

Aprovechamiento del Lactosuero a partir del proceso de digestión anaeróbica: Estudio de la estabilidad y de la recuperación de nutrientes en forma de Estruvita en digestores tubulares.

Daniela Andrea Carrillo Peña

Andrea Sofía Portillo Portilla

Trabajo de Grado para Optar el título de Ingeniero Químico

Director

Humberto Escalante Hernández

Ingeniero Químico, Ph.D.

Liliana Del Pilar Castro Molano

Ingeniera Química, Ph.D.

Jaime Jaimes Estévez

Ingeniero Químico, MSc

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2018

A Dios, porque gracias a él he llegado a este momento, por acompañarme y guiarme a lo largo de mi carrera, brindarme fortaleza en los momentos de debilidad, pero ante todo llenarme de aprendizajes y felicidad.

A mi Mamá y mi Abuela, por ser los motores de mi vida, por ser mujeres fuertes y ejemplares, pero sobre todo por sus enseñanzas con amor, sabios consejos y apoyo incondicional. A mi hermano, por ser parte importante de mí y darme una voz de aliento. A mi familia, por confiar en mis capacidades. A Miguel, por creer en mí, acompañarme, escucharme, motivarme y entenderme cada día.

A Sofí, la mejor compañera de tesis, por estar en este viaje, por su amistad y por hacer de su familia una familia para mí. A mi mejor amigo Brayán, por su apoyo, sus locuras y su alegría que siempre me hacen sonreír. A Fer, Rafa, Juli, Carol, Isa y Yessi, por ser amigos y cómplices en este proceso.

Gracias a todos por inspirarme constantemente y enseñarme que al soñar se alcanzan grandes cosas. Mis logros son de ustedes y para ustedes.

Daniela Andrea Carrillo Peña

*A Dios, por su infinito amor y por ponerme siempre en el lugar correcto, con la gente precisa
y en el tiempo indicado.*

*A mi Papá por ser mi ángel, mi pensamiento frecuente, mi compañía en silencio y mi
inspiración.*

A mi Mamá por su amor incondicional, por su entrega, su valentía y por ser el motor de mi vida.

A mi hermano, por ser mi compañía todos los días.

A mi tía Mercy, Tati y Luchito por ser mi segunda familia.

A mis abuelos por su sabiduría y amor.

A Edison por apoyarme, animarme y confiar en mí siempre.

A Dani, por su amistad, su energía y todos los momentos que hemos compartido.

A Diana por escucharme, apoyarme y ser tan incondicional.

A Johan, Rafa, Isa, Juli y Carol por el día a día en la Universidad.

Andrea Sofía Portillo Portilla

Agradecimientos

A Dios, por ponernos siempre en el lugar correcto, con la gente precisa y en el tiempo indicado.

A la Profesora Liliana Castro Molano, por las oportunidades que nos brindó, su amabilidad, paciencia y acompañarnos durante este proceso.

Al Profesor Humberto Escalante Hernández, por su experiencia y por guiarnos en este proyecto.

A Jaime Jaimes Estévez, por sus enseñanzas, su exigencia, su buena energía ante las adversidades y por ser nuestro apoyo incondicional.

Al grupo de investigación en Digestión anaeróbica e INTERFASE por aportar en nuestra formación profesional y personal.

Al grupo de investigación de Ingeniería química, ambiental y de procesos de la Universidad de León, España, especialmente al Profesor Antonio Morán y al grupo del laboratorio, por acogernos y brindarnos su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A la finca Marcella y a Lácteos Villa Aurora por su participación y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A todos los profesores, técnicos de apoyo, especialmente al Ing. Guillermo Acero, al Químico Joaquín, al personal administrativo de la escuela de Ingeniería Química y a los compañeros y amigos que hicieron parte de este proceso.

A la UIS, por las oportunidades ofrecidas para el desarrollo de este proyecto.

Tabla de Contenido

	Pág
Introducción.....	17
1. Metodología.....	21
1.1. Recolección y caracterización de los sustratos e inóculo	21
1.2. Evaluación de diferentes cargas orgánicas para la estabilidad de la CoDA de lactosuero y estiércol bovino en biodigestores tubulares	22
1.2.1. Adaptación del inóculo al proceso de CoDA en estado discontinuo	23
1.2.2. Proceso de codigestión anaeróbica en operación Semi-continua.....	24
1.3. Precipitación de estruvita para la recuperación de nutrientes en el digerido	25
1.3.1. Monitoreo del contenido de nutrientes (PO_4^{3-} y NH_4^+)	26
1.3.2. Precipitación y caracterización de estruvita.....	26
2. Resultados.....	27
2.1. Caracterización de los sustratos e inóculo	27
2.2. Proceso de codigestión anaeróbica del LS y EB en estado discontinuo y semicontinuo.....	29
2.2.1. Etapa de adaptación del inóculo al proceso de CoDA.	29
2.2.2. Estabilidad del proceso de codigestión anaeróbica en operación semi-continua	30
2.3. Monitoreo y recuperación del contenido de nutrientes en forma de estruvita.....	41
2.3.1. Contenido de PO_4^{3-} y NH_4^+ presentes en el digerido del proceso de digestión anaeróbica del lactosuero	41

2.3.2. Recuperación de de PO_4^{3-} y NH_4^+ en forma de estruvita a partir del digerido de la CoDA del lactosuero43

2.3.3. Análisis cualitativos de los precipitados: espectroscopia infrarroja y microscopia.....45

3. Conclusiones.....47

Referencias Bibliográficas.....48

Apéndices57

Lista de Figuras

Figura 1. Montaje de un reactor tubular para la CoDA de lactosuero.....	23
Figura 2. Producción específica promedio de biogás acumulada de los reactores en la etapa de adaptación.....	30
Figura 3. Variación de la concentración de ácidos grasos volátiles en la dirección axial para cada reactor con su respectiva carga.....	31
Figura 4. Variación del pH en la dirección axial para cada reactor con su respectiva carga.....	33
Figura 5. Capacidad buffer (AGV/AT) en la dirección axial para cada reactor con su respectiva carga.....	34
Figura 6. Producción diaria de biogás para cada una de las 3 cargas estudiadas.....	36
Figura 7. Comportamiento de la actividad metanogénica específica de la DA del LS a lo largo del reactor para tres diferentes cargas (R1, R2, R3).....	38
Figura 8. Clasificación taxonómica de <i>Archaeas</i> a nivel de familia en cada punto del reactor. ..	39
Figura 9. Comportamiento de los iones PO_4^{3-} (a) y NH_4^+ (b) presentes en el digerido del proceso.....	42
Figura 10. Concentración molar de PO_4^{3-} , NH_4^+ y Mg^{2+} para el digerido homogenizado de los Reactores R1, R2 y R3.....	43
Figura 11. Porcentajes de recuperación de fosfato a partir de cada uno de los digeridos de los reactores R1, R2 y R3.....	44

Figura 12. Espectroscopia infrarroja para cada uno de los precipitados obtenidos a partir del digerido de R1, R2 y R3 y la espectroscopia del patrón de estruvita (Adaptado de Stefov *et al.*, (2005)). 45

Figura 13. Micrografías de la estruvita precipitada para R1 (a), R2 (b) y R3 (c) con zoom de 10X. 46

Lista de Tablas

Tabla 1. Cargas orgánicas de LS reportadas en literatura.	19
Tabla 2. Operación con alimentación semi-continua.	24
Tabla 3. Caracterización de los sustratos e inóculo usados en el diseño experimental.	27
Tabla 4. Porcentaje de <i>Archaeas</i> en R1, R2 y R3 de acuerdo a su ruta de producción de metano.	39

Lista de Apéndices

Apéndice A. Bioquímica de la digestión anaeróbica.....	57
Apéndice B. Caracterización completa del lactosuero.	59
Apéndice C. Caracterización fisicoquímica del digerido.	60
Apéndice D. Determinación de la actividad metanogénica.....	61
Apéndice E. Método de desplazamiento alcalino.....	64
Apéndice F. Protocolo de precipitación de ES.	67
Apéndice G. Protocolo de extracción de ADN.....	71

Glosario

AGV: Ácidos grasos volátiles

AME: Actividad metanogénica específica

AT: Alcalinidad total

BDGT: Biodigestor tubular de bajo costo

CoDA: Co-digestión anaeróbica

DA: Digestión anaeróbica

DQO: Demanda química de oxígeno

EB: Estiércol bovino

ES: Estruvita

LS: Lactosuero

SV: Sólidos volátiles

RESUMEN

TÍTULO: APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO A PARTIR DEL PROCESO DE DIGESTIÓN ANAERÓBICA: ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y DE LA RECUPERACIÓN DE NUTRIENTES EN FORMA DE ESTRUVITA EN DIGESTORES TUBULARES.*

AUTOR: DANIELA ANDREA CARRILLO PEÑA**; ANDREA SOFÍA PORTILLO PORTILLA**

PALABRAS CLAVE: Lactosuero, Co-Digestión anaeróbica, Separación de fases, Recuperación de fosfato, Estruvita, Ácidos grasos volátiles.

DESCRIPCIÓN:

El principal residuo generado en la producción de queso es el lactosuero (LS). En este estudio se llevó a cabo el tratamiento del LS por medio de la co-digestión anaeróbica, utilizando estiércol bovino (EB) como co-sustrato, para aprovechar el alto contenido de materia orgánica y reducir los riesgos de inhibición. Además, obtener un biogás que puede ser utilizado como energía y un digerido con alto contenido nutricional del cual se pueden recuperar los nutrientes (amonio y fosfato) por medio de la precipitación de estruvita. Para esto, se implementó el proceso de co-digestión en tres reactores tubulares (Longitud= 1 m, Diámetro =0.11 m, Volumen operación= 4.3 L), cada uno con velocidad de carga orgánica diferente (0.5; 1.0 y 1.5 kg $DQO_{\text{sustratos}}/m^3_{\text{digestor}} \cdot \text{día}$). Se encontró que una velocidad de carga orgánica de 1.0 kg $DQO_{\text{sustratos}}/m^3_{\text{digestor}} \cdot \text{día}$, permite que el proceso sea estable y sin riesgos de inhibición alcanzando producciones de biogás de $1,270.1 \pm 85.3$ mL biogás/d y recuperaciones de fosfato del 77% (en forma de estruvita). Al realizar un análisis bioquímico y microbiológico a lo largo del eje axial de cada reactor, se evidenció que para la carga de 1.0 kg $DQO_{\text{sustratos}}/m^3_{\text{digestor}} \cdot \text{día}$ es posible obtener una separación de fases. El análisis bioquímico demuestra que en la primera y la segunda parte del reactor se lleva a cabo la fase de producción y consumo de ácidos grasos volátiles (AGV) respectivamente. En el análisis microbiológico se encontró que en la primera parte del reactor el porcentaje de *Archaeas* acetoclásticas fue del 48% mientras que en la segunda parte estuvo entre el 73 y el 80% confirmando la estratificación del consorcio microbiano. Siendo este proceso idóneo para un sustrato ácido como el lactosuero.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Humberto Escalante Hernández, Ingeniero Químico, Ph.D; Liliana Del Pilar Castro Molano, Ingeniera Química, Ph.D; Jaime Jaimes Estévez, Ingeniero Químico, MSc.

ABSTRACT

TITLE: USE OF CHEESE WHEY FROM ANAEROBIC DIGESTION PROCESS: STUDY OF STABILITY AND NUTRIENTS RECOVERY IN FROM OF STRUVITE IN TUBULAR REACTORS*

AUTHOR: DANIELA ANDREA CARRILLO PEÑA**; ANDREA SOFÍA PORTILLO PORTILLA**

KEYWORDS: Cheese whey, Anaerobic Co-Digestion, Phase separation, Phosphate recovery, Struvite, Volatile fatty acids.

DESCRIPTION:

The main residue generated in the cheese production is the cheese whey (CW). This study carried out CW anaerobic co-digestion treatment, using bovine manure (EB) as co-substrate, to take advantage of the high content of organic matter and reduces the inhibition risks. In addition, obtain a biogas that can be used as energy and a digest with high nutritional content of which can recover the nutrients (ammonium and phosphate) by means of struvite precipitation. For this, the co-digestion process was implemented in three tubular reactors (Length= 1 m, Diameter =0.11 m, Volume operation= 4.3 L), each one with different organic load rate (OLR) (0.5; 1.0 y 1.5 kg COD_{substrate}/m³_{digestor}*day). The OLR of 1.0 kg COD_{substrate}/m³_{digestor}*day, allows the process stability without inhibition risk, the biogas production reached is 1,270.1 ± 85.3 mL biogas/day and phosphate recovery is 77% (form of struvite). A biochemical and microbiological analysis along the axial axis of each reactor showed that it is possible to obtain a phase separation with an OLR of 1.0 kg COD_{substrate}/m³_{digestor}*day. The biochemical analysis shows, that the phase of volatile fatty acids (VFA) production is carried out in the first reactor section and VFA consumption in the second section. In the microbiological analysis it was found that in the first reactor section the percentage of Acetoclastics *Archaeas* was 48% while at the second section it was between 73 and 80% showing the microbial consortium stratification. This process is ideal for an acid substrate such cheese whey.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Humberto Escalante Hernández, Ingeniero Químico, Ph.D; Liliana Del Pilar Castro Molano, Ingeniera Química, Ph.D; Jaime Jaimes Estévez, Ingeniero Químico, MSc.

Introducción

La producción lechera en Colombia hace presencia en 22 departamentos del país donde se registran más de 395,215 unidades productoras de leche, es decir, casi 400,000 fincas o haciendas de las cuales solo el 20% tienen más de 15 animales (Pinto, 2017). El principal producto obtenido a partir de leche es el queso. Para producir 1 kg de queso se necesitan 10 L de leche de los cuales 9 L se convierten en lactosuero (LS) como subproducto. En el 2016 se consumieron en Colombia más de 1,050 millones de litros de leche y 85,000 toneladas de quesos (Pinto, 2017) produciendo altos volúmenes de LS que generalmente son vertidos a las masas hídricas. Esto provoca un impacto ambiental negativo debido al alto contenido de materia orgánica.

En la actualidad existen varias alternativas para valorización del LS entre las cuales se encuentran procesos de separación por membranas (Muñi, Paez, Faría, Ferrer, & Ramones, .2005), hidrólisis (Conti, Ceriani, Juliarena, & Estaban, 2012), tratamientos anaeróbicos y aeróbicos (García, Arrázola, & Villalba, 2013). Desde el punto de vista biológico se destaca como proceso de intensificación la digestión anaeróbica (DA) que es considerada un tratamiento económico, rentable y que demanda menos energía siendo así empleada para el tratamiento de diversos tipos de residuos (Motta-Correa & Mosquera, 2015).

En el proceso de DA se obtiene energía en forma de biogás (que es una mezcla de metano (CH_4) entre 40 y 70 %, dióxido de carbono (CO_2) entre 60 y 30%, nitrógeno (N) entre 0.5%-3% y ácido sulfhídrico (H_2S) de 0.1%-1%) y un digerido que cuenta con una alta concentración en productos minerales como el fósforo (P), nitrógeno (N), calcio (Ca) y potasio (K) (Cámara &

Laines, 2011). El lactosuero posee una alta carga orgánica (50-70 kg DQO/m³) que lo hace un sustrato ideal para la producción de biogás (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017; Rico, Muñoz, & Rico, 2015). De acuerdo con la literatura, la producción de biogás a partir del lactosuero es alrededor de los 0.55 m³ biogás /kg DQO (Rico, Muñoz, & Rico, 2015; Fernández, Cuetos, Martínez, & Gómez, 2015).

