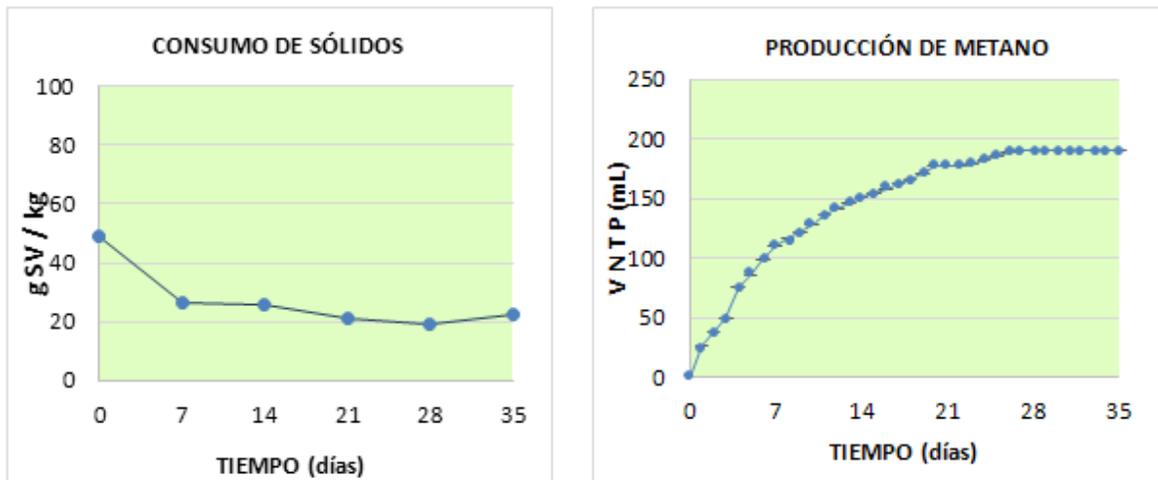


En la Figura 12 también se encuentra la gráfica de seguimiento a la capacidad buffer de los reactores, dada por la relación AGV/AT y se observa que el sistema mantiene su estabilidad a lo largo de las primeras semanas, entre 0.21 y 0.29, pero se sale del rango óptimo el día 28 y presentando un incremento debido a reducción de la AT. Ese mismo día se evidenció una ligera caída del pH debida a aumento en la concentración de AGV, lo cual, junto con un descenso de la AT en esa semana, causó el pico que evidencia la inestabilidad del proceso, pero se recuperó el día 35 volviendo al rango óptimo.

La estabilidad del proceso de DA se puede explicar por el origen del inóculo, ya que los estiércoles de animales tienen una capacidad buffer suficientemente alta como para balancear el sistema, neutralizando la acción de los AGV para no permitir el descenso del pH a rangos que puedan afectar poblaciones microbianas sensibles, como las metanogénicas. A pesar de lo ocurrido el día 28, en general se observa estabilidad del sistema, como lo reporta Raposo *et al.*, (2009) cuando se usa una RIS alta, como en este estudio, debido a que el sistema trabaja por debajo del rango de falla y no ocurre inhibición microbiana.

En la Figura 13 se observa la curva de consumo de sólidos, con una reducción del 47% en la primera semana, se estabiliza durante la siguiente, pero vuelve a presentar tendencia al descenso en las dos semanas posteriores, alcanzando un consumo del 61% para el día 28. La alta reducción inicial se puede atribuir a que se inicia la rápida degradación del sustrato disponible por parte de la población microbiana del inóculo, proveniente de un proceso de restricción de nutrientes, debido a que se permitió el consumo de la materia orgánica endógena.

Figura 13. Gráficas del consumo de sólidos y la producción de CH₄



Esto coincide con los datos obtenidos de los recuentos microbianos durante la DA de los SAR, en que los grupos tróficos más abundantes, como BFL casi triplica su número o BFG que se incrementó un 60% en la primera semana y todo ocurre a expensas del sustrato. Entre el día 28 y el 35 los sólidos presentan un ligero ascenso, tal vez debido a sólidos aportados por biomasa microbiana acumulada por muerte celular ocurrida cuando se consume el sustrato inicial y no es suficiente para la población que se ha multiplicado exponencialmente. El consumo de sólidos en los 35 días de digestión, fue sólo del 45%, debido tal vez a la baja proporción de SAR dentro del digestor y que el EB usado ya estaba estabilizado.

Como resultado de las actividades ocurridas durante todo el proceso de DA, el producto final es metano y el seguimiento a su producción se observa en la gráfica correspondiente en la Figura 13. Se evidencia una producción rápida durante la primera semana, con acumulación de 110 mL de metano, al que le sigue un aumento lento pero continuo durante las siguientes semanas y se estabiliza el día 27. Se infiere que a esta fecha la materia orgánica presente dentro del digestor ya fue reducida a metano y se produjo un volumen total de 191 mL. El rendimiento total de la DA de SAR utilizando EB como inóculo, fue de $0.41 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$.

El rendimiento obtenido en el presente estudio es acorde a los resultados obtenido por Raposo et al., (2009), en donde observaron que la constante de degradación de SV y de producción de metano, es más alta a menores proporciones de sustrato y disminuyeron en la medida en que redujeron la RIS de 3.0 a 0.5.

Un estudio con residuos de alimentos y EB llevado a cabo por De la Rubia *et al.*, (2010), obtuvo un rendimiento de $0.35 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$ en 30 días. De forma semejante sucedió con Zhang *et al.*, (2013), codigestando los mismo residuos, obtuvieron un rendimiento de $0.32 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$ con una RIS de 2. Kawai *et al.*, (2014), obtuvieron valores entre 0.116 y $0.437 \text{ m}^3/\text{kg SV}$ con varias RIS inferiores a la utilizada en este estudio. Alvarez y Lidén (2008) en su investigación utilizando

residuos de frutas y verduras con EB y residuos de matadero a partes iguales, obtuvieron un rendimiento de $0.3 \text{ m}^3/\text{kg SV}$

La dinámica bioquímica evidenció un buen desarrollo del proceso, debido a la sinergia presentada entre los grupos tróficos presentes en el inóculo, en donde hubo una adecuada hidrólisis del sustrato, reflejada en la producción de ART, la conversión de éstos en AGV y generación de metano. Se observa una secuencia lógica semana tras semana y correlación con la dinámica microbiana presentada en el recuento de grupos tróficos. El resultado final es un buen rendimiento a partir del sustrato adicionado para la RIS utilizada.

