

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LODOS DURANTE LA
DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS
SÓLIDOS URBANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GAS METANO**

CLAUDIA JOHANNA SANDOVAL LOZANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2007**

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LODOS DURANTE LA
DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS
SÓLIDOS URBANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GAS METANO**

CLAUDIA JOHANNA SANDOVAL LOZANO

Proyecto de Grado para optar al título de Bióloga

Directora

MARIELA CARREÑO DE ARANGO

M.Sc. En Microbiología Industrial

Codirector

EDGAR CASTILLO MONROY

Ph.D. en Ingeniería Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2007

*A mi Dios,
Por ser mi papá
Y darme valor y fuerza.*

*A mis hermanos John y Geovanni,
y en especial a mi abuelita Maria
y mi tío José, por su amor, su comprensión
y porque a pesar de las dificultades siempre
estuvieron apoyándome para alcanzar esta meta.*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Mariela Carreño de Arango, por su orientación, paciencia, dedicación, pero especialmente por su incondicional amistad.

A mi codirector, Edgar Fernando Castillo, por su apoyo para la realización de esta investigación.

Al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM), de la Universidad Industrial de Santander (UIS), por la financiación del proyecto.

Al Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) y especialmente al Doctor Jorge Hernández, Mariela Carreño y Mónica Hernández por toda su colaboración.

A la Ingeniería Marisol Vergara Mendoza, por su apoyo en el laboratorio.

Al profesor Gregorio y su Sra. Judith