El lactosuero retiene el 55% de los nutrientes de la leche (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017), además posee altos contenidos de nitrógeno y fósforo por lo cual desde un punto de vista nutricional el digerido resultante del proceso de digestión anaeróbica con este sustrato es adecuado para su utilización como fertilizante. Sin embargo, el uso directo del digerido no es aconsejable ya que puede producir problemas de eutrofización. Una técnica sencilla para recuperar los nutrientes del digerido es mediante la precipitación de Estruvita (ES) (Stolzenburg, Capdevielle, Teychené, & Biscans, 2015). La estruvita (MgNH₄PO₄·6H₂O) es un fertilizante de liberación lenta que aporta nutrientes fundamentales como magnesio, nitrógeno y fósforo, además requiere menos frecuencia de aplicación y no causa daños en la planta (Hidalgo, 2014).

Sin embargo, la digestión anaeróbica del lactosuero presenta problemas de inhibición debido a la acumulación de nitrógeno amoniacal y de ácidos grasos volátiles (AGV) provenientes de la degradación de compuestos nitrogenados y por la fermentación de carbohidratos lípidos y proteínas (Astals, S; Ariso, M; Galí, A; Mata-Alvarez, J, 2011). Una alternativa para mejorar estos problemas es la adición de dos o más sustratos a la mezcla, proceso comúnmente llamado Co-digestión anaeróbica (CoDA) (Rodríguez, 2014).

La CoDA es una tecnología que: aumenta entre un 25% a 400% la producción de biogás y rendimiento del metano comparado con la mono digestión de los mismos sustratos. A su vez, la CoDA disminuye los efectos inhibidores, equilibra los micronutrientes y macronutrientes,

diversifica e incrementa los efectos sinérgicos de las comunidades microbianas que juegan un papel fundamental en el metanogénesis y aumenta la carga orgánica biodegradable por unidad de volumen (Shah, y otros, 2015). El estiércol bovino (EB) en codigestión con LS regula el pH del sistema y disminuye los riesgos de inhibición ya que tiene una alcalinidad total (AT) (1850 mg CaCO₃/L) mucho mayor respecto a la reportada para el LS (750 mg CaCO₃/L) (Escalante, Castro, Amaya, Jaimes, & Jaimes-Estévez, 2018; Kalyuzhnyi, Perez Martinez, & Rodriguez Martinez, 1997). Por tanto, el EB es un cosustrato con alta capacidad buffer que brindaría estabilidad al proceso.

Para evitar problemas de inhibición, en operación continua se debe tener en cuenta la velocidad de carga orgánica que suele expresarse en términos de kg SV/m³ día o kg DQO/m³ día y representa la cantidad de materia orgánica alimentada en el digester por día. El aumento de la carga orgánica, incrementa la producción de biogás. Sin embargo, una carga orgánica muy alta puede alterar la estabilidad del proceso. Esto puede verse reflejado en la acumulación de AGV y en los iones amonio (NH₄⁺) lo que supone una acidificación del medio (Mao, Feng, Wang, & Ren, 2015). La literatura reporta el uso de bajas cargas orgánicas posiblemente al alto riesgo de acidificación del medio. En la tabla 1 se muestra algunas cargas orgánicas usadas para la digestión del LS en diferentes tipos de reactor.

Tabla 1
Cargas orgánicas usadas en DA del LS en diferentes tipos de reactor.

Velocidad de Carga Orgánica [kg DQO / m ³ *d]	Tipo de Reactor	Referencia
1	CSTR	(Yang, Yu, & Hwang, 2003)
1.5	Reactor Batch en secuencia (SBR)	(Fernández, Cuetos, Martínez, & Gómez, 2015)
0.5 - 2	Tubular	(Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017)
0.6 – 2.1	CSTR con alimentación semi-continua	(Lebrato, Pérez Rodríguez, Maqueda, & Morillo, 1990)

El diseño del reactor tiene gran influencia en la estabilidad de la DA del LS. Los principales reactores utilizados son los CSTR y UASB (Fernández, Martínez, Morán, & Gómez, 2016); en los cuales el proceso se realiza en una sola fase, en un único equipo. Así mismo, existen procesos que son llevados a cabo en dos fases donde se configuran dos reactores en serie para la producción y el consumo de ácidos grasos respectivamente, (Bertin, Grilli, Spagni, & Fava, 2013) presentó notables mejorías en la producción de metano con este tipo de configuración. Sin embargo, durante la operación se puede señalar que presenta problemas de sedimentación de lodos, rápida acidificación y altos requerimientos energéticos. Adicionalmente, la implementación y uso de estos reactores no es atractiva para los pequeños y medianos productores de queso debido al alto costo, compleja instalación, operación y mantenimiento. Una alternativa de fácil manejo e implementación, que también se caracteriza por su economía, son los biodigestores tubulares de bajo costo (BDGT) de los cuales algunos estudios reportan el uso de desechos animales como sustrato (Castro, y otros, 2017; Poggio, Paiva-Prado, Ferrer-Martí, I, & Velo, 2010; Martí-Herrero J.). Este tipo de biodigestores se han empleado satisfactoriamente con sustratos ácidos como la piña y el lactosuero obteniendo porcentajes de remoción de materia orgánica entre 60-65% para la piña y aproximadamente 80% para el LS (Namsree, Suvajittanont, Puttanlek, & Rungsardthong, 2012; Castro, y otros, 2017). Sin embargo, la literatura es limitada en cuanto al tratamiento del Lactosuero en este tipo de biodigestores (Garfí, Martí-Herrero, Garwood, & Ferrer, 2016).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la estabilidad del proceso de CoDA del lactosuero y estiércol bovino, en reactores tubulares operados en semi-continuo, con cargas orgánicas diferentes y posteriormente recuperar los nutrientes por medio de la precipitación de estruvita. Esta alternativa de tratamiento del LS puede resultar atractiva para las microempresas productoras de queso dándole un valor agregado a este subproducto.

1. Metodología

El diseño metodológico se orientó a la operación de 3 reactores tubulares en los cuales se llevó a cabo la CoDA del LS y EB. Cada reactor fue operado con una carga orgánica diferente y se estudió la evaluación de la estabilidad del proceso y la recuperación de nutrientes. Para esto se plantearon 3 etapas: en la primera se recolectaron y caracterizaron los sustratos y el inóculo. La segunda etapa se centró en el estudio del proceso de CoDA de LS y EB en operación semi-continua. Finalmente, a partir del digerido obtenido se realizó la recuperación de nutrientes en forma de ES y la caracterización de los precipitados.

1.1. Recolección y caracterización de los sustratos e inóculo

El lactosuero fue suministrado por la microempresa Villa Aurora, una productora de queso que se encuentra ubicada en el departamento de Santander, Colombia (Lat: N 7°8' 19. 2'' Long W 73°7' 31. 298''). Produce entre 1,360 y 1,520 L/día de LS. El LS se recolectó a temperatura ambiente en botellas plásticas de 3 L. Las muestras se recolectaron semanalmente durante 3 meses y fueron refrigeradas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. El estiércol bovino fresco y el inóculo fueron recolectados en la finca Marcella, ubicada en Girón, Santander a 9 km de la zona urbana, a una altitud de 959 m.s.n.m. (Lat. N 7°01 '0.07' Long. 'W 73°08' 13.3''). La finca Marcella cuenta con tres cabezas de ganado bovino de raza Normando que producen entre 34 – 51 kg/d de excreta bovina. La fuente de inóculo fue lodo estiércol bovino proveniente de un biodigestor de bajo costo de 9.5 m³

instalado en la finca en mención que es alimentado a partir estiércol/agua y produce diariamente 0.9 m³ de biogás.

Tanto los sustratos como el inóculo fueron caracterizados en términos de SV, ST, DQO, AGV, AT, pH, PO₄³⁻ y NH₄⁺. Para determinar los SV, ST y DQO, se usaron los protocolos establecidos por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 2005) método gravimétrico SM 2450E y método colorimétrico SM 5220D, respectivamente. La AT y los AGV se realizaron por titulación (Vannecke, Lampens, Ekama, & Volcke, 2015), el pH se determinó mediante el método potenciométrico SM 4500B (APHA, 2005) y el contenido de PO₄³⁻ y NH₄⁺ se determinó mediante colorimetría utilizando los protocolos 4500-NH₃ y 4500-P E respectivamente (APHA, 2005).

1.2. Evaluación de diferentes cargas orgánicas para la estabilidad de la CoDA de lactosuero y estiércol bovino en biodigestores tubulares

La CoDA de LS:EB se llevó a cabo a una temperatura de 25°C ± 4 (temperatura promedio de Bucaramanga, Colombia) en tres reactores tubulares de cloruro de polivinilo de dimensiones: longitud de 1 m, diámetro de 0.11 m, volumen total de 9 L, volumen de operación de 4.3 L y con una relación longitud/diámetro de 9, la cual es considerada como favorable (Martí-Herrero & Cipriano, 2012). Cada reactor tiene una entrada de sustrato, dos puntos de muestreo intermedios (S1 = 0.33 m, S2 = 0.66 m), una salida para el digerido (S3 = 0.99 m) y una válvula para la medición del biogás (Figura 1).

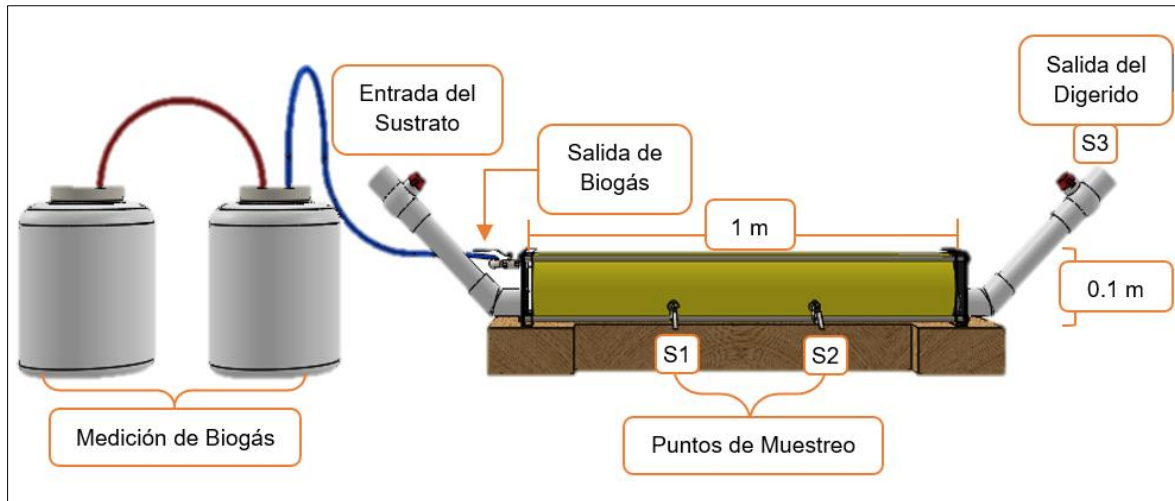


Figura 1. Montaje de un reactor tubular para la CoDA de lactosuero.

1.2.1. Adaptación del inóculo al proceso de CoDA en estado discontinuo. La etapa de acondicionamiento se realizó durante 30 días en operación discontinua con el fin de adaptar el inóculo a la mezcla de los sustratos. Durante los primeros 20 días se realizaron cargas de $0.5 \text{ kg SV}_{\text{sustratos}}/\text{m}^3_{\text{digestor}} \cdot \text{día}$ con una fracción de LS de 0.7 hasta llegar a una relación inóculo/sustratos (RIS) de $2.2 \text{ gSV}/\text{gSV}$ lo cual es favorable para el proceso (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017). El estado estacionario del sistema acabó cuando la producción del biogás alcanzó una producción diaria invariable.

Cada 5 días se tomaron 60 mL de muestra de la primera salida del reactor para determinar AGV, AT y pH. Además, la producción de biogás fue cuantificada determinado el volumen del gas generado mediante el desplazamiento de una solución saturada de cloruro de sodio (Angelidaki, Karakashev, Batsone, Plugge, & Stams, 2011). Esta etapa de adaptación fue la misma para los tres reactores.

1.2.2. Proceso de codigestión anaeróbica en operación Semi-continua: Análisis bioquímicos y microbiológicos. Una vez adaptado el inóculo, se inició a la operación de los reactores. La alimentación se realizó de manera semi-continua con una mezcla de LS:EB (70:30) durante 35 días, esta proporción se tomó basada en Escalante *et. al* (2017). La materia orgánica a cargar y el volumen alimentado en cada reactor se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.
Operación con alimentación semi-continua.

Reactor	Velocidad de carga orgánica [kg DQO _{sustratos} / m ³ _{digestor} *d]	Materia orgánica a cargar [g DQO/d]	Volumen de alimentación [mL/d]
R1	0.5	2.15	35
R2	1.0	4.27	65
R3	1.5	6.47	100

1.2.2.1. *Estabilidad del proceso desde el punto de vista bioquímico.* Se realizó un análisis del pH, AGV y capacidad buffer (AGV/AT) en la dirección axial de cada uno de los tres reactores durante 5 semanas. Para esto se tomaron muestras semanalmente de 20 mL de los dos puntos de muestreo intermedios (S1, S2) y la salida de digerido (S3) de cada reactor.

1.2.2.2. *Estabilidad del proceso desde el punto de vista microbiológico.* Se determinó la actividad metanogénica específica (AME) (capacidad de los consorcios microbianos para producir metano). Para esto, se tomaron una vez por semana muestras de 210 mL de los dos puntos de muestreo intermedios y la salida de digerido de cada reactor (Astals, 2015).

En la semana 5 se realizó la caracterización de las poblaciones de *Archaeas* para cada reactor y se tomaron muestras de 40 ml en cada punto de muestreo. Esto se llevó a cabo mediante la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) y secuenciación masiva, con una técnica

independiente de cultivo considerada dentro de las técnicas de “next generation sequencing”, como es la Pirosecuenciación.

Para la extracción del ADN genómico, se tomaron entre 150-250 mg de cada muestra a analizar. Se siguió un protocolo de extracción físico-químico del tipo beat-beating utilizando el kit de aislamiento Soil DNA Isolation Plus Kit® (Norgen Biotek Corp) (Apéndice G).

Con los extractos de ADN obtenidos, se llevó a cabo la pirosecuenciación de librerías masivas del gen 16SrRNA de *Archaeas* totales para la caracterización del total de la comunidad microbiana, mediante la técnica Illumina, con el secuenciador GS-FLX 454 de Roche, en el Molecular Research DNA Laboratory (Shallowater, Texas, USA). Cada muestra se amplificó con el par de oligos Arch 349F (5'- GYGCASCAGKCGMGAAW-3') / Arch 806R (5'- GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), para el gen 16SrRNA de *Archaeas* respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems).

Las lecturas del ADN obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente usando la base de datos Ribosomal Data Project (RDP , 2016). Esta sección experimental se realizó directamente por las autoras, en el Grupo de Investigación: Ingeniería Química, Ambiental y Bioprocesos, de la Universidad de León, España. Esta pasantía fue apoyada por la División de Relaciones Exteriores de la UIS.

1.3. Precipitación de estruvita para la recuperación de nutrientes en el digerido

Esta etapa se enfocó en evaluar las propiedades del digerido y recuperar los nutrientes de este en forma de estruvita. Se monitorearon los digeridos de los 3 reactores para ver el comportamiento

del contenido de nutrientes (PO_4^{3-} y NH_4^+), posteriormente se realizó la precipitación y caracterización de la estruvita de acuerdo con el protocolo establecido por Zhao *et al.*, (2010).

1.3.1. Monitoreo del contenido de nutrientes (PO_4^{3-} y NH_4^+). Cada siete días y durante cinco semanas se estudió el comportamiento de los principales nutrientes necesarios para la precipitación de estruvita y se determinó el contenido de PO_4^{3-} y NH_4^+ en el digerido mediante colorimetría (4500-NH₃ y 4500-P E respectivamente) (APHA, 2005).