5.6. INFLUENCIA DEL SINERGISMO/ANTAGONISMO MICROBIANO EN EL RENDIMIENTO DE LA DA

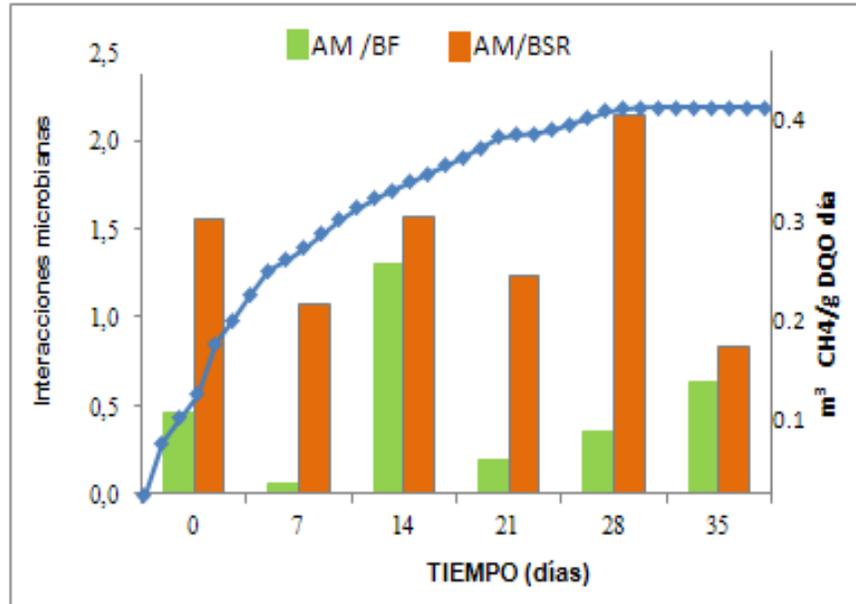
La interacción de la dinámica microbiana con la dinámica bioquímica se analizó por la estabilidad del proceso de DA y se evidencia en la relación establecida entre arqueas metanogénicas/bacterias fermentativas (AM/BF) y arqueas metanogénicas/ bacterias sulfatorreductoras (AM/BSR) como se puede observar en la Figura 14.

En el monitoreo semanal realizado a las poblaciones microbianas, se observó que la alta proporción de BF con respecto a la AM hace que la relación AM/BF se mantenga por debajo de 0.6, excepto en el día 14 cuando es de 1.3, debido a la abrupta caída ocurrida en el recuento de fermentadores primarios BFG y BFL.

En la relación AM/BSR se observó que su valor es cercano a 1 a lo largo del tiempo de digestión, excepto el día 28, cuando el número de AM es 2.15 veces

mayor que la BSR. Esto es debido a que hay muy poca diferencia en el número total de bacterias sulfatorreductoras y de arqueas metanogénicas.

Figura 14. Relación cuantitativa de arqueas metanogénicas con grupos fermentadores y sulfatorreductores e incidencia en la producción de CH₄



La proporción semejante entre ambos grupos se puede atribuir al bajo contenido de sulfuros en los SAR, que no permite la proliferación excesiva de BSR, sino que se mantienen en número semejante a las metanógenas y el resultado obtenido en el rendimiento a partir de los SAR, demuestra que no se desvía la ruta metanogénica hacia la sulfatorreductora. Elferink *et al.*, (1998), evidenció que la limitación de sulfatos favorece la producción de metano, debido a que obliga a las bacterias sulfatorreductoras a comportarse como acetogénicas, utilizando para su metabolismo ácidos orgánicos, principalmente propionato. Adicionalmente, se comportan como sintróficas porque establecen una relación con arqueas

metanogénicas para el consumo del H₂ generado, lo que reduce la presión parcial del sistema y favorece la metanogénesis (Díaz-Báez, *et al.*, 2002).

Si un mayor número de grupos tróficos está trabajando para producir acetato, el resultado final es mayor rendimiento de la DA, debido a que la vía de la metanogénesis acetoclástica es la que produce la más alta proporción de metano del sistema, correspondiente a casi el 70% (Gerardi, 2003; Angelidaki *et al.*, 2011).

Por los resultados al final del proceso, se infiere que dentro de los reactores se conservó una adecuada proporción entre sustratos generados y grupos tróficos que los utilizaban. Por lo tanto, el EB estabilizado es un buen inóculo para llevar a cabo la DA debido a su dinámica microbiana, ya que presenta un buen balance de comunidades metabólicas y afinidad con el sustrato, lo que se evidencia con el rendimiento obtenido.

6. CONCLUSIONES

Con la caracterización fisicoquímica del EB y los SAR se pudo prever su potencial para valorización energética por su composición, la cual finalmente tuvo un rendimiento de $0.41 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$. Por la ausencia de microorganismos patógenos en el EB, el biosólido generado puede ser usado como mejorador de suelos.

El inóculo tiene un alto potencial para llevar a cabo las diferentes etapas de la DA, principalmente la hidrolítica y acidogénica, con velocidades de 1.98 y 1.95 gDQO/gSSVdía respectivamente. Les siguen la AAC, AME(H) y AME(A), con valores de 0.85, 0.68 y 0.6 gDQO/gSSVdía respectivamente. Se evidenció que hay una relación directa entre la actividad de la biomasa y los grupos tróficos, por lo tanto, las actividades con el valor más alto son las que presentan poblaciones más abundantes para sus respectivas etapas, la AH y AA.

Los grupos tróficos identificados en el EB usado como inóculo para la DA de SAR son: BAE, BFG, BFL, BAP, BAP, BSRA, BSRL, AMA, AMH y AMM. Las poblaciones de fermentadores primarios BFG y BFL fueron las más abundantes en el EB y las de fermentadores secundarios BAB y BAP las más escasas. Arqueas metanogénicas y sulfatorreductoras se encontraron en proporciones similares.

La cuantificación de grupos tróficos durante la DA muestra variaciones que permiten concluir que se mantiene una dinámica contraria entre algunos grupos. Al aumentar la población de bacterias hidrolíticas-acidogénicas y acetogénicas, disminuyen las arqueas metanogénicas y sulfatorreductoras y viceversa, manteniendo la población total dentro del mismo orden de magnitud, 10^5 .

7. RECOMENDACIONES

Caracterizar los grupos tróficos de la DA de SAR utilizando una RIS más baja puede permitir que se observe una dinámica microbiana diferente a la observada en el presente trabajo.

Hacer la experimentación a temperatura ambiente con el fin de observar variaciones de las poblaciones sin adicionar consumo energético.

Caracterizar los grupos tróficos de la DA de SAR con EB en continuo ofrecería la oportunidad de comparar datos con los obtenidos en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Abbassi-Guendouz, A., Trably, E., Hamelin, J., Dumas, C., Steyer, J., Delgenès, J., Escudié, R. (2013). Microbial community signature of high-solid content methanogenic ecosystems. *Bioresource Technology*, 133, 256–262.

Álvarez, E. y Calderón, D. Modelamiento del rendimiento de metano de los residuos sobrantes de restaurante UIS. Tesis de pregrado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. 2012.

Álvarez, J., Otero, L., Lema, J. (2010). A methodology for optimizing feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. *Bioresource Technology*, 101, 1153–1158.

Alvarez, R., Lidén, G. (2008). Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. *Renewable Energy*, 33, 726–734.

Alves, J., Silva, V., Lopes, T., de Oliveira, S., da Costa J., Otenio, M., Galuppo, C. (2014) Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology*. 153 284–291

Amani, T., Nosrati, M., Sreerishnan, T. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - a review. *Environmental Rev.* 18, 255–278.

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Bodiroza, V., Postsch, E., Sollitsch, W. (2006). Optimizing methane yield from anaerobic digestion of manure: effects of dairy systems and of glycerine . *International Comgress series 1293* , 217-220.

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., Mayer, K., Gruber, L. (2007). Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118, 173–182.

Anderson, G.K. and Yang, G., 1992. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research* 64, 53–59.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology—WST*, 59, 5. 927-934.

Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D., Plugge, C., Stams, A. J. (2011). Biomethation and its potential. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 494. Editor: Rosenzweig y Ragsdale. Elsevier Academic Press Inc. 327-351.

APHA-AWWA-WPCF 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Ed. Washington D.C., U.S.A.

Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J., Dewil, R. (2008). Principles and potencial of anaerobic digestion waste actived sludge. *Process in energy and combustion science*, 34, 755-781.

Arenas Beltrán, Ligia. Sistema en continuo de dos fases -hidrólisis acidogénesis y acetogénesis metanogénesis de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Tesis de Maestría. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. 2012. 80 p.

Astals, S., Nolla-Ardèvol, V., Mata-Alvarez, J. (2012). Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: Biogas and digestate. *Bioresource Technology*, 110, 63–70.

Bhattacharya, S., Salam, P., Runqing, H., Somashekar, H., Racelis, D., Rathnasiri, P., Yingyuad, R. (2005). An assessment of the potential for non-plantation biomass resources in selected Asian countries for 2010. *Biomass and Bioenergy*, 29, 153–166.

Callaghan, F., Wasea, D., Thayanithya, K., Foster, C. (2002). Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy*, 22 , 71–77.

Cardinali-Rezende, J., Pereira, Z., Sanz, J., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. (2012) Bacterial and archaeal phylogenetic diversity associated with swine sludge from an anaerobic treatment lagoon. *World J Microbiology Biotechnology*.28:3187–3195. DOI 10.1007/s11274-012-1129-8

Carrère, H., Sialve, B., Bernet, N. (2009). Improving pig manure conversion into biogas by thermal and thermo-chemical pretreatment. *Bioresource Technology*, 100, 3690–3694.

Castro, L., Guzmán, C. Escalante, H. (2012). Influence of Particle Size and Temperature on Methane Production from Fique's Bagasse. *Revista Iteckne*,10,1-6.

Castro Molano, Liliana. Proceso integral para la digestión anaerobia de bagazo de fique. Tesis de Doctorado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. 2012. 188 p.

Cepero, L., Savran, V., Blanco, D., Díaz M., Suárez, J., Palacios, A. (2012). Producción de biogás y bioabonos a partir de efluentes de biodigestores. *Pastos y Forrajes*, 35, No. 2, 219-226.

De la Rubia, M., Fernández-Cegrí, V., Raposo, F., Borja, R.(2011). Influence of particle size and chemical composition on the performance and kinetics of anaerobic digestion process of sunflower oil cake in batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 58– 59, 162–167.

Demirer, G., Chen, S. (2005). Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. *Process Biochemistry*, 40, 3542–3549.

Demirer, G., Chen, S. (2008). Anaerobic biogasification of undiluted dairy manure in leaching bed reactors. *Waste Management* 28 (2008) 112–119.

Díaz-Báez, M., Espitia, S., Molina, F. Digestión Anaerobia: Una aproximación a la tecnología. Bogotá, Colombia: Editorial Universidad Nacional de Colombia, 2002. P. 41 – 71, 82-97, 108-112, 151-167.

Elferink S., Vorstman W., Sopjes A., Stams A.(1998) Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating paper mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 27.185-194.

El-Mashad, H., Zhang, R. (2010). Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresource Technology*, 101, 4021–4028.

Fantozzi, F., Buratti, C. (2011). Anaerobic digestion of mechanically treated OFMSW: Experimental data on biogas/methane production and residues characterization. *Bioresource Technology*, 102, 8885–8892.

Fernández, A., Sánchez, A., Font, X. (2005). Anaerobic co-digestion of a simulated organic fraction of municipal solid wastes and fats of animal and vegetable origin. *Biochemical Engineering Journal*, 26, 22–28.

Fernández, J., Pérez, M., Romero, L. (2012). Mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Optimization of the semicontinuous process. *Chemical Engineering Journal*, 193–194, 10–15.

Fotidis, I., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2013). Bioaugmentation with an acetate-oxidising consortium as a tool to tackle ammonia inhibition of anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 146, 57–62.

Gerardi, M. (2003). The Microbiology of Anaerobic Digesters. *Editorial Wiley Interscience*, U.S.A., 81-117.

Hedderich, R., Whitman, W. (2006). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. En: *Prokaryotes*, 2, 1050–1079.

Hernández-Medina M., Torruco-Uco J.G, Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona D. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. [En línea] *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol.28 No.3, 2008. *On-line versión* ISSN 1678-457X. [Consultado en: 08/06/14]. Disponible en internet en:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000300_031

Hu, Z., Wang, G., Yu, H. (2004). Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*, 21, 59–62.