1.3.2. Precipitación y caracterización de estruvita. Cada 7 días durante 5 semanas se recolectó y refrigeró el digerido proveniente de los 3 reactores a 4 °C. Las muestras recolectadas fueron homogenizadas para cuantificar el contenido de NH_4^+ y PO_4^{3-} mediante el método colorimétrico descrito por APHA (2005). Así mismo, se realizó la determinación del contenido de Mg^{2+} mediante el método de absorción atómica (NTC 1369). La estruvita fue precipitada del digerido a temperatura ambiente y presión atmosférica. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los reactores mediante la metodología propuesta por Zhao *et al.*, (2010) (Apéndice F).

El porcentaje de recuperación de nutrientes (PO_4^{3-} y NH_4^+) se calculó mediante la ecuación 1 teniendo en cuenta la concentración de PO_4^{3-} y NH_4^+ del digerido antes y después de la precipitación.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración}_{\text{inicial}} - \text{Concentración}_{\text{final}}}{\text{Concentración}_{\text{inicial}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

El precipitado de cada reactor fue caracterizado cualitativamente mediante microscopía a través de un microscopio petrográfico de luz polarizada (LEICA DM750, con una cámara LEICA de

1200x180 pix) a 10X de ampliación. Además, se caracterizaron con radiación infrarroja mediante transformada de Fourier, utilizando un infrarrojo FTIR-8400S. Lo anterior con el fin de determinar qué tipo de minerales se encuentra en los precipitados.

2. Resultados

2.1. Caracterización de los sustratos e inóculo

La caracterización del inóculo y los sustratos utilizados se presentan en la tabla 3. Los resultados demuestran que el LS contiene alto contenido de materia orgánica disponible para su biodegradación en un proceso anaeróbico, además la materia orgánica fácilmente biodegradable, representada en la concentración de AGV, permite concluir que el LS tiene alta capacidad para producir metano. Por otro lado, los niveles de NH_4^+ y PO_4^{3-} indican que tiene un alto potencial para la recuperación de nutrientes. Sin embargo, la relación C/N del LS es inferior a algunos valores reportados en literatura como aceptables (15-20; (Garfí, Martí-Herrero, Garwood, & Ferrer, 2016)) y la falta de alcalinidad del LS y su pH ácido, pueden representar problemas de acidificación durante el proceso de DA (Brown, Güttler, & Shilton, 2016). Por lo que se hace necesario el uso de un co-sustrato que mejore las condiciones del proceso.

Tabla 3

Caracterización de los sustratos e inóculo usados en el diseño experimental.

VARIABLES	UNIDADES	INÓCULO	LS	EB
AGV	[mg/L]	350 ± 70.71	4,800 ± 169.71	720 ± 84.85
AT	[mg CaCO ₃ /L]	1,500	1,850 ± 70.71	16,400 ± 70.71

VARIABLES	UNIDADES	INÓCULO	LS	EB
ART	[mg/L]	77.9 ± 48.12	1,855 ± 895.31	1,030 ± 70.30
DQO	[g/L]	11.21 ± 0.39	51.03 ± 0.76	59.41 ± 2.52
DQO _s	[g/L]	0.62 ± 0.41	33.4 ± 1.25	4.84 ± 1.64
SV	[g/kg]	12.29 ± 0.02	55.1 ± 3.25	132.47 ± 1.09
NH ₄ ⁺	[mg/L]	254.5 ± 3.54	41.5 ± 3.54	12 ± 1.41
PO ₄ ⁻³	[mg/L]	265.5 ± 7.07	1,438.58 ± 85.36	325 ± 28
pH	-----	7.86	4.1	7.84
C/N	-----	27.7	11.9	23.9
C	%p/p	9.97	38.36	39.89
H	%p/p	ND	5.02	4.78
O	%p/p	ND	38.94	33.5
N	%p/p	0.36	3.21	1.44
Carbohidratos	%p/p	ND	55.33	47.74
Lípidos	%p/p	ND	1.92	2.44
Proteínas	%p/p	ND	23	9
Na	[g/kg]	ND	ND	0.11
Mg	[g/kg]	ND	ND	0.07
Ni	[g/kg]	ND	ND	1.14

Los resultados obtenidos para el EB muestran que tiene pH y AT favorable para el proceso de la CoDA. Por lo cual, se puede inferir que el EB reduce los problemas de acidificación, evitando la inhibición y mejorando la estabilidad del proceso. El inóculo posee menor cantidad de SV y DQO que el LS y EB, lo que asegura la reducción de la producción endógena de metano, favoreciendo el consumo de nutrientes de los sustratos.

2.2. Proceso de codigestión anaeróbica del LS y EB en estado discontinuo y semicontinuo

2.2.1. Etapa de adaptación del inóculo al proceso de CoDA. En la etapa de adaptación del inóculo al sustrato (LS:EB) se monitorearon los AGV, el pH y la capacidad buffer (AGV/AT) y se obtuvieron valores de 505.55 ± 65.8 [mg/L], 7.48 ± 0.29 y 0.47 ± 0.1 [mg_{Ac.acético}/mgCaCO₃] respectivamente.

En esta etapa, la concentración de AGV se encuentra por debajo de los límites de inhibición reportados en procesos de digestión en batch (<2,000 mg/L) (Cirne, Paloumet, Björnsson, Alves, & Mattiasson, 2007). Así mismo, el pH promedio de los rectores durante la etapa de adaptación fue adecuado para el proceso anaeróbico (Poh & Chong, 2009). Esto se puede confirmar con los resultados de la capacidad buffer los cuales indican que no hay riesgos de acidificación (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017).

La producción de biogás específica promedio, fue de 0.36 ± 0.05 m³ biogás/kg SVadicionado. La producción específica de biogás para los reactores comenzó aproximadamente después del día diez y alcanzó una estabilidad alrededor del día 27 como se observa en la figura 2.

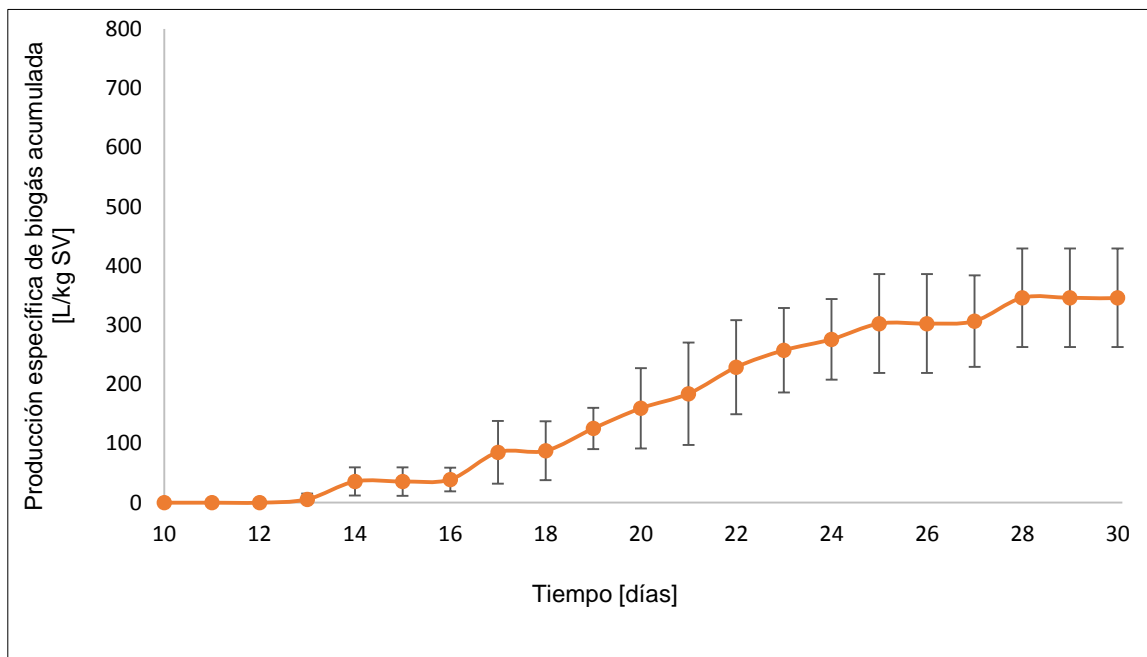


Figura 2. Producción específica promedio de biogás acumulada de los reactores en la etapa de adaptación.

Estos resultados son coherentes comparados con estudios anteriores de co-digestión de lactosuero con estiércol bovino en reactores UASB y CSTR a temperatura de 35°C. Donde los rendimientos alcanzados estuvieron alrededor de 0.83 m³ biogás /kg SV (Fernández, Cuetos, Martínez, & Gómez, 2015).

2.2.2. Estabilidad del proceso de codigestión anaeróbica en operación semi-continua

2.2.2.1. *Análisis bioquímicos: AGV, pH, capacidad buffer (AGV/AT) y producción de biogás.* Para las figuras 3, 4 y 5 el punto inicial (Longitud del reactor: L = 0 m) hace referencia a la concentración de AGV, pH y capacidad buffer del sustrato alimentado respectivamente.

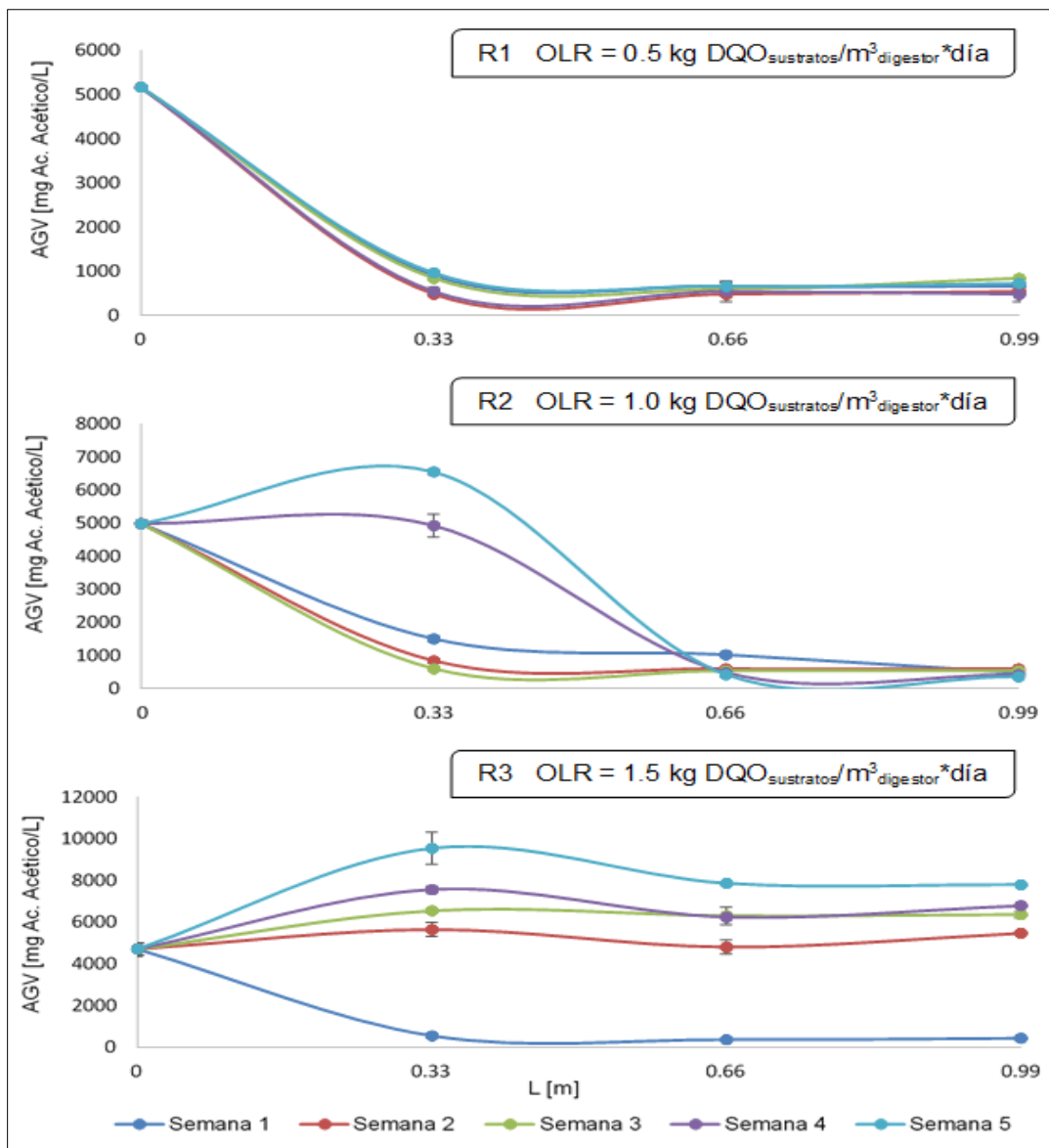


Figura 3. Variación de la concentración de ácidos grasos volátiles en la dirección axial para cada reactor con su respectiva carga.

En procesos de digestión en estado semi-continuo, una concentración de ácidos grasos por debajo de los 2,000 mg/L indica que no hay inhibición (Zhang, Zhang, Zhang, Shi, & Cai, 2005). En el reactor R1 (Carga = 0.5 kg DQO_{sustratos}/ m³digestor*día), durante las cinco semanas de estudio el contenido de AGV se mantuvo por debajo de los 2,000 mg/L como se observa en la figura 3. Al comparar los valores de ácidos grasos volátiles obtenidos con los reportados por

Fernández *et al.*, (2015), se confirma que el proceso es estable. El reactor R2 (Carga = 1.0 kg DQOsustratos/ m³digestor*día) mostró un comportamiento muy particular. A lo largo de todo el eje axial la concentración de AGV durante las tres primeras semanas fue estable (<2,000 mg/L). A partir de la cuarta semana se evidencia un aumento en la concentración de AGV en el punto de muestra S1, en el que llegó a alcanzar valores por encima de los 6,000 mg/L lo cual sugiere que en este punto se crearon condiciones adecuadas para los microorganismos que llevan a cabo la etapa acidogénica. Respecto al reactor R3 (Carga = 1.5 kg DQOsustratos/ m³digestor*día), se puede observar que a partir de la segunda semana los AGV aumentaron a concentraciones cercanas a los 4,000 mg/L a lo largo del reactor, esta acumulación de AGV provocó la disminución del pH y por consiguiente la inhibición de las *Archaeas* metanogénicas. Debido a la alta carga orgánica manejada en R3 y al crecimiento de las bacterias que intervienen en el proceso de acidogénesis, se infiere que las *Archaeas* metanogénicas no tuvieron condiciones adecuadas para su desarrollo lo que se deriva en la acidificación e inhibición del proceso de digestión (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017).

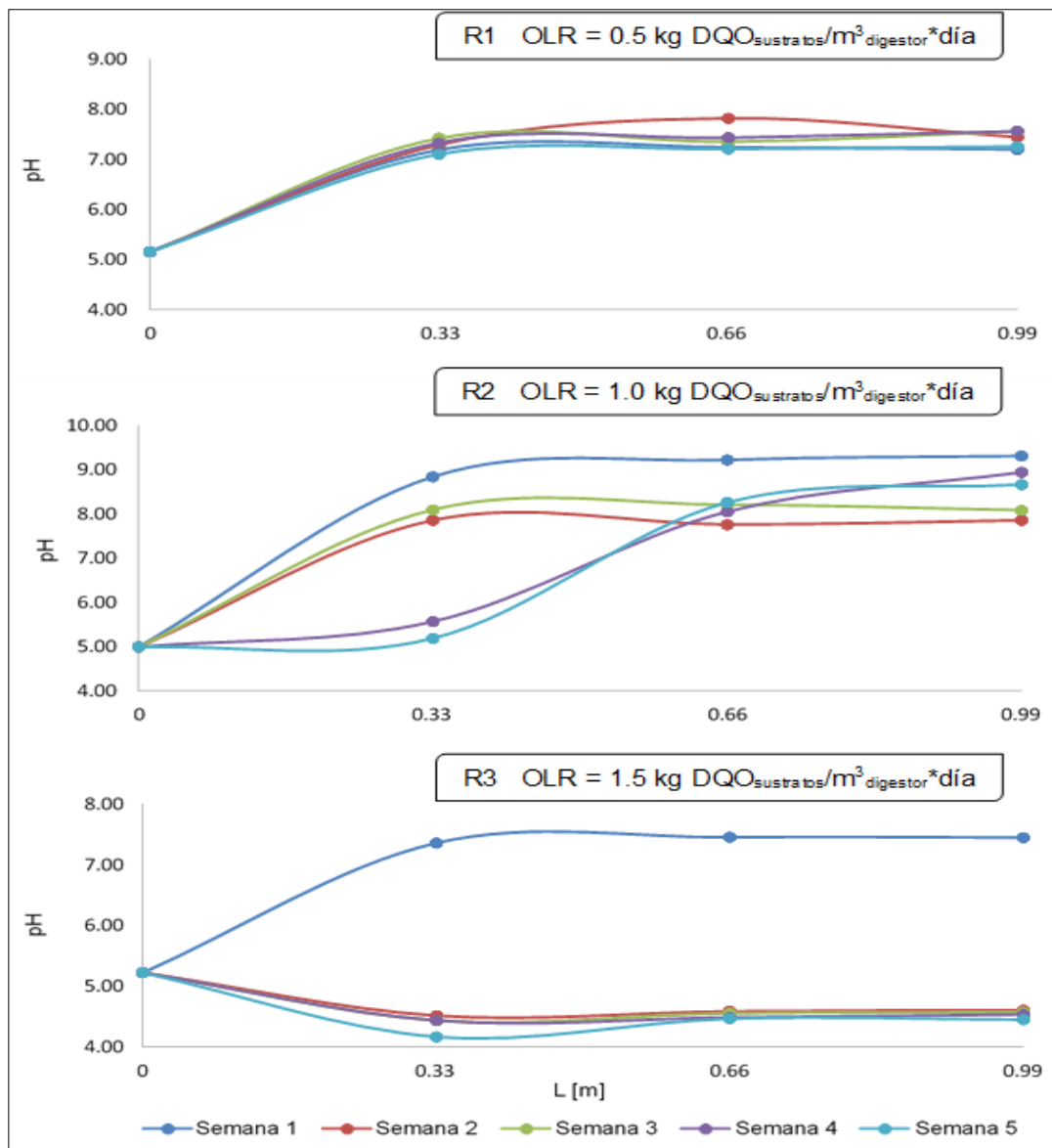


Figura 4. Variación del pH en la dirección axial para cada reactor con su respectiva carga.

Los valores de pH obtenidos para los tres reactores se encuentran en la figura 4. Para el reactor R1 el pH se mantuvo estable y estuvo en 7.36 ± 0.18 a lo largo del reactor durante todo el tiempo de monitoreo, siendo un valor adecuado para la CoDA (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017). El reactor R2 tuvo un comportamiento diferente al de R1. Durante las tres primeras semanas el pH que se mantuvo en 8.36 ± 0.59 a lo largo de todo el reactor, a partir de la cuarta semana en el punto de muestreo S1 se evidencia una disminución notable del pH hasta llegar a

valores aproximados de 5.38 ± 0.22 , esto puede ser debido a la producción de AGV por parte de las bacterias acidogénicas (Constanza-Corrales, Antolinez-Romero, Bohórquez-Macías, Corredor-Vargas, & A.M, 2015). Al analizar los resultados del reactor R3 se observa que a partir de la segunda semana el pH disminuyó considerable (4.48 ± 0.12) y fue muy uniforme durante las demás semanas de monitoreo. La acumulación de AGV conllevó al bajo pH en el reactor R3 y por tanto a la rápida acidificación del medio.

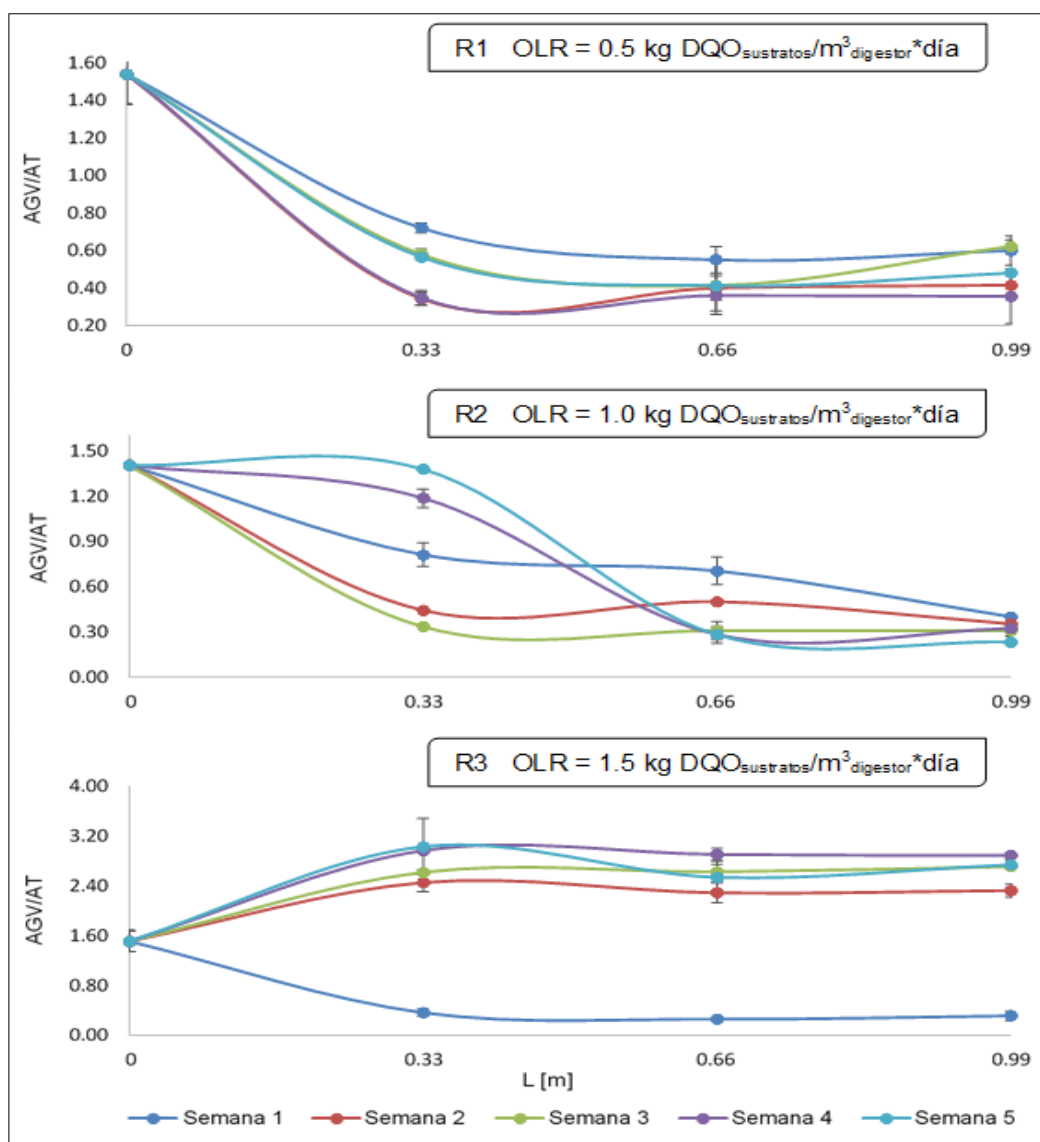


Figura 5. Capacidad buffer (AGV/AT) en la dirección axial para cada reactor con su respectiva carga.

La capacidad buffer (AGV/AT) de los tres reactores a lo largo de las 5 semanas de monitoreo se encuentran en la figura 5. Para el reactor R1 la capacidad buffer se mantuvo en 0.48 ± 0.13 , este valor se encuentra ligeramente por encima del límite indicando que el proceso no está inhibido ($AGV/AT > 0.4$ (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017)). En el reactor R2 la relación AGV/AT mostró un comportamiento diferente: en las primeras tres semanas se mantuvo en 0.46 ± 0.18 , para la cuarta y quinta semana en el punto de muestreo S1 se presentó un aumento, mientras que en los dos puntos restantes (S2 y S3) ocurrió una ligera disminución de este valor a 0.28 ± 0.04 , estos valores se encuentran dentro del rango adecuado para el proceso. Para el reactor R3 la capacidad buffer a partir de la segunda semana estuvo en 2.67 ± 0.27 , medida que se encuentra muy por encima de algunos valores reportados en literatura donde mostró que el proceso no está inhibido en valores por debajo de los 0.4 (Escalante, Castro, Besson, & Jaimes-Estévez, 2017).

Se puede inferir, que en el reactor R2 con carga de $1.0 \text{ kg DQOsustratos/ m}^3\text{digestor}\cdot\text{día}$ existe una separación de fases; en la primera fase ocurre la producción de ácidos grasos volátiles que se lleva a cabo en la hidrólisis y acidogénesis y en la segunda fase se da el consumo de estos AGV en la acetogénesis y metanogénesis (Apéndice A). Esta separación garantiza un mejor crecimiento de las *Archaeas* metanogénicas y por lo tanto una actividad favorable de estos microorganismos ya que necesitan condiciones diferentes a las bacterias acidogénicas (Saddoud, 2007). Esta separación también se evidenció en los estudios de Liu et al., (1997) y Escalante *et al.*, (2017), donde reportaron el proceso de digestión en reactores tubulares con lodos de planta de tratamiento de aguas residuales y de lactosuero, respectivamente.

Los resultados de los análisis discutidos anteriormente se ven reflejados en el comportamiento de la producción de biogás para cada uno de los reactores con diferentes cargas orgánicas (Figura

6). Las mediciones de biogás en operación semi-continua se realizaron diariamente durante 5 semanas.

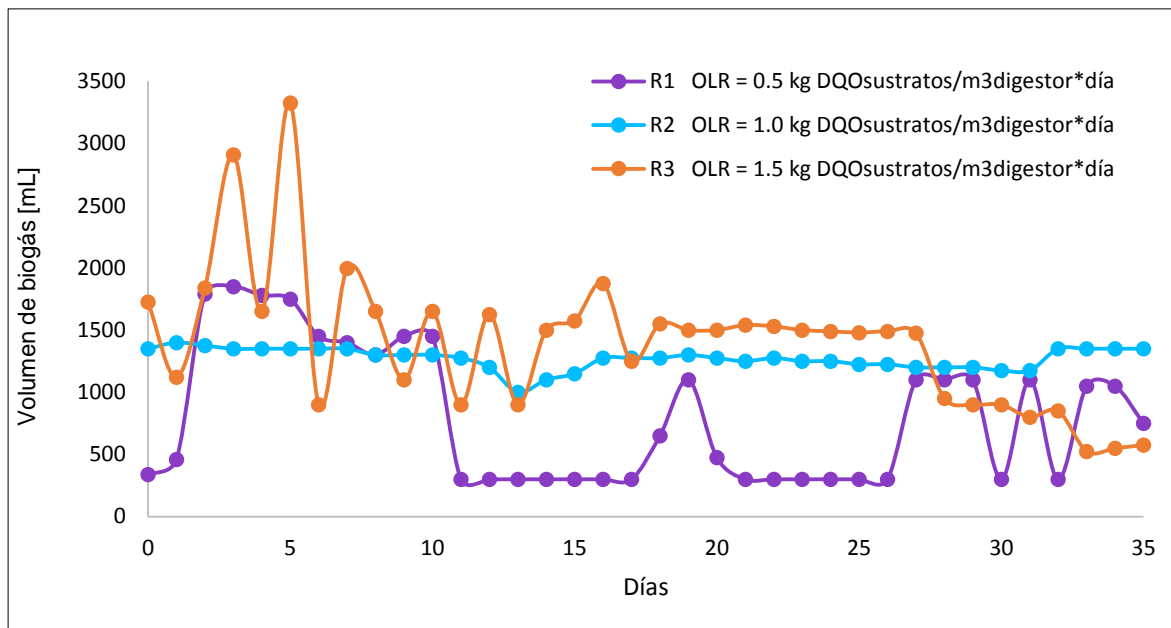


Figura 6. Producción diaria de biogás para cada una de las 3 cargas estudiadas.

El reactor con la menor carga orgánica (R1) presentó una producción promedio de biogás baja (805.4 ± 550.45 mL biogás/d) lo que se puede atribuir a que la carga de alimentación de 0.5 kg DQO/ m^3 digestor*d no generaba suficientes AGV para el consumo y posterior producción de metano.

El reactor R2 tuvo una producción de biogás constante a lo largo del proceso con un promedio de $1,270.1 \pm 85.3$ mL biogás/d, además la baja desviación presente en este caso comprueba el buen funcionamiento de la codigestión como se observa en la figura 6.

R3 tiene una carga más alta, debido a esto, la producción de biogás fue mayor en los primeros cinco días de medición ya que había una gran generación de AGV que podían ser consumidos por las *Archaeas* metanogénicas. Sin embargo, a lo largo del tiempo, la generación de gas fue

disminuyendo notoriamente hasta alcanzar valores por debajo de los 550 mLbiogás/d lo cual concuerda con los resultados de los análisis anteriores que sugieren la inhibición del proceso.

2.2.2.2. *Análisis microbiológico: Actividad metanogénica específica (AME) y poblaciones de Archaeas.* Con el fin de estudiar el comportamiento de las *Archaeas* metanogénicas presentes en el proceso de digestión, se evaluó la actividad metanogénica específica (AME) en la dirección axial de cada digestor (Figura 7). Las mediciones del AME se realizaron en los puntos de muestreo intermedios y en la salida del reactor. Para los 3 reactores en el punto inicial ($L = 0$ m) se tomó la actividad con la que comenzó la digestión en estado semi-continuo ($0.045 \text{ g DQO CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$).

Los resultados de la AME para los reactores R1 y R2, estuvieron entre 0.02 y $0.09 \text{ g DQO CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$ posiblemente porque las *Archaeas* metanogénicas del inóculo (EB estabilizado) se adaptaron al sustrato y al proceso de una manera satisfactoria (Castro, y otros, 2017). Estudios con EB aclimatado a 37°C en un digestor tipo CSTR alcanzaron actividades entre 0.03 y $0.15 \text{ g DQO CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$ (Quintero, Castro, Ortiz, Guzmán, & Escalante, 2012; Alzate & Quintero-Silva, 2017).

Además, se puede notar un comportamiento particular en R2. En la última semana la AME fue de 0.025 y $0.088 \text{ g DQO CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$ para los puntos S1 y S2 respectivamente. Esto sugiere que en el reactor R2 ocurrió una separación de fases.

Para el digestor R3, excluyendo la primera semana, la AME estuvo entre 0.007 y $0.026 \text{ g DQO CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$, estos valores fueron muy bajos teniendo en cuenta que $0.02 \text{ g DQO CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$ es la mínima actividad considerada adecuada para el proceso utilizando EB como inóculo (Astals, 2015).

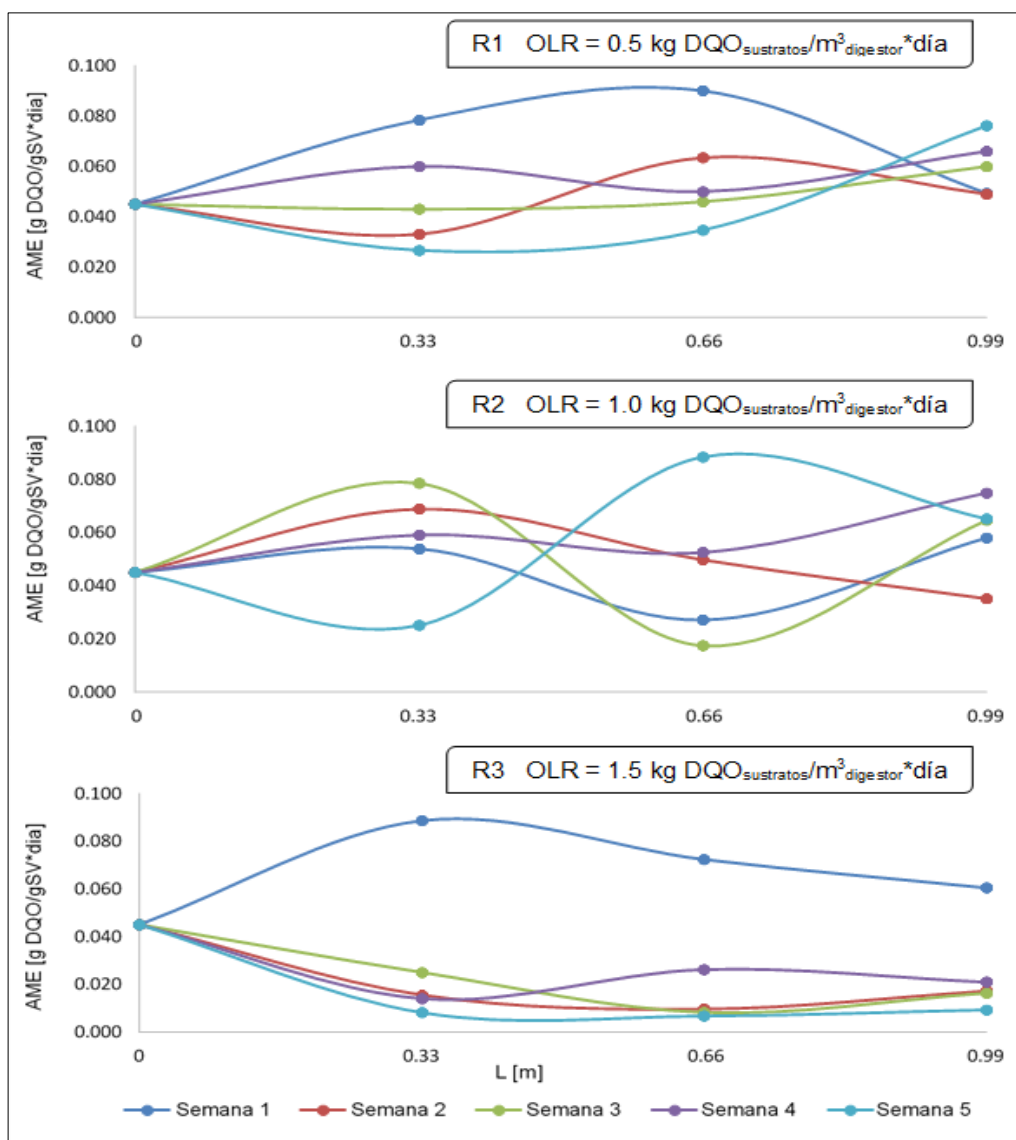


Figura 7. Comportamiento de la actividad metanogénica específica de la DA del LS a lo largo del reactor para tres diferentes cargas (R1, R2, R3).

En la Figura 8 se pueden observar las diversas familias de *Archaeas* encontradas en cada punto de muestreo de los reactores R1, R2 y R3. La *Methanospirillaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanomicrobiaceae* y *Methanobacteriaceae* siguen la ruta hidrogenotrófica y las familias *Methanosarcinaceae* y *Methanosaetaceae* la acetoclásticas. El resto de familias encontradas no intervienen en la producción de metano (Demirel & Scherer, 2008).

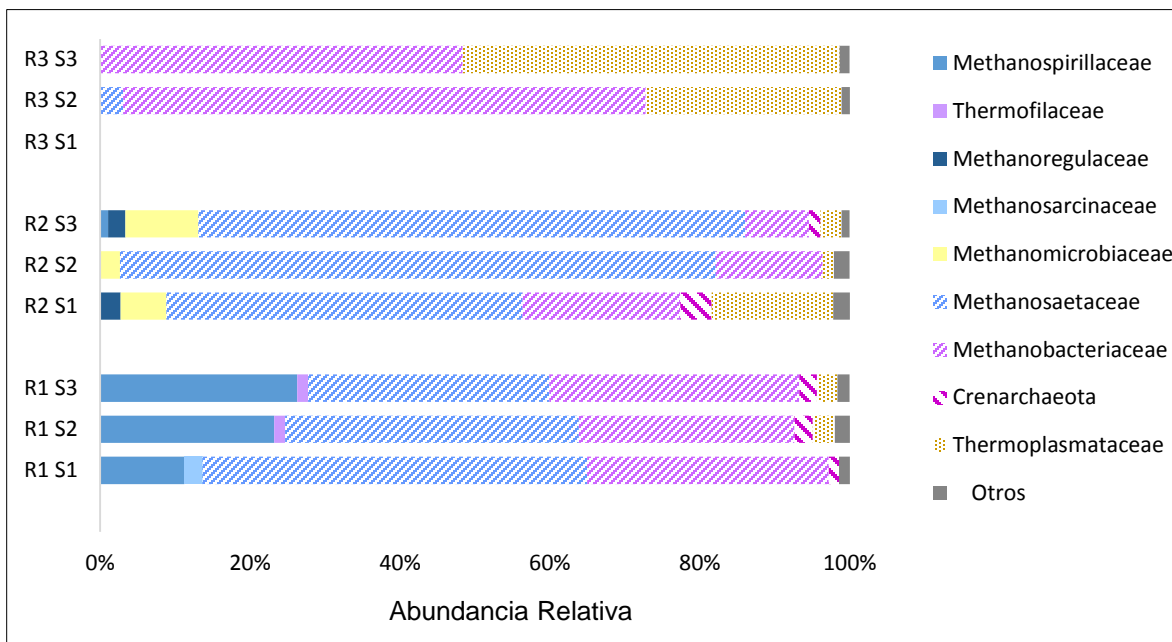


Figura 8. Clasificación taxonómica de *Archaeas* a nivel de familia en cada punto del reactor.

La producción de metano ocurre a partir de dos rutas principales, la primera es la acetoclástica en donde los microorganismos crecen tomando como sustrato acetato (CH_3COO^-) y la segunda la hidrogenotrófica en la cual los microorganismos usan como sustrato hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2) (Constanza-Corrales, Antolinez-Romero, Bohórquez-Macías, Corredor-Vargas, & A.M, 2015).

Tabla 4
Porcentaje de *Archaeas* en R1, R2 y R3 de acuerdo a su ruta de producción de metano.

RUTA		Acetoclástica	Hidrogenotrófica
R1	S1	53.8%	43.4%
	S2	39.2%	52.0%
	S3	32.2%	60.0%
R2	S1	48.0%	30.0%
	S2	80.0%	17.0%
	S3	73.0%	22.0%
R3	S1	0%	0%
	S2	3.08%	70.0%
	S3	0%	48.4%

El reactor R1 presenta las dos rutas bioquímicas en los 3 puntos del reactor en proporciones similares como se muestra en la tabla 4, esto puede ser un indicativo de que las poblaciones microbianas a lo largo del reactor son similares. Lo anterior se puede relacionar con la figura 3 en la cual se muestra un comportamiento muy estable en los AGV en la quinta semana (780 ± 158.7 mg Ac. Acético/L) presentes en R1. Esto se puede atribuir a la baja carga orgánica ($0.5 \text{ kg DQOsustratos/ m}^3\text{digestor}\cdot\text{día}$) alimentada al reactor.

En el reactor R2 se puede observar que el punto S1 presenta menor porcentaje de *Archaeas* que siguen la ruta acetoclástica (48%) en comparación con los otros puntos (S2: 80%; S3: 73%). Esto explica el comportamiento de la figura 7 donde en la quinta semana la AME del R2 en el punto S1 fue menor a los demás puntos. Además, teniendo en cuenta la producción de AGV en la última semana para R2 se puede observar que en el primer punto son elevados mientras que en el segundo y tercer punto tienen valores más bajos probablemente porque la *Methanosaetaceae* esté consumiendo estos ácidos grasos (Chaudhary, Brablcová, Buriánková, & Rulík, 2013). Estos resultados son comparables con estudios anteriores en donde en digestores con bajas concentraciones de amonio (NH_4^+) y AGV la *Methanosaetaceae* fue la familia dominante (Karakashev, Batstone, & Angelidaki, 2005). Esta diferencia entre S1 y los otros puntos indica que se generó una separación de fases que mejora las condiciones de crecimiento para las *Archaeas* en los puntos S2 y S3 (Saddoud, 2007).

Para el reactor R3 en el primer punto S1 las *Archaeas* se encuentran completamente inhibidas debido al bajo pH (4.17 ± 0.1) (Demirel & Scherer, 2008), por esta razón no se presenta resultados de estos en la tabla 4. Para los puntos S2 y S3 se encuentra en mayor proporción la familia *Methanobacteriaceae* debido a que en ausencia de *Methanosaetaceae* la oxidación del acetato a H_2/CO_2 seguido de la generación de metano se realiza por metanógenos hidrogenotróficos siendo

esta la ruta dominante (Demirel & Scherer, 2008). Esto puede ser explicado porque en estos puntos (S2, S3) el pH también es bajo debido a la acumulación de AGV y por lo tanto el medio no es adecuado para el crecimiento de las *Archaeas* acetoclásticas (Ferrer & Pérez, 2010). En estudios anteriores también se observó que cuando hay acumulación de AGV en un proceso de digestión se encuentran familias de *Archaeas* que sigue la ruta hidrogenotrófica (Zamanzadeh, Hagen, Svensson, Linjordet, & Horn, 2016). Aunque la familia *Methanobacteriaceae* está presente en los tres reactores, en R3 es más abundante.

2.3. Monitoreo y recuperación del contenido de nutrientes en forma de estruvita

2.3.1. Contenido de PO_4^{3-} y NH_4^+ presentes en el digerido del proceso de digestión anaeróbica del lactosuero. El comportamiento de la concentración de PO_4^{3-} en la figura 9 (a) podría deberse inicialmente a la liberación de polifosfatos durante el proceso de digestión anaeróbica. Sin embargo, a partir de la segunda semana aumentó la concentración de fosfato para R3 lo cual podría ser explicado por las altas concentraciones de AGV que generaron la lisis celular y por tanto la liberación extra de iones (Señoráns, Barros, García-Toriello, & Garrido, 2011). En este sentido, vale la pena mencionar que la tendencia mostrada por los reactores R1 y R2 es un indicador de que el proceso de digestión se llevó a cabo satisfactoriamente, además al comparar los resultados de concentración de R1 con R2 se puede inferir que este último obtuvo mayor contenido de PO_4^{3-} en el digerido debido a que la carga orgánica benefició al consumo de materia orgánica mejorando la estabilidad del proceso.

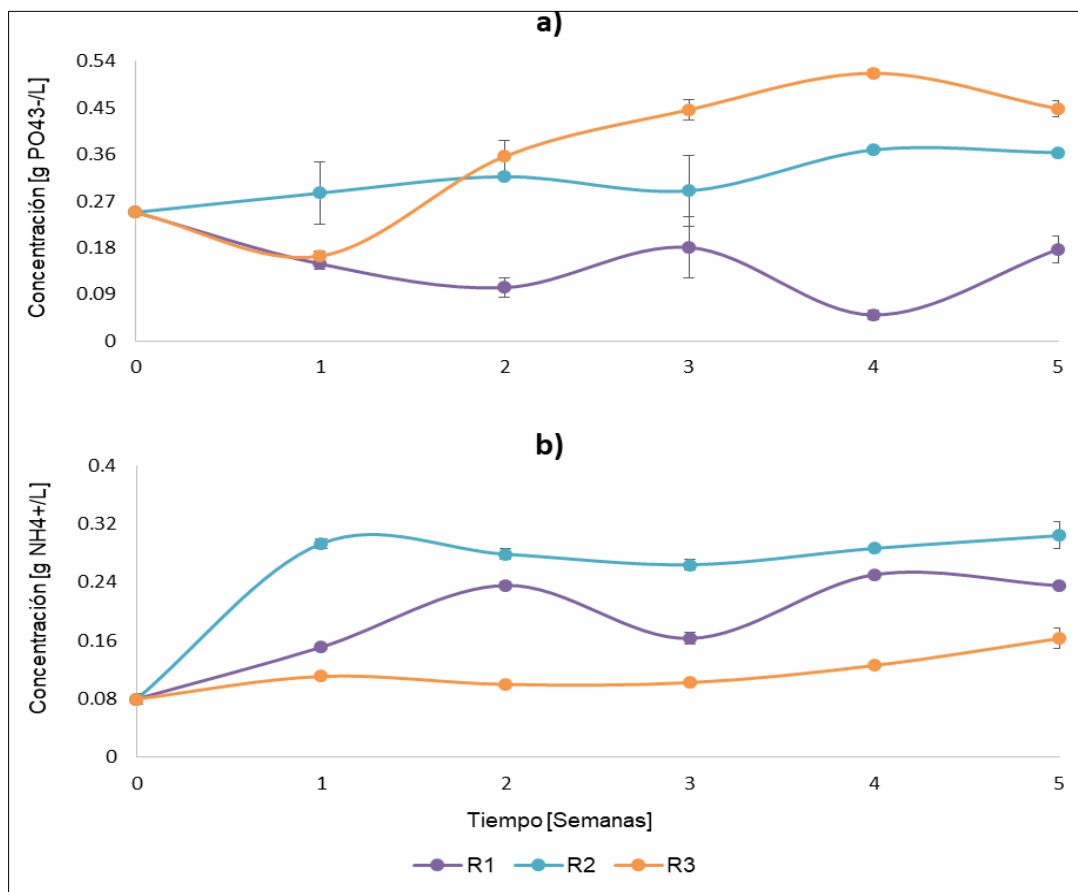


Figura 9. Comportamiento de los iones PO_4^{3-} (a) y NH_4^+ (b) presentes en el digerido del proceso.

La presencia de amonio se atribuye a la mineralización de materia orgánica y es un indicador de estabilidad del proceso. Valores de amonio sobre 1.9 g de NH_4^+ /L, pueden inhibir la actividad de las *Archaeas* metanogénicas (Lansing, Botero, & Martin, 2008). El contenido de amonio permaneció por debajo de los niveles inhibitorios ya que la concentración máxima fue de 0.250 ± 0.0 , 0.29 ± 0.01 y 0.16 ± 0.01 g NH_4^+ /L para R1, R2 y R3 respectivamente como se muestran en la figura 9 (b). Estos resultados pueden ser comparables con estudios anteriores, los cuales reportan valores similares para influentes y efluentes de EB entre 0.26 y 0.24 g NH_4^+ /L en donde el contenido de NH_4^+ estuvo en valores aceptables. (Lansing, Botero, & Martin, 2008).

2.3.2. Recuperación de de PO_4^{3-} y NH_4^+ en forma de estruvita a partir del digerido de la CoDA del lactosuero. En la figura 10 se muestra la caracterización de los digeridos homogenizados de los reactores respecto al PO_4^{3-} , NH_4^+ y Mg^{2+} para el proceso de precipitación de estruvita. Las estrellas corresponden a la proporción de $\text{Mg}^{+2}:\text{PO}_4^{3-}$ presentes en los digeridos.

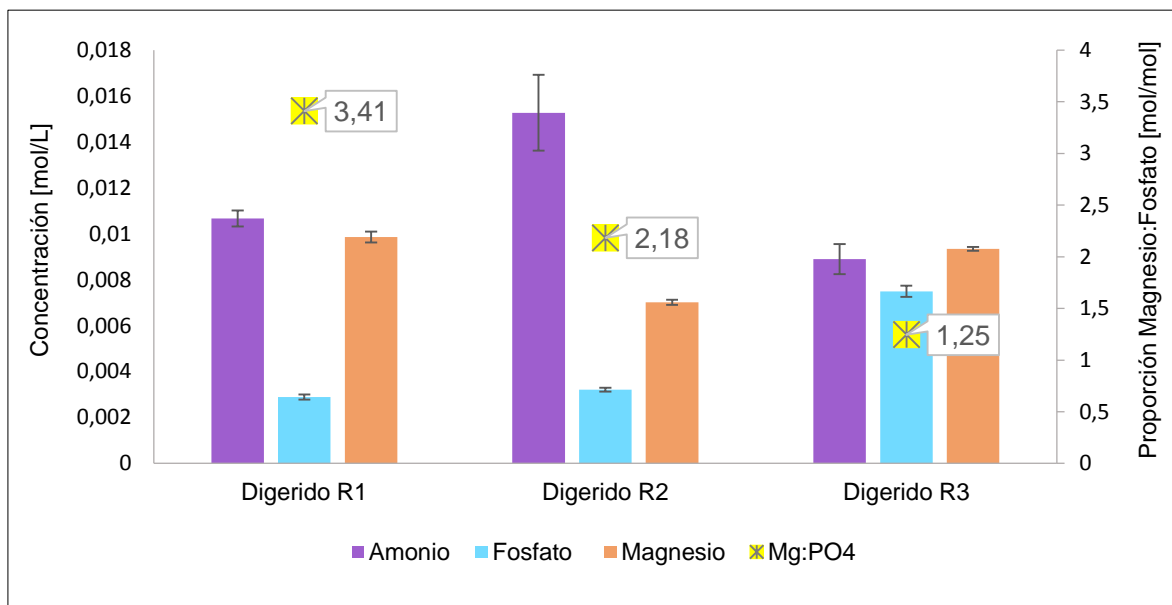


Figura 10. Concentración molar de PO_4^{3-} , NH_4^+ y Mg^{2+} para el digerido homogenizado de los Reactores R1, R2 y R3.

En el grafico se puede notar que los contenidos de fosfato, amonio y magnesio en los tres digeridos fueron en promedio $430.67 \pm 13.67 \text{ mg PO}_4^{3-}/\text{L}$ ($0.004 \pm 0.0001 \text{ mol PO}_4^{3-}/\text{L}$), $209.5 \pm 15.95 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ ($0.011 \pm 0.0008 \text{ mol NH}_4^+/\text{L}$) $212.38 \pm 3.49 \text{ mg Mg}/\text{L}$ ($0.008 \pm 0.0015 \text{ mol Mg}/\text{L}$) respectivamente. Desde un punto de vista microbiológico, estas concentraciones son adecuadas, puesto que valores superiores a $400 \text{ mg Mg}/\text{L}$ limitan la tasa de crecimiento de las *Archaeas* metanogénicas (Schmidt & Ahring, 1993). Relaciones de $\text{Mg}:\text{PO}_4^{3-}$ mayores a $1.5 \text{ mol Mg}/\text{mol PO}_4$ son consideradas como favorables (Pastor, Marti, Bouzas, & Seco, 2018). El reactor R3 tuvo una relación menor a 1.5 por lo tanto fue necesario adicionar MgCl_2 para alcanzar el

óptimo. En este sentido, es interesante mencionar que la disponibilidad de nutrientes para la precipitación de estruvita en la CODA de LS:EB se ve influenciada por la estabilidad del proceso.

Con el fin de conocer los porcentajes de recuperación de fósforo, se midió la concentración de este antes y después de la precipitación. Los resultados obtenidos se poder ver en la figura 11.

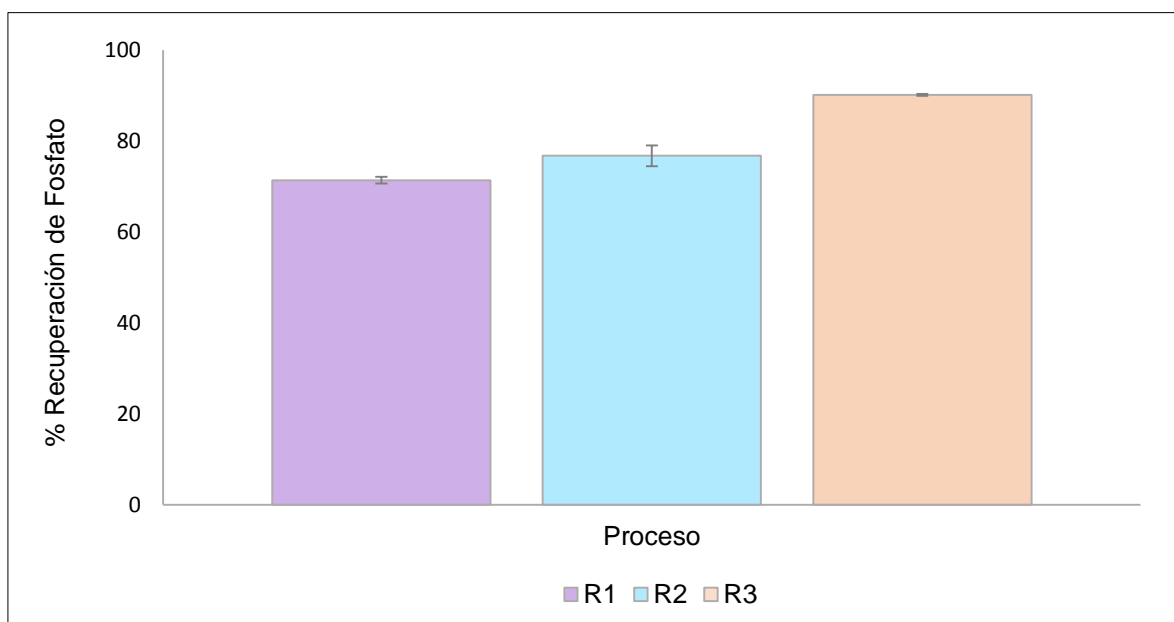


Figura 11. Porcentajes de recuperación de fosfato a partir de cada uno de los digeridos de los reactores R1, R2 y R3.

La recuperación de fosfato estuvo entre el 71 y 90 %. Estos resultados son comparables con otros estudios de precipitación de estruvita donde se obtuvieron porcentajes de recuperación de fosfato entre el 70 y 90 % (Señoráns, Barros, García-Toriello, & Garrido, 2011). Se puede observar una relación entre la concentración de fosfato en la fracción líquida del digerido y el porcentaje de recuperación ya que al ver la tendencia de la figura 11 y la concentración de fosfato en la figura 10 se podría inferir que la facilidad con que se remueve el fosfato depende de la disposición del mismo.

2.3.3. Análisis cualitativos de los precipitados: espectroscopia infrarroja y microscopia. La figura 12 muestra el espectro infrarrojo de los precipitados obtenidos en los diferentes experimentos mediante la transformada de Fourier, utilizando un infrarrojo FTIR-8400S.

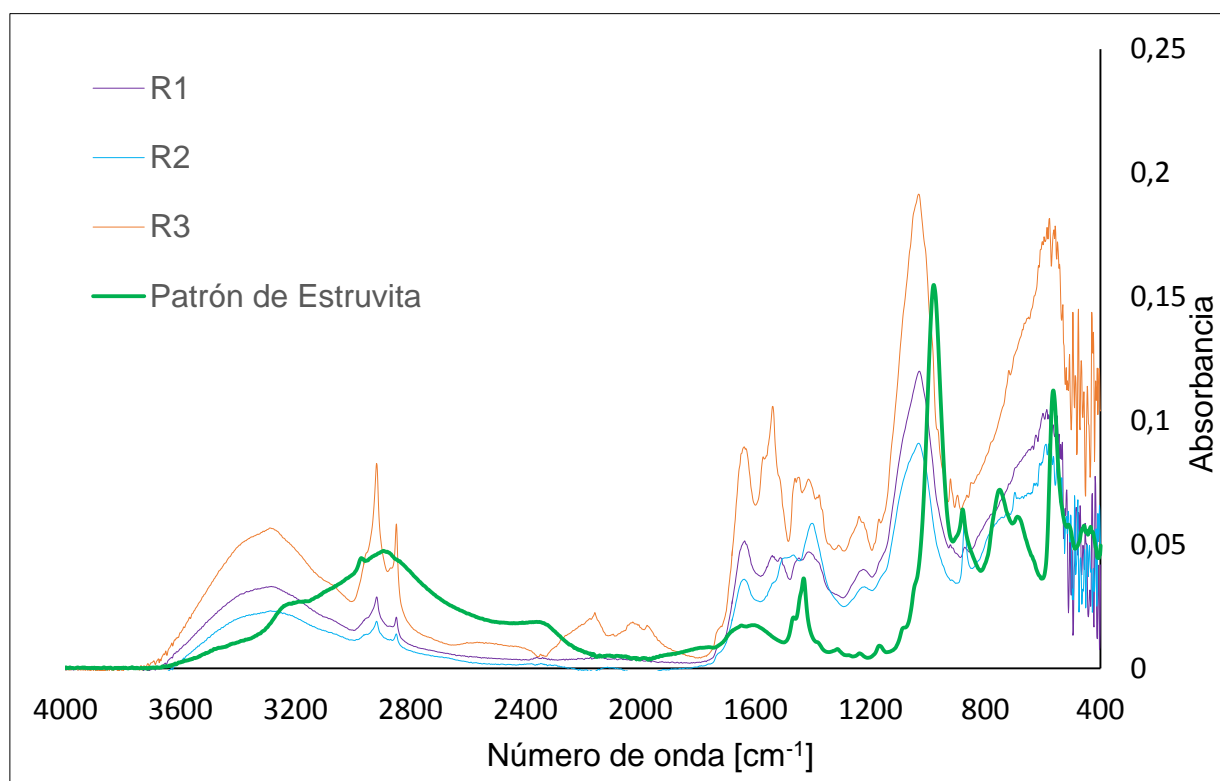


Figura 12. Espectroscopia infrarroja para cada uno de los precipitados obtenidos a partir del digerido de R1, R2 y R3 y la espectroscopia del patrón de estruvita (Adaptado de Stefov *et al.*, (2005)).

El espectro muestra las bandas de absorción que corresponden a los diferentes elementos o compuestos presentes en el cristal. Las absorciones que se producen en 461 ± 1 y 691 ± 1 cm^{-1} se deben al enlace metal-oxígeno (Mg-O), las que tienen lugar en 511 ± 2 ; $1,010 \pm 1$ y $1,083 \pm 2$ cm^{-1} corresponden a los iones PO_4^{3-} y las absorciones en $2,854 \pm 1$ y $2,925 \pm 1$ cm^{-1} se deben al ion NH_4^+ . Lo que se observa en el rango de 3,240 a 3,529 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento O-H y N-H lo cual sugiere la presencia de agua de hidratación. Estos resultados

concuerdan con estudios anteriores de estruvita los cuales mostraron absorciones de NH_4^+ (2,920.9; 2,970 y 2,889.26 cm^{-1}), PO_4^{3-} (570; 1,000 y 1,070 cm^{-1}), Mg^{2+} (683.97 y 509.4 cm^{-1}) y H_2O (3,275.6 a 3,521.5 cm^{-1}) valores muy cercanos a los precipitados encontrados (Chauhan, Joseph, Parekh, & Joshi, 2008; Kurtulus & Tas, 2011; Muryanto, Sutanti, & Kasmiyatun, 2016; Rouff, Lager, Arrue, & Jaynes, 2018). Además, al comparar los espectros obtenidos con un patrón de estruvita (Curva verde) se puede confirmar la obtención de esta. Las diferencias entre los espectros pueden ser justificados por la presencia de impurezas como compuestos orgánicos contenidos en los precipitados (Stefov, Soptrajanov, Kuzmanovski, Lutz, & Engelen, 2005).

En la figura 13 se muestran los ensayos de microscopía que se le realizaron a los precipitados de los reactores.

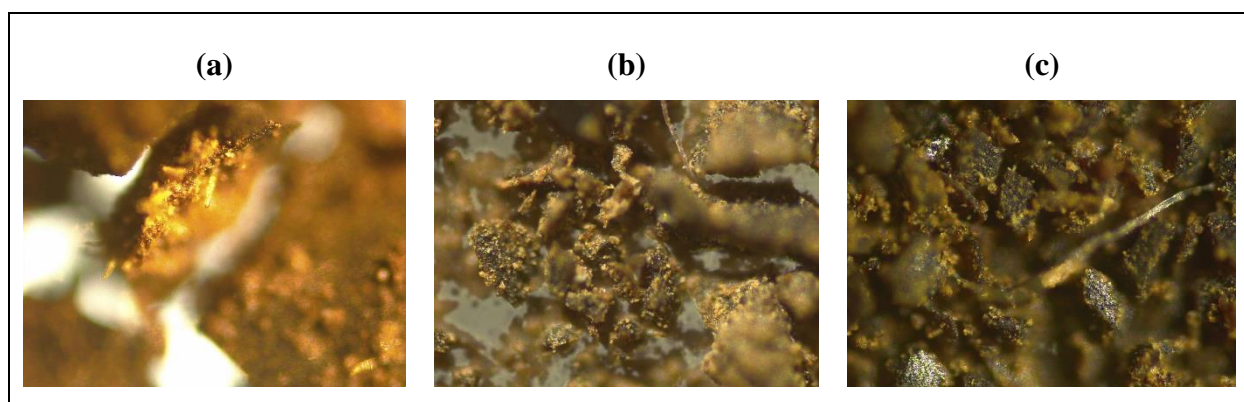


Figura 13. Micrografías de la estruvita precipitada para R1 (a), R2 (b) y R3 (c) con zoom de 10X.

En este análisis se evidenció la presencia del precipitado sólido donde la forma de los cristales no fue uniforme. Estudios realizados del crecimiento de ES muestran que ésta podría presentarse en diferentes morfologías como tipo cajón, tipo piramidal, tipo prismático, tipo aguja, forma de pluma, etc. (Chauhan & Joshi, 2013) que dependen fuertemente de los parámetros de crecimiento.

3. Conclusiones

Se desarrolló el proceso de codigestión del lactosuero y estiércol bovino y se comprobó que en un reactor tubular con carga orgánica de $1.0 \text{ kg DQO}_{\text{sustratos}}/\text{m}^3_{\text{digestor}} \cdot \text{día}$ se obtienen las mejores condiciones para producir $1,270.1 \pm 85.3 \text{ mL biogás/d}$ y recuperar el 77% de PO_4^{-3} del digerido, Además, ocurre una estratificación del consorcio microbiano que se puede ver desde el punto de vista bioquímico con el consumo y producción de AGV y desde el punto de vista microbiológico con la adaptación satisfactoria de las *Archaeas* acetoclásticas en la segunda parte del reactor. Esto es idóneo para un sustrato ácido como el lactosuero.

Referencias Bibliográficas

RDP . (30 de September de 2016). Obtenido de <https://rdp.cme.msu.edu/>

Alzate, M., & Quintero-Silva, M. (2017). Caracterización de grupos tróficos durante un proceso de digestión anaerobia con lodo estiércol bovino usando un método de bajo costo. *ION*.

Angelidaki, I., Karakashev, D., Batsone, D. J., Plugge, C., & Stams, A. J. (2011). Biomethanisation and its potential. *Methods in Enzymology*, 494, 328-347.

APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and waste water APHA*. Washington: APHA.

Astals, S. B. (2015). Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Research*, 208–215.

Astals, S; Ariso, M; Galí, A; Mata-Alvarez, J. (2011). Co-digestion of pig manure and glicerine: Experimental and modelling study. *Journal of Environmental Management*, Vol 92 (4), 1091-1096.

Bertin, L., Grilli, S., Spagni, A., & Fava, F. (2013). Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. *Bioresource Technology*, 128, 779-783.

Brown, N., Güttler, J., & Shilton, A. (2016). Overcoming the challenges of full scale anaerobic co-digestion of casein whey. *Renowable energy*, 96, 425-432.

- Cámara, K., & Laines, J. (2011). La digestión anaerobia y la bioquímica. *Revista de divulgación. División académica de ciencias biológicas*, 32, 89-95.
- Castro, L., Escalante, H., Jaimes-Estévez, J., Díaz, L., Vecino, K., Rojas, G., & Mantilla, L. (2017). Low cost digester monitoring under realistic conditions: Rural use of biogas and digestate quality. *Bioresource Technology*, 239, 311-317.
- Chaudhary, P. P., Brablcová, L., Buriánková, I., & Rulík, M. (2013). Molecular diversity and tools for deciphering the methanogen community structure and diversity in freshwater sediments. *Microbial Biotechnol*, 97(97), 7553-7562.
- Chauhan, C. K., & Joshi, M. J. (2013). In vitro crystallization, characterization and growth-inhibition study of urinary type struvite crystals. *Journal of crystal growth*, 362, 330-337.
- Chauhan, C., Joseph, K., Parekh, B., & Joshi, M. (2008). Growth and characterization of struvite crystals. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 46 , 507-512.
- Cirne, D., Paloumet, X., Björnsson, L., Alves, M., & Mattiasson, B. (2007). Anaerobic digestion of lipid-rich waste—effects of lipid concentration. *Renewable energy*, 32(6), 965-975.
- Constanza-Corrales, L., Antolinez-Romero, D., Bohórquez-Macías, J., Corredor-Vargas, & A.M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13 (23), 55-81.
- Conti, J., Ceriani, M., Juliarena, M., & Estaban, E. (2012). Perfil proteico y peptídico de una base fluida para bebidas funcionales obtenidas por fermentación de lactosuero. *Información Tecnológica*, 23(2), 61-70.

- Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* , 7, 173–190 .
- Escalante, H., Castro, L., Amaya, M., Jaimes, L., & Jaimes-Estévez, J. (2018). Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. *Waste Management*, 71, 711-718.
- Escalante, H., Castro, L., Besson, V., & Jaimes-Estévez, J. (2017). Feasibility of the anaerobic digestion of cheese whey in a Plug Flow Reactor (PFR) under local conditions. *Ingeniería Investigación y Tecnología, volumen XVIII*, 3, 265-277.
- Fernández, C., Cuetos, M., Martínez, E., & Gómez, X. (2015). Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. *Biomass and Bioenergy*, 81, 55-62.
- Fernández, C., Martínez, E., Morán, A., & Gómez, X. (2016). Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. Revisión bibliográfica. *Revista ION*, 29(1), 47-62.
- Ferrer, Y., & Pérez, H. (enero-abril de 2010). Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás. Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el rendimiento. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 43(1), 9-20.
- García, C., Arrázola, G., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11(1), 136-143.

- Garfí, M., Martí-Herrero, J., Garwood, A., & Ferrer, I. (2016). Household anaerobic digesters for biogas production in Latin America: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *60*, 599–614.
- Hidalgo, M. D. (1 de Octubre de 2014). *FururEnviro*. Recuperado el 2017, de <http://futurenviro.es/pdf/articulos/2014-10/6-FuturENVIRO-October-2014-.pdf>
- Kalyuzhnyi, S., Perez Martinez, E., & Rodriguez Martinez, J. (1997). Anaerobic treatment of high-strength cheese-whey wastewaters in laboratory and pilot UASB-reactors. *Bioresource Technology* (*60*), *1*, 59-65.
- Karakashev, D., Batstone, D., & Angelidaki, I. (2005). Influence of Environmental Conditions on Methanogenic Compositions in Anaerobic Biogas Reactors. *Appl Environ Microbiol*, *71*(1), 331–338.
- Kurtulus, G., & Tas, A. (2011). Transformations of neat and heated struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). *Materials Letters*, *65*, 2883-2886.
- Lansing, S., Botero, R. B., & Martin, J. F. (2008). Waste treatment and biogas quality in small-scale agricultural digesters. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5881-5890.
- Lebrato, J., Pérez Rodríguez, J., Maqueda, C., & Morillo, E. (1990). Cheese factory wastewater treatment by anaerobic semicontinuous digestion. *Resources, Conservation and Recycling*, *volume 3, issue 4*, 193-199.
- Liu, T., & Ghosh, S. (1997). Phase separation during anaerobic fermentation of solid substrates in an innovative plug flow reactor. *Water Sciences Technology*, *36* (6), 303-310.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540-555.

Martí-Herrero, J. (s.f.). *IDEASS AMÉRICA LATINA Innovación para el Desarrollo y la Cooperación Sur-Sur*. Recuperado el 2018, de <http://www.ideassonline.org/public/pdf/BrochureBiodigestoresESP.pdf>

Martí-Herrero, J., & Cipriano, J. (2012). Design methodologic for low cost tubular digesters. *Bioresource Technology*, 108, 21-27.

Motta-Correa, Y., & Mosquera, W. (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA*, 13(1), 81-91.

Muñi, A., Paez, G., Faría, J., Ferrer, J., & Ramones, E. (.2005). EFICIENCIA DE UN SISTEMA DE ULTRAFILTRACIÓN/NANOFILTRACIÓN TANGENCIAL EN SERIE PARA EL FRACCIONAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DEL LACTOSUERO. *Revista científica*, XV(4), 361-367.

Muryanto, S., Sutanti, S., & Kasmiyatun, M. (2016). Inhibition of struvite crystal growth in the presence of herbal extract orthosiphon aristatus BL.MIQ. *MATEC Web of Conferences*, 18, 1-5.

Namsree, P., Suvajittanont, W., Puttanlek, C., & Rungsardthong, V. (Noviembre de 2012). Anaerobic digestion of pineapple pulp and peel in a plug flow reactor. *Journal of Environmental Management*, 110, 40-47.

- Neshata, S., Mohammadia, M., Najafpoura, G., & Lahijanib, P. (2017). Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 308-322.
- Pastor, L., Marti, N., Bouzas, A., & Seco, A. (2018). Sewage sludge management for phosphorus recovery as struvite in EBPR wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* (99), 11, 4817-4824.
- Pinto, A. (22 de Septiembre de 2017). *Agronegocios e industria de alimentos*. Recuperado el Marzo de 2018, de ANeIA: <https://agronegocios.uniandes.edu.co/2017/09/22/sector-lechero-en-colombia-potencial-desperdiciado/>
- Poggio, D., Paiva-Prado, M., Ferrer-Martí, I., & Velo, E. (Enero de 2010). *Biodigestores de Bajo Coste para Climas Andinos*. Recuperado el 2018, de <https://www.researchgate.net/publication/43647418>
- Poh, P. E., & Chong, M. F. (2009). Development of anaerobic digestion methods for palm oil mill effluent (POME) treatment. *Bioresource technology*, 100(1), 1-9.
- 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*, Vol 108, 8-13.
- Rico, C., Muñoz, N., & Rico, J. (2015). Anaerobic co-digestion of cheese whey and the screened liquid fraction of dairy manure in a single continuously stirred tank reactor process: Limits in co-substrate ratios and organic loading rate. *Bioresource Technology*, 189, 327-333.

- Rodríguez, C. F. (2014). SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA QUESERA Y FORMAS DE APROVECHAMIENTO. *Obtención de Biogás e hidrógeno*, 10-15.
- Rouff, A., Lager, G., Arrue, D., & Jaynes, J. (2018). Trace elements in struvite equine enteroliths: Concentration, speciation and influence of diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45, 23-30.
- Saddoud, A. H. (2007). Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource Technology*, Volume 98 , 2102-2108.
- Schmidt, J., & Ahring, B. (1993). Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Enzyme and microbial technology*, 15(4), 304-310.
- Señoráns, L., Barros, S., García-Toriello, G., & Garrido, J. (2011). Recuperación de fósforo mediante cristalización de estruvita en efluente de industria de productos congelados marinos. *Research Gate*.
- Shah, F., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I., & Shah, M. (2015). Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 627-642.
- Stefov, V., Soptrajanov, B., Kuzmanovski, I., Lutz, H., & Engelen, B. (2005). Infrared and Raman spectra of magnesium ammonium phosphate hexahydrate (struvite) and its isomorphous analogues. III. Spectra of protiated and partially deuterated magnesium ammonium phosphate hexahydrate. *Journal of Molecular Structure* (752), 1-3, 60-67.

- Stolzenburg, P., Capdevielle, A., Teychené, S., & Biscans, B. (2015). Struvite precipitation with MgO as a precursor: Application to waste water treatment. *Chemical Engineering Science*, 133, 9-15.
- Vannecke, T., Lampens, D., Ekama, G., & Volcke, E. (2015). Evaluation of the 5 and 8 pH point titration methods for monitoring anaerobic digesters treating solid waste. *Environmental Technology*, 36:7, 861-869.
- Yang, K., Yu, Y., & Hwang, S. (2003). Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. *Water Research*, volume 37, issue 10, 2467-2477.
- Zamanzadeh, M., Hagen, L., Svensson, K., Linjordet, R., & Horn, S. (2016). Anaerobic digestion of food waste e Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Research*, 96, 246e254.
- Zhang, B., Zhang, L., Zhang, S., Shi, H., & Cai, W. (2005). The influence of pH hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. *Environmental Technology*, volume 26, 3, 329-339.
- Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., & Tan, T. (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 383-392.
- Zhao, Q., Zhang, T., Frear, C., Bowers, K., Harrison, J., & Chen, S. (2010). Phosphorous Recovery Technology in Conjunction with Dairy Anaerobic Digestion. *Climate Fiendly Farming*, 1, 1-34.

Zhao, Q., Zhang, T., Frear, C., Bowers, K., Harrison, J., & Chen, S. (2010). Phosphorous Recovery Technology in Conjunction with Dairy Anaerobic Digestion. *Climate Friendly Farming*, 1, 1-34.

Apéndices

Apéndice A. Bioquímica de la digestión anaeróbica.

La digestión anaeróbica (DA) es un proceso bioquímico en donde la materia orgánica en ausencia de oxígeno y con ayuda de un consorcio de bacterias específicas, se degrada y forma un biogás y un digerido. La DA se caracteriza por tener fases consecutivas que se pueden diferenciar a lo largo del proceso de la degradación del sustrato en el cual intervienen grandes poblaciones de microorganismos, estas fases son: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (figura A1).

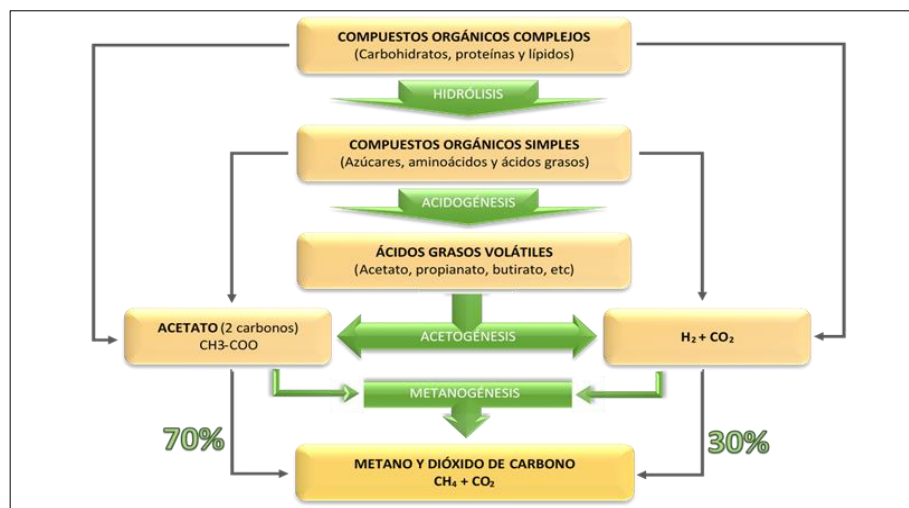


Figura A1. Fases de la digestión anaeróbica

La hidrólisis generalmente es considerada como la etapa limitante de la DA ya que las enzimas hidrolíticas se deben absorber sobre toda la superficie del sustrato (Zhang, Su, Baeyens, & Tan, 2014), en la hidrólisis ocurre la degradación de los compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, lípidos y proteínas), estos son despolimerizados por la acción de enzimas

hidrolíticas y de las bacterias fermentadoras en azúcares, aminoácidos y ácidos grasos (Neshata, Mohammadia, Najafpoura, & Lahijanib, 2017) ya que la materia orgánica polimérica no puede ser utilizada directamente en los microorganismos a menos de que estos se hidrolicen (Zhang, Su, Baeyens, & Tan, 2014). En la acidogénesis estas mismas bacterias fermentadoras transforman los monosacáridos obtenidos anteriormente en ácidos grasos volátiles principalmente (Etapa de Producción de AGV) (Cámara & Laines, 2011). En la acetogénesis, las bacterias acetogénicas toman los AGV y los transforman en acetato, propionato y butirato, además de CO₂ y H₂. En la etapa final, el metano es producido por dos grupos de metanógenos; las *Archaeas* Acetoclásticas que consumen el acetato como sustrato y las *Archaeas* Hidrogenotróficas que usan como sustrato el H₂ para formar metano (Etapa de Consumo de AGV) (Constanza-Corrales, Antolinez-Romero, Bohórquez-Macías, Corredor-Vargas, & A.M, 2015).

Apéndice B. Caracterización completa del lactosuero.

Tabla B1.

Caracterización del lactosuero

Parámetro	Valor	Unidades
DBO	79,900	mg O ₂ /L
N (Total)	1,210.23	mg N/L
C Orgánico Total	13,880	mg C/L
Amonio	67.23	mg N/kg
Carbohidratos	55.33	%
Proteínas	23	%
Lípidos	1.92	%
pH	3.78	
DQO	53	g/L
ST	42	g/L
SV	7.7	g/L
ST	55.1	g/L
DQO	57.5	g/L
T KJELDAHL N	1.2	g/L
T P	0.2	g/L
Fórmula Empírica	C ₄₇ H ₄₄ O ₂₀ N ₂	
C/N	22.1	
PBM	17.1	(L CH ₄ / kg)

Fuente: Laboratorio de Biotecnología. Escuela de Ingeniería Química (UIS)

Apéndice C. Caracterización fisicoquímica del digerido.

Tabla C1

Caracterización fisicoquímica del digerido

Parámetro	Valor (g/kg muestra)	Técnicas Utilizadas
Potasio Total	1.58	NTC 202 Emisión
Magnesio Total	0.31	NTC 1369 Absorción Atómica
Fósforo Total	0.29	NTC 234 Colorimetría
Nitrógeno Total	0.55	SUMA DE NITROGENOS
Calcio Total	0.88	NTC 1369 Absorción Atómica
S-SO ₄	0.36	NTC 1154 Turbidimetría
N-NH ₄	96	NTC 211 Destilación
N-NO ₃	<0.01	NTC 209 Devarda
Mg ²⁺	0.15	NTC 1369 Absorción Atómica
P-PO ₄	128	NTC 234 Colorimetría
Sodio	0.38	NTC 1146 Emisión
Cloruros	0.28	LBC 42 Volumetría
Carbonatos (CO ₃)	< 9.8x10 ⁻⁵	LBC 51 Volumetría
Bicarbonatos(HCO ₃)	1.83	LBC 51 Volumetría
Aluminio	0.02	LBC 79 Colorimetría
P-H ₂ PO ₄	0.25	LBC 234 Colorimetría
Lípidos (Grasas)	1.97	LBC 50 Gravimetría
Proteínas	3.46	LBC 150 Kjeldahl
Carbohidratos	8.51	Cálculo
K ₂ O Total	1.90	NTC 202 Emisión
CaO Total	1.24	NTC 1369 Absorción Atómica
P ₂ O ₅ Total	0.67	NTC 234 Colorimetría

Fuente: Laboratorio de Biotecnología. Escuela de Ingeniería Química (UIS)

Apéndice D. Determinación de la actividad metanogénica.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

Procedimiento simplificado de metodología para la determinación de la actividad metanogénica específica sugerido por Astals, *et al.*, (2015)

Equipos:

- ✓ Botella de vidrio de 120 o 160 ml, agrafe de aluminio y tapón de butilo (por muestra).
- ✓ Balanza de precisión capaz de ponderar 310 g con un error de ± 0.01 g
- ✓ 1 micropipeta
- ✓ Incubadora con temperatura controlada a 35 ± 1 ° C.
- ✓ Solución de NaOH 0.5N

Sólidos volátiles:

- ✓ Crisoles
- ✓ Probeta de 25 ml
- ✓ Horno ajustado a 103 ° C
- ✓ Mufla ajustada a 550 ° C.
- ✓ Desecador con gel de sílice.

Reactivos y materiales:

- ✓ Agua destilada.
- ✓ Solución madre de acetato de sodio (200 g de acetato L-1). Disuelva 69.47 g de acetato de sodio anhidro en un matraz volumétrico de 0.25 l. Mezcle bien con un agitador magnético.

- ✓ Dilución de inóculo.

Fundamento:

- 1) Determine la concentración de SV del inóculo y dilúyalo para alcanzar una concentración sólidos volátiles de 10 g VS L-1 aproximadamente. Se recomienda que anaeróbico.
- 2) Acondicionamiento del inóculo. El inóculo debe almacenarse en una incubadora de control de temperatura a 35 ° C durante 20 - 30 horas antes de comenzar el experimento.
- 3) Determine la concentración de SV del inóculo acondicionado, ya que esto es el valor que se utilizará para los cálculos específicos de actividad metanogénica.

Procedimiento:

- 1) Agregue, por volumen de adición o ponderación, la cantidad requerida de agua destilada hasta alcanzar los 10 g SV/ L del inóculo.
- 2) Pese 99.0 ± 0.1 g de inóculo diluido (10 g VS L-1) en una botella de 100ml.
- 3) Agregue 1 ml de la solución madre de acetato de sodio.
- 4) Agite y mida el pH del contenido de la botella.
- 5) Enjuague el espacio superior de la botella con gas inerte (por ejemplo, 99.99% de N₂, 80/20% de N₂ / CO₂, 99.99% de He).
- 6) Selle las botellas con un tapón de butilo y agrafes de aluminio.
- 7) Coloque las botellas en la incubadora de temperatura controlada en condiciones mesófilas. (35 ± 1°C)
- 8) Mida la producción de metano en aproximadamente 0.5, 1.0 y 1.5 días, después del comienzo del ensayo. Aunque el tiempo sugerido es aplicable para la mayoría de los

procesos de digestión, el tiempo de medición se puede acortar (0.25, 0.5 y 1 día) para muestras muy activas o extendidos (1, 2 y 3 días) para muestras poco activas.

- 9) Trace la producción acumulada de metano específico en base a DQO ($\text{g DQO}/\text{SV}_{\text{inóculo}}$) en el curso de tiempo. Recuerde que 350 ml de metano en condiciones estándar (0°C , 1 bar) es 1 gramo de DQO.
- 10) Determine la pendiente y la incertidumbre de la zona lineal.

Apéndice E. Método de desplazamiento alcalino.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉTODO DE DESPLAZAMIENTO ALCALINO

Materiales

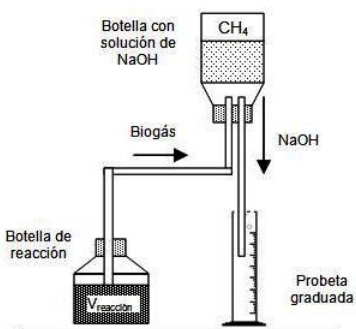
- ✓ Una manguera larga con regulador de flujo y agujas hipodérmicas en cada extremo.
- ✓ Una manguera corta con aguja en un solo extremo.
- ✓ Una botella de vidrio con 500 mL de NaOH con fenolftaleína y pH mayor a 12.
- ✓ Un soporte metálico para la botella y una probeta.

Procedimiento:

- 1) La botella con NaOH se sujeta al soporte con la tapa hacia abajo. En el tapón de butilo que tiene la botella, introducir la aguja de la manguera corta. Debajo de esta manguera, ubicar la probeta.
- 2) Introducir una aguja de la manguera larga en el tapón de la botella con NaOH, asegurándose previamente que el regulador de flujo esté cerrando el paso del aire. La aguja del otro extremo se introduce en el tapón del biorreactor.
- 3) Deslizar el regulador de flujo de la manguera larga, para permitir el paso del biogás del biorreactor hacia la botella con solución alcalina.
- 4) El CO_2 del biogás reacciona con el NaOH y queda atrapado en la solución. El CH_4 no reacciona con la solución y pasa hasta la parte superior de la botella, desplazando un

volumen equivalente de solución alcalina, la cual sale por la manguera corta hasta la probeta. Se apunta el volumen desplazado en mL.

Esquema del montaje de medición del volumen de metano.



Cálculos

A fin de comparar la producción de biogás y por tanto el redimiendo, es necesario llevar el volumen de biogás a condiciones normalizadas -VNTP-, con la siguiente ecuación:

$$VNTP = V \frac{(P_{atm} - P_v) * T_0}{P_o * T}$$

En donde:

VNTP = Volumen de gas en condiciones normales de temperatura y presión (mL)

V = Volumen de gas generado (mL)

P_o= Presión estándar 1013.25 (mbar)

T_o= Temperatura estándar 273.15 (K)

P_{atm} = Presión atmosférica

P_v = Presión de vapor del agua (mbar)

T = Temperatura al momento de medir (K)

Apéndice F. Protocolo de precipitación de ES.

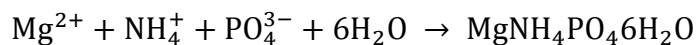
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

PROTOCOLO DE PRECIPITACIÓN DE ESTRUVITA (ES)

Procedimiento simplificado del protocolo para la precipitación de estruvita sugerido por Zhao, *et al.*, (2010).

Definición:

Es una sustancia cristalina considerada como un recurso renovable y es utilizada como un fertilizante valioso (poco soluble en agua) de liberación lenta, se forma a partir de una concentración equimolar de NH_4^+ , Mg^{2+} y PO_4^{3-} de acuerdo a la siguiente reacción:



Fundamento:

La estruvita se encuentra presente en las tuberías de aguas residuales en forma cristalina. Además, este fertilizante conserva los nutrientes esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas.

La ES se obtuvo a partir de un diseño de experimentos, del cual se tomaron las condiciones favorables de operación, relación $\text{Mg}^{2+}:\text{PO}_4^{3-}$ (1.5), Agitación (450 rpm) y tiempo de reacción (50 min).

Para lograr la precipitación de ES se necesita una cantidad determinada de digerido proveniente de digestión anaeróbica de estiércol bovino. Este digerido es llevado al laboratorio y almacenado a 4°C hasta su posterior uso.

La ES precipitada es de color grisáceo. Los cristales se recogen en cajas Petri y se almacenan en la incubadora ($36.8 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24h. Pasado este tiempo, se analizan los cristales obtenidos mediante microscopia con petrografía, radiación infrarroja, SEM y SEM-EDS. Cabe resaltar que el digerido que queda después de la precipitación hay que disminuirle el pH a 7 para su posterior eliminación.

Materiales y Equipos:

- ✓ Digerido
- ✓ Vaso de precipitado (1l)
- ✓ Filtro (1mm diámetro)
- ✓ Agitador magnético
- ✓ Equipo de medición de pH
- ✓ Plancha de agitación
- ✓ Agua destilada
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Incubadora
- ✓ Nevera
- ✓ Espectrofotómetro visible con rango espectral de 400-900 nm

Reactivos:

- ✓ NaOH (0.5 N)

✓ HCL (1 N)

Procedimiento:

- 1) Tomar un volumen determinado de digerido (200ml)
- 2) Pasar la muestra de digerido por un tamiz (1mm de diámetro) con el fin de retirar el material fibroso y algunas impurezas presentes
- 3) Verter el digerido filtrado en un vaso de precipitado de 500ml
- 4) Bajar el pH con HCL (1N) hasta 3 y agitar (600 rpm) durante una hora
- 5) Subir el pH a 9 con NaOH (0.5)
- 6) Agitar el digerido a 450 rpm durante 50 min (condiciones favorables para la precipitación de ES).
- 7) Dejar sedimentar los cristales de ES durante 30 min
- 8) Separar los cristales obtenidos del líquido (digerido residual), pasando el líquido a otro recipiente
- 9) Lavar los cristales con agua destilada y almacenarlos en cajas Petri
- 10) Dejar secar los cristales a 36.8 ± 1 °C en la incubadora, hasta su posterior análisis

Para determinar la recuperación de PO_4^{3-} y NH_4^+ se toma una pequeña muestra de digerido antes y después del proceso de precipitación de DA. Estos nutrientes se cuantifican utilizando el método colorimétrico descrito por APHA 4500 (American Public Health Association (APHA, 2005).

$$\% \text{Recuperación} = \frac{[]_{\text{inicial}} - []_{\text{final}}}{[]_{\text{inicial}}}$$

* Lavar con HCL (no con detergente) el material de vidrio a utilizar incluyendo los tubos para la medición de amonio y fosfato. Luego enjuagar con bastante agua destilada. Esto con el propósito de retirar el fósforo que se encuentra presente en los detergentes.

Campo de aplicación

- Digeridos provenientes de la digestión anaeróbica.

Apéndice G. Protocolo de extracción de ADN.

Norgen's Purification Technology Purification is based on spin column chromatography. The process involves first adding the soil sample, Lysis Buffer G and Lysis Additive A to a provided Bead Tube, and the soil sample is homogenized. The sample is then centrifuged, and the supernatant is transferred to a DNase-free microcentrifuge tube. Binding Buffer I is added, and the lysate is incubated for 5 minutes at 4°C or on ice. This step is then be repeated using the provided OSR (Organic Substance Removal) Solution to remove organic substances. The clean lysate is then collected and Lysis Buffer QP and ethanol are added. Next, the solution is loaded onto a spin-column, which binds only the DNA. The bound DNA is then washed using the provided Binding Buffer B and Wash Solution A, and the purified DNA is eluted using the Elution Buffer B. The purified total DNA is free of all inhibitors, including humic acid, and can be used in sensitive downstream applications including PCR.

Procedures

All centrifugation steps are carried out in a benchtop microcentrifuge. Various speeds are required for different steps, so please check your microcentrifuge specifications to ensure that it is capable of the proper speeds. All centrifugation steps are performed at room temperature. The correct rpm can be calculated using the formula:

$$\text{RPM} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{(1.118 \times 10^{-5})(r)}}$$

where RCF = required gravitational acceleration (relative centrifugal force in units of g); r = radius of the rotor in cm; and RPM = the number of revolutions per minute required to achieve the necessary g-force.

Notes Prior to Use

- A variable speed centrifuge should be used for maximum kit performance. If a variable speed centrifuge is not available a fixed speed centrifuge can be used, however reduced yields may be observed.
- Ensure that all solutions are at room temperature prior to use.
- Prepare a working concentration of Wash Solution A by adding 42 mL of 96 - 100 % ethanol (provided by the user) to the supplied bottle containing the concentrated Wash Solution A. This will give a final volume of 60 mL. The label on the bottle has a box that may be checked to indicate that the ethanol has been added.

1. Lysate Preparation

a. Add 250 mg of soil sample (maximum input varies depending on the sample type) to a provided Bead Tube and add 750 μ L of Lysis Buffer G. Vortex briefly to mix soil and Lysis Buffer G.

Note: In the case of a wet soil sample, transfer the sample to a clean 1.7 mL microcentrifuge tube and centrifugation for 30 seconds at $20,000 \times g$ (~14,000 RPM). Remove the water carefully using a pipette, and resuspend the soil pellet in 750 μ L of Lysis Buffer G. Transfer the soil to a Bead Tube using a pipette. Proceed to Step 1b.

b. Add 200 μ L of Lysis Additive A and vortex briefly.

- c. Secure tube horizontally on a flat-bed vortex pad with tape, or secure the tube in any commercially available bead beater equipment (e.g. MP Biomedicals' FastPrep®-24 Instrument). Vortex for 30 seconds at 4M/S using a FastPrep®-24 instrument, or 5 minutes using a flat-bed vortexer at maximum speed. Alternatively, optimize the time and speed according to the manufacturer's manual.
- d. Centrifuge the tube for 1 minute at $20,000 \times g$ (~14,000 RPM).
- e. Transfer clean supernatant to a DNase-free microcentrifuge tube (not provided) without any contact with the pellet.
- f. Add 100 μ L of Binding Buffer I, mix by inverting the tube a few times, and incubate for 5 minutes on ice or at 4°C.
- g. Spin the lysate for 2 minutes at $20,000 \times g$ (~14,000 RPM) to pellet any protein and soil particles.
- h. Using a pipette, transfer up to 700 μ L of clean supernatant into a DNase-free microcentrifuge tube (not provided) without any contact with the pellet.
- i. Add 50 μ L of OSR Solution, mix by inverting the tube a few times, and incubate for 5 minutes on ice or at 4°C. Spin the lysate for 2 minutes at $20,000 \times g$ (~14,000 RPM).
- j. Transfer up to 700 μ L of clean supernatant to a DNase-free microcentrifuge tube (not provided) without any contact with the pellet.
- k. Add 400 μ L of Lysis Buffer QP and 550 μ L of 96-100% Ethanol (user provided). Vortex briefly. Proceed to Step 2.

2. Binding to Column

- a. Assemble a provided Spin Column with one of the provided collection tubes.
- b. Gently mix the lysate and Lysis Buffer QP using a pipette and apply 600 μ L of the clarified lysate onto the column and centrifuge for 30 seconds at 10,000 x g (~10,000 rpm). Discard the flowthrough and reassemble the spin column with the collection tube.

Note: Ensure the entire lysate volume has passed through into the collection tube by inspecting the column. If the entire lysate volume has not passed, spin for an additional minute.

- c. Repeat Step 2b with the remaining lysate.

3. Column Wash

- a. Apply 500 μ L of Binding Buffer B to the column and centrifuge for 1 minute at 10,000 x g (~10,000 rpm).

Note: Ensure the entire wash solution has passed through into the collection tube by inspecting the column. If the entire wash volume has not passed, spin for an additional minute.

- b. Discard the flowthrough and reassemble the spin column with its collection tube.
- c. Apply 500 μ L of Wash Solution A to the column and centrifuge for 1 minute at 10,000 x g (~10,000 rpm).
- d. Discard the flowthrough and reassemble the spin column with its collection tube.

- e. Repeat step 3c and 3d.

- f. Spin the column for 2 minutes at 20,000 x g (~14,000 rpm) in order to thoroughly dry the resin.

Discard the collection tube.

4. DNA Elution

- a. Place the column into a fresh 1.7 mL Elution tube provided with the kit.
- b. Add 50-100 μ L of Elution Buffer B to the column and incubate for 1 minute at room temperature.
- c. Centrifuge for 1 minute at 10,000 x g (~10,000 rpm).

5. Storage of DNA

The purified genomic DNA can be stored at 2-8°C for a few days. For longer term storage, -20°C is recommended