Hu, Z., Yu, H., Zhu, R. (2005). Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55, 233–238.

Huong L., Forslund A., Madsen H., Dalsgaard A. (2014) Survival of *Salmonella* spp. and fecal indicator bacteria in Vietnamese biogas digesters receiving pig slurry. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217 785–795

Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H.D., Okabe, S. (2012). Identification and quantification of key microbial trophic groups of methanogenic glucose degradation in an anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology* 123. 599–607.

Jiménez-Hernández, J, Guerra-Rivera, G., Morgan-Sagastume, J., Noyola-Robles, A., Theuerl, S., Klocke, M. (2014). Caracterización microbiológica y molecular de la comunidad anaerobia durante la co-fermentación de residuos agropecuarios con adición de arcillas para la obtención de metano. *CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 45, No. 1, 10-17.

Khanal, S., 2008. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications. 1st Ed. Blackwell Publishing, Hawaii, USA. 29–63.

Kaparaju, P., Rintala, J. (2005). Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resources, Conservation and Recycling*, 43, 175–188.

Kawai, M., Nagao, N., Tajima N., Niwa C., Matsuyama T., Toda T. (2014) The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio

on anaerobic digestion for a reliable methane yield. *Bioresource Technology*, 157, 174–180.

Labatut, R. (2013). The influence of biodegradability on the anaerobic conversion of biomass into bioenergy. En: *Technologies for Converting Biomass to Useful Energy: Combustion, Gasification, Pyrolysis, Torrefaction and Fermentation*. Edited by Erik Dahlquist CRC Press. 325–343.

LeHyaric, R., Chardin, C., Benbelkacem, H., Bollon, J., Bayard, R., Escudié, R., Buffière, P. (2011). Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. *Bioresource Technology*, 102, 822–827

Liu, G., Zhang, R., El-mashad, M., Dong, R. (2009). Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. *Bioresource Technology*, 100, 5103–5108.

Long, J., Aziz, T., De los Reyes, F., Ducoste, J. (2012). Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. *Process Safety and Environmental Protection*, 90, 231–245.

Lu, X., Rao, S., Shen, Z., Lee, P. (2013). Substrate induced emergence of different active bacterial and archaeal. *Bioresource Technology*, 148, 517–524.

Luo, G., Angelidaki, I. (2013). Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H₂: process performance and microbial insights. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1373–1381.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*, 10ª edición. Prentice-Hall, Madrid. 152, 448-451, 645-648, 930-931.

Mantilla, F., Castro, L., Guzmán, C., Esclante, H. (2012). Estudio microbiológico de la estabilidad de un biorreactor operado en continuo para la producción de biogás a partir del bagazo de fique. *Ingeniator*. Vol.3, N°4,55-62.

Marañón, E., Castrillón, L., Quiroga, G., Fernández-Nava, Y., Gómez, L., García, M.(2012). Co-digestion of cattle manure with food waste and sludge to increase biogas production. *Waste Management*, 32, 1821–1825.

Martensa, W., Böhm, R., (2009). Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresource Technology*. 100, 5374–5378.

Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74, 3-16.

Mata-Alvarez, J. Some fundamentals of the anaerobic digestion process. En: *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*. Ed. IWA, Madrid, 2003, 5-20.

McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83, 37–46.

Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426–428.

MMLBA- Manual de Métodos Laboratorio de Biotecnología Ambiental. (2009). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de Ingeniería Bioquímica. p. 53-60.

Mousdale, D. (2008). Chemistry, biochemistry and microbiology of lignocellulosic biomass .En: *Biofuels; Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development*. Taylor & Francis Group.CRC Press, 49–93.

Murto, M., Björnsson, L., Mattiasson, B.(2004). Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management*, 70, 101–107.

Mussati, M., Aguirre, P., Scenna, N. (1999). Modelado del proceso de digestión anaeróbica en reactores simples. En: *Modelado, Simulación y Optimización de Procesos Químicos*.697-739.

Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*. 96, 135–143.

ONU. UN-HABITAT. Global atlas of excreta, waste water sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource. 2008. Nairobi. 632 p.

Palmowski, L. M., Muller, J. A. (2000) Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technol.* 47(12), 231–238.

Quintero, M., Castro, L., Ortiz, C., Guzmán, C., Escalante, H. (2012). Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. *Bioresource Technology*, 108, 8-13.

Quintero Silva, Mabel. Estudio de consorcios microbianos para la producción de biogas a partir de residuos del fique. Tesis de Maestría. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Salud. Departamento de Ciencias Básicas. 2012.106 p.

Raposo, F., Banks, C.J., Siegert, I., Heaven, S., Borja, R. (2006). Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry*, 41, 1444–1450.

Raposo, F., Borja, F., Martín, M., Martín, A., Rincón, B. (2009) Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation. *Chemical Engineering Journal*, 149, 70–77

Raposo, F., De la Rubia, M.A., Fernández-Cegrí, V., Borja, R. (2011) “Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures” in: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, pp. 861–877.

Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-Gutierrez, J., Stams, A., Lema, J.M., Carballa, M. (2012). Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiological Research*. 167. 581– 589.

Rodríguez Miranda, Nelson. Estudio de factibilidad técnica y financiera de utilizar biomasa para suplir las necesidades energéticas en el edificio de Bienestar Universitario. Tesis de pregrado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y de Telecomunicaciones. 2010. 68 p.

Rozzi, A. and Remigi, E. (2004) Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3: 93–115.

Sakai, S., Conrad, R., Liesack, W., Imachi, H. (2010). *Methanocella arvoryzae* sp. nov. a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2918–2923.

Salminen, E., Rintala, J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. *Bioresource Technology*, 83, 13–26.

Sandoval, C., Vergara, M., Carreño, M., Castillo, E. (2009). Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. *Waste Management*. 29. 704–711.

Sanz, J., Köchling, T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42 (2007) 119–133.

Satin, M. Functional properties of starches. [En línea]. FAO Agricultural and Food Engineering Technologies Service. 1998. [Consultado en: 08/06/14]. Disponible en internet en: <http://www.fao.org/ag/magazine/pdf/starches.pdf>

Terry, A., Bermúdez, R., Rodríguez, S., Fernández, M. (2004). Selección de un inóculo para la biodegradación anaerobia de la pulpa de café. *Tecnología Química*, 24, No. 2, 64-71.

Torres, P., Pérez, A. (2014). Actividad metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de agua residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 9, 5-14.

Visser, A., Beeksmā, I., Van der Zee, F., Stams, A.J.M., Lettinga, G. (1993) Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied Microbiology Biotechnology*. 40, 549-556.

Wang, L. (2008). Anaerobic Digestion of Food Processing Wastes. En: *Energy Efficiency and Management in Food Processing Facilities*. Taylor & Francis Group. CRC Press.

Wang W., Xie L., Luo G., Zhou Q., Angelidaki. I. (2013). Performance and microbial community analysis of the anaerobic reactor with coke oven gas biomethanation and in situ biogas upgrading. *Bioresource Technology*, 146, 234–239.

Whitman, W., Bowen, T., Boone, D. (2006). The Methanogenic Bacteria. En: *Prokaryotes*, 3, 165–207.

Wilson, L., Loetscher, L., Sharvelle, S., De Long, S. (2013). Microbial community acclimation enhances waste hydrolysis rates under elevated ammonia and salinity conditions. *Bioresource Technology*, 146, 15–22.

Zhang C., Xiao G., Peng L., Su H., Tan T. (2013). The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. *Bioresource Technology* 129 170–176.

ANEXO A

MEDIOS DE CULTIVO PARA EVALUAR LAS ACTIVIDADES DEL INÓCULO

1. Actividad Hidrolítica

Para preparar el medio básico anaerobio -MCAB- , medir lo siguiente:

REACTIVO/SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL
	1000 mL
Solución mineral de Balch sin sulfatos	50 mL
Solución oligoelementos sin sulfatos	10 mL
Solución de resazurina al 0.1%	1.0 mL
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Extracto de levadura	0.1 g
Peptona tripticasa	0.1 g

Completar el volumen a preparar con agua destilada. Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N. Marcar el nivel en el recipiente y agregar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Enfriar bajo atmósfera de N₂ y verificar que el volumen se mantenga. Cuando esté a temperatura ambiente, agregar:

Bicarbonato de sodio NaHCO ₃	2.0 g
Cisteína	0.5 g

Dosificar volúmenes de 300 mL en botellas de 500 mL. Gasear cada frasco con N₂ antes de cerrarlo con tapón de caucho y poner sello de aluminio. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Dejar enfriar y guardar en refrigeración. Antes de utilizar los medios, agregar con jeringa a cada frasco:

Solución de Na ₂ S al 2.0%	4.6 mL
Solución diluida de vitaminas de Balch	4.6 mL
Sustrato (almidón o celulosa)*	3.0 g

* La concentración del sustrato es 1%. No adicionar sustrato a los blancos.

Cuando el sistema es sin agitación, se adiciona a cada reactor 1.0 - 1.5 g SSV/L del inóculo antes de incubar a 39°C ±2. Si es con agitación, adicionar 2.0 – 2.5 g SSV/L. El volumen se determina con la siguiente ecuación:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

En donde:

V₁ = Volumen del inóculo a adicionar (mL)

C₁ = Sólidos Suspendidos Volátiles en el inóculo (g/L)

V₂ = Volumen del medio de cultivo usado para la AA (mL)

C₂ = Sólidos Suspendidos Volátiles que se van a adicionar al medio (g/L)

Para hacer seguimiento a la AH, se toman muestras de cada biorreactor en el intervalo de tiempo establecido, para determinación del producto de la etapa, ART.

2. Actividad Acidogénica

Preparar del MCAB igual al anterior y antes de utilizarlo, adicionar como sustrato 3.0 g de glucosa a cada frasco de 300 mL (10 g/L). Los blancos no tienen sustrato. A continuación, adicionar el inóculo, que se calcula como en la actividad anterior. Para hacer seguimiento a la AA, se toman muestras de cada biorreactor en el intervalo de tiempo establecido, por análisis del producto de la etapa, AGV.

3. Actividad Acetogénica

La preparación del medio es igual a los anteriores y se envasan 30 mL en frascos de 50 mL. Antes de utilizarlos medios, adicionar a cada frasco lo mismo que los anteriores, pero el sustrato es una mezcla de ácido butírico neutralizado o butirato de sodio y ácido propiónico neutralizado o propionato de sodio, 0.15 g de cada uno para una proporción 50/50 en cada frasco (10 g/L). Los blancos no tienen sustrato. Se calcula el volumen de inóculo a adicionar de la forma en que se hizo

en las otras actividades. Para el seguimiento de la AAc, se hace cuantificación diaria de metano.

4. Actividad Metanogénica Específica (Acetoclástica)

La preparación del medio es igual a los anteriores y se envasan igual. El sustrato es ácido acético neutralizado o acetato de sodio a razón de 0.3 g en cada frasco (10 g/L). Calcular el volumen de inóculo a adicionar igual que para las otras actividades. Para el seguimiento de la AME, se hace cuantificación diaria de metano.

5. Actividad Metanogénica Específica (Hidrogenotrófica)

La preparación del medio es igual a los anteriores y se envasan igual. El sustrato es ácido fórmico neutralizado o formiato de sodio a razón de 0.3 g en cada frasco (10 g/L). Se calcula el volumen de inóculo a adicionar de la forma en que se hizo en las otras actividades. Para el seguimiento de la AME, se hace cuantificación diaria de metano.

REFERENCIA:

Díaz-Báez *et al.*, 2002; MMLBA, 2009; Angelidaki *et al.*, 2009; Sandoval *et al.*, 2009.

ANEXO B

MEDIOS DE CULTIVO PARA CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Bacterias Anaerobias Estrictas

En un balón aforado de 1000 mL adicionar:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50 mL
Solución oligoelementos sin sulfatos	10 mL
Azul de bromotimol al 1.0%	1.0 mL
Solución de NiCl ₂ · 6 H ₂ O al 0.05%	0.5 mL
Solución de Fe (SO ₄) · 7H ₂ O al 0.2%	1.0 mL
Extracto de levadura	2.0 g
Peptona tripticasa	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Glucosa	10.0 g

Completar el volumen a preparar con agua destilada. Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N. Marcar el nivel en el recipiente, adicionar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Enfriar bajo atmósfera de N₂ y verificar que el volumen se mantenga. Cuando esté a temperatura ambiente, agregar:

NaHCO ₃	5.0 g
Cisteína - HCl	0.5 g

Disolver completamente y dosificar volúmenes de 5.0 mL en frascos apropiados usando jeringa, cerrarlos con tapón de caucho y sellar con agrafes de aluminio. Introducir en cada frasco una aguja sola y con otra conectada al sistema de gases, inyectar N₂ para desplazar el oxígeno que pueda quedar dentro de los frascos, para asegurar un ambiente anaerobio. Retirar primero la aguja del gas y después la de desalojo para no sobresaturar el frasco. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15

psi durante 15 minutos. Dejar enfriar y guardar en refrigeración. Antes de utilizarlos medios, agregar con jeringa a cada frasco:

Solución de Na ₂ S. 9 H ₂ O al 2.0%	0.05 mL
Solución diluida de vitaminas de Balch	0.05 mL

2. Bacterias Fermentadoras de Glucosa y Lactosa

Para el medio básico de bacterias fermentadoras, disponer de un balón aforado apropiado para el volumen a preparar y adicionar los mismos reactivos/ soluciones del medio anterior, excepto la glucosa. Para 1 L agregar también:

Solución de selenito de sodio al 0.18%	1.0 mL
----------------------------------------	--------

Completar el volumen a preparar con agua destilada.

Adición del sustrato específico para cada grupo trófico

- **Bacterias Fermentadoras de Glucosa -BFG-**. Adicionar 5.0 g de glucosa a 500 mL de medio básico adoras, medir pH y ajustar a 7.1 con NaOH 1N.
- **Bacterias Fermentadoras de Lactosa -BFL-**. Se adicionan 5.0 g de lactosa a 500 mL del medio básico, medir pH y ajustar a 7.25 con NaOH 1N.

Continuar con el procedimiento como para el grupo anterior.

3. Bacterias Acetogénicas del Propionato y Butirato

Para la preparación del medio básico de bacterias acetogénicas, disponer de un balón aforado apropiado para el volumen y medir los mismos reactivos/soluciones del grupo anterior, excepto el azul del Bromotimol que será remplazado por resarzurina al 0.1% 1.0 mL/L. Disolver y completar el volumen con agua destilada.

Adición del sustrato específico para cada grupo trófico

- **Bacterias Acetogénicas del Propionato -BAP-**. Adicionar 0.5 g de propionato de sodio a 500 mL del medio básico para bacterias acetogénicas.

- **Bacterias Acetogénicas del Butirato -BAB-**. Se adicionan 0.5 g de butirato de sodio a 500 mL de medio básico para bacterias acetogénicas.

Medir pH de cada medio y ajustar a 7.1. Marcar el nivel en el recipiente, adicionar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Continuar con el procedimiento igual como se hizo para el primer grupo.

4. Arqueas Metanogénicas Acetoclásticas y del Metanol

Este medio básico sirve tanto para arqueas metanogénicas acetoclásticas, como para las del metanol. Adicionar en balón aforado de 1000 mL:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50 mL
Solución oligoelementos sin sulfatos	10 mL
Solución de resazurina al 0.1%	1.0 mL
Solución de Fe (SO ₄). 7H ₂ O al 0.2%	1.0 mL
Solución de selenito de sodio al 0.18%	1.0 mL
Extracto de levadura	0.1 g
Peptona tripticasa	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g

Completar el volumen a preparar con agua destilada.

Adición del sustrato específico para cada grupo trófico

- **Arqueas Metanogénicas Acetoclásticas -AMA-**. Adicionar 4.0 g de acetato de sodio a 500 mL del medio básico para arqueas metanogénicas.
- **Arqueas Metanogénicas del Metanol -AMM-**. Se adicionan 0.32 mL de metanol a 500 mL de medio básico para arqueas metanogénicas.

Medir pH de cada medio y ajustar entre 7.1 y 7.2. Marcar el nivel en el recipiente, adicionar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Continuar como se hizo para el primer grupo.

5. Arqueas Metanogénicas Hidrogenotróficas

En un balón aforado de 1000 mL adicionar:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	50 mL
Solución oligoelementos sin sulfatos	10 mL
Solución de resazurina al 0.1%	1.0 mL
Solución de $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ al 0.2%	1.0 mL
Solución de selenito de sodio al 0.18%	1.0 mL
Solución de $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 0.05%	0.5 mL
Extracto de levadura	0.5 g
Peptona tripticasa	0.1 g
K_2HPO_4	0.3 g
Formiato de sodio o ácido fórmico	8.0 g

Completar el volumen a preparar con agua destilada. Medir pH y ajustar entre 7.1 y 7.4 con NaOH 1N. Marcar el nivel en el recipiente, adicionar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Continuar con el procedimiento como los medios anteriores.

6. Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato y Acetato

Disponer de un balón aforado de 1000 mL adicionar:

Solución oligoelementos sin sulfatos	1.0 mL
Solución de resazurina al 0.1%	1.0 mL
Extracto de levadura	1.0 g
K_2HPO_4	0.2 g
$\text{NH}_4 \text{Cl}$	0.5 g
NaCl	1.2 g
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.36 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15 g

Completar el volumen a preparar con agua destilada.

Adición del sustrato específico para cada grupo trófico

- **Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato -BSRL-**. Adicionar 4.25 mL de lactato de sodio al 60% o 2.5 mL de ácido láctico para 500 mL del medio y ajustar pH a 6.8.
- **Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato -BSRA-**. Se adicionan 1.5 g de acetato de sodio a 500 mL de medio básico y ajustar pH a 6.7.

Marcar el nivel en el recipiente, adicionar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Enfriar bajo atmósfera de N₂ y verificar que el volumen se mantenga. Cuando esté a temperatura ambiente, por cada 500 mL de medio, agregar 2.5 g de NaHCO₃. Continuar como en los medios anteriores.

Antes de utilizar los medios, adicionar con jeringa a cada frasco:

Solución de Cisteína – HCl al 2.5%	0.1 mL
Solución diluida de vitaminas de Balch	0.05 mL

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Solución de oligoelementos

Se prepara sin sulfatos para evitar inhibición por bacterias sulfatorreductoras.

Utilizar balón aforado de 1000 mL y adicionar:

Acido Nitrilotriacético *	1.5 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	2.5 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.6 g
NaCl	1.0 g
FeCl ₂ . 4H ₂ O	0.1 g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1 g
ZnCl ₂	0.1 g
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0.01 g
AlCl ₃	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0.01 g

*Se disuelve con KOH 10N o 1N hasta pH 6.5 antes de adicionarlo

Completar el volumen con agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con KOH 1N.

Envasar en volúmenes de 40 mL, cerrar los frascos con tapones de caucho y sellar con agrafes de aluminio. No es necesario desplazar el oxígeno ni esterilizar. Guardar en refrigeración.

2. Solución diluida de vitaminas de Balch

Utilizar balón aforado de 1000 mL y adicionar:

Biotina (vit H)	2.0 mg
Acido p – aminobenzóico (PABA)	5.0 mg
Cianocobalamina	0.1 mg
Tiamina HCl (vit B ₁)	5.0 mg
D. L. Pantotenato de Ca	5.0 mg
Acido nicotínico	5.0 mg
Piridoxina – HCl (vit B ₆)	10.0 mg
Acido fólico	2.0 mg
Riboflavina (vit B ₂)	5.0 mg
Acidolipóico (thioico)	5.0 mg

Completar el volumen con agua destilada y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 mm en anaerobiosis, no usar autoclave por la labilidad de las vitaminas con la temperatura. Envasar en frascos de 50 mL, cerrarlos usando tapón de caucho y sellar con agrafes de aluminio. Almacenar a 4° C.

3. Solución mineral de Balch

Esta solución se prepara sin sulfatos para evitar la inhibición por presencia de bacterias sulfato-reductoras. En balón aforado adicionar:

KH ₂ PO ₄	6.0 g	12.0 g
NH ₄ Cl	5.0 g	10.0 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	2.1 g	4.2 g
CaCl. 2 H ₂ O	0.16 g	0.32 g
NaCl	12.0 g	24.0 g

Completar el volumen con agua destilada y disolver completamente. Envasar y cerrar los frascos usando tapones de caucho sellados con agrafes de aluminio. No es necesario mantener un ambiente anaerobio. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Dejar enfriar y guardar en refrigeración.

4. Agua anóxica

Medir agua destilada de acuerdo al volumen a preparar, más un 10% adicional y llevar a ebullición fuerte por dos minutos. Bajar del fuego y dejar evaporar el volumen adicional. Inyectar nitrógeno cuando esté terminando de enfriarse y proceder a la preparación de la solución que se necesite

5. Agua reducida para diluciones

Utilizar balón aforado de 1000 mL y adicionar:

$K_2 HPO_4$	0.3 g
Solución mineral de Balch sin sulfuros	50 mL
Solución de resarzurina al 0.1	1.0 mL

Se completa el volumen con agua destilada, Marcar el nivel en el recipiente, adicionar 10% de agua destilada adicional y llevar a ebullición por dos minutos. Enfriar bajo atmósfera de N_2 y verificar que el volumen se mantenga. Cuando esté a temperatura ambiente, agregar:

$NaHCO_3$	5.0 g
Cisteína - HCl	0.5 g

Servir en frascos apropiados para las diluciones que se vayan a hacer del inóculo o de la mezcla de los biorreactores a los que se les quiera hacer caracterización de los grupos tróficos mediante la técnica del Número Más Probable -NMP-. Un volumen conveniente es 9.0 mL del agua reducida en cada frasco, cerrarlos con tapón de caucho y agrafes de aluminio. Hacer intercambio gaseoso introduciendo una aguja sola a través del tapón y otra conectada a una manguera con N_2 , para

desplazar con éste el oxígeno y asegurar un ambiente anaerobio. Cerrar y retirar primero la aguja del gas y después la de desalojo para no sobresaturar. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 minutos, dejar enfriar y guardar en refrigeración. Antes de utilizarlos para hacer las diluciones de las muestras que se van a sembrar, adicionar a cada frasco:

Na ₂ S. 9H ₂ O al 2.0%	0.1 mL
----------------------------------------------	--------

6. Solución de sulfito de sodio al 2 %

En un balón aforado apropiado para el volumen a preparar, adicione:

Para 100 mL: Na₂S. 9H₂O 2.0 g

Completar el volumen con agua anóxica. Envasar en frascos de 10 o 20 mL, cerrarlos con tapón de caucho y agrafes de aluminio. Hacer intercambio gaseoso introduciendo una aguja sola a través del tapón y otra conectada a una manguera con N₂, para desplazar el oxígeno de la botella sin sobresaturarla. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Dejar enfriar y guardar en refrigeración.

7. Solución de cisteína – HCl al 2.5%

En un balón aforado apropiado para el volumen a preparar, adicione:

Para 100 mL: Cisteína – HCl 2.5 g

Completar el volumen con agua anóxica y continuar como la solución anterior.

8. Solución de NiCl₂ al 0.05 %

En un balón aforado apropiado para el volumen a preparar, adicione:

Para 50 mL: NiCl₂. 6H₂O 0.025 g

Completar el volumen con agua anóxica y continuar como las soluciones anteriores.

9. Solución de FeSO₄ al 0.2 %

En un balón aforado apropiado para el volumen a preparar, adicione:

Para 50 mL: Fe (SO₄). 7H₂O 0.1 g

Completar el volumen con agua anóxica y continuar como las soluciones anteriores.

10. Solución de selenito de sodio al 0.18 %

En un balón aforado apropiado para el volumen a preparar y adicionar:

Para 50 mL: Selenito de sodio 0.09 g

Completar el volumen con agua anóxica y continuar como las soluciones anteriores

11. Solución de azul de bromotimol al 0.1 %

En un balón aforado apropiado para el volumen a preparar y adicionar:

Para 50 mL: Azul de Bromotimol 0.05 g

Completar el volumen con NaOH 0.1N y continuar como las soluciones anteriores

REFERENCIA:

Díaz-Báez *et al.*, 2002.

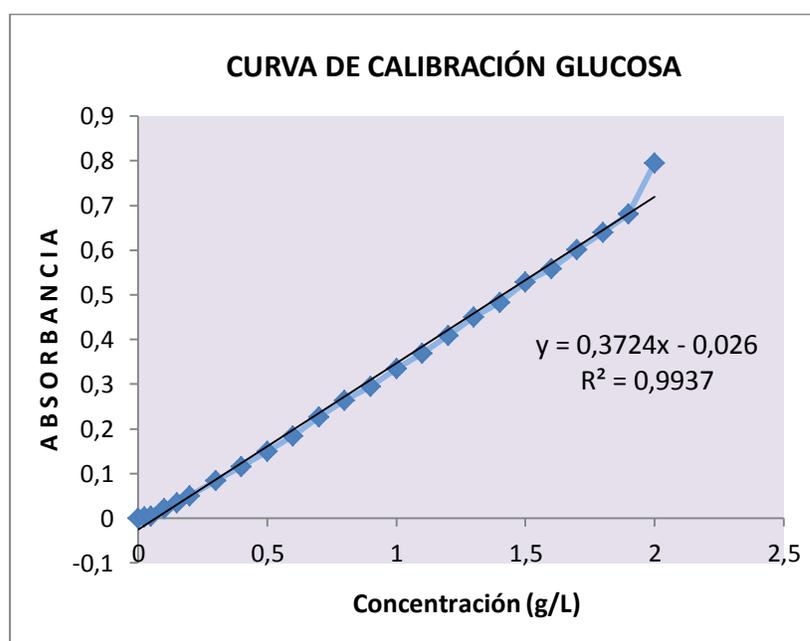
ANEXO C

CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

Determinación de ART por el método del ácido dinitrosalicílico -DNS-

Se preparó una solución con una concentración de glucosa de 2.0 g/L a partir de un patrón, a partir de la cual se prepararon diluciones en concentraciones diferentes abarcando un amplio rango. Se procesaron por el método de DNS y se leyeron en el espectrofotómetro a 540 nm.

Se construyó la curva y la ecuación de la recta se utilizó para hallar la concentración de las muestras a las que se les leyó la absorbancia.



ANEXO D

CALCULO DE LAS ACTIVIDADES DEL INÓCULO

Actividad Hidrolítica

Ejemplo con la variable de seguimiento: Azúcares Reductores Totales -ART-

$$AH = FC \frac{g \text{ DQO Gluc}}{g \text{ Gluc}} * m \frac{g \text{ Gluc}}{L . d} * \frac{1}{g \text{ SSV inóc}}$$

$$AH = FC \frac{g \text{ DQO Gluc}}{g \text{ Gluc}} * m \frac{g \text{ Gluc}}{L . d} * \frac{1}{\frac{m}{v} \text{ SSV inóc}}$$

$$AH = FC \frac{g \text{ DQO Gluc}}{g \text{ Gluc}} * m \frac{g \text{ Gluc}}{L . d} * \frac{V \text{ inóc}}{m g \text{ SSV inóc}}$$

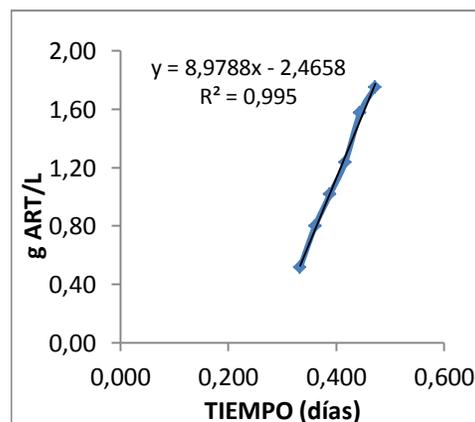
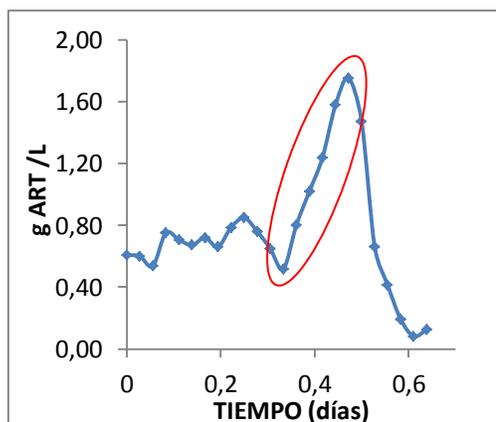
En donde:

FC = 1.067 g DQO/g Gluc

m = 8.978 g Gluc /L .d

Volumen inóculo = 0.091 L

Masa inóculo = 0.44 g SSV



$$AH = 1.067 \frac{g \text{ DQO Gluc}}{g \text{ Gluc}} * 8.978 \frac{g \text{ Gluc}}{L . d} * \frac{0.091 L}{0.44 g \text{ SSV}}$$

$$AH = 1.98 \text{ g DQO Glucosa g SSV.día}$$

ANEXO E

CALCULO DE LAS ACTIVIDADES DEL INÓCULO

Actividad Metanogénica Específica Acetoclástica

Ejemplo con la variable de seguimiento: Producción de metano.

$$AME(A) = \frac{P \frac{mL CH_4}{día}}{FC \frac{mL CH_4}{g DQO} * V_{in} L * SSV_{in} g/L}$$

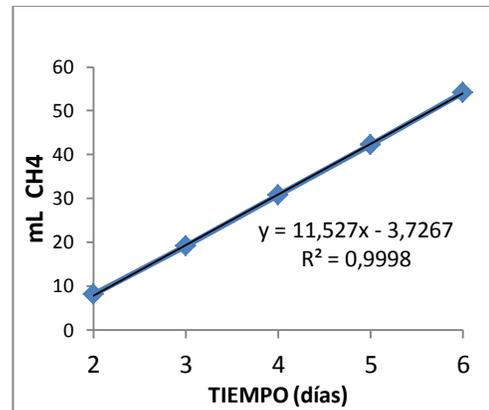
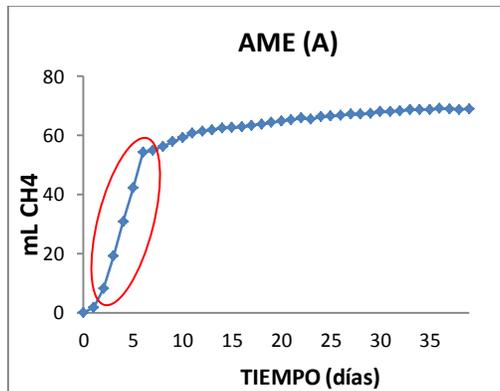
En donde:

$$P = 11.53 \text{ mL } CH_4/día$$

$$FC = 430 \text{ mL } CH_4/g \text{ DQO}$$

$$V_{in} = 0.091 \text{ L}$$

$$SSV_{in} = 4.92 \text{ g SSV/L}$$



$$AME(A) = \frac{11.53 \frac{mL CH_4}{día}}{430 \frac{mL CH_4}{g DQO} * 0.0091 L * 4.92 g SSV}$$

$$AME A = 0.598 \text{ g DQO } g \text{ SSV} \cdot día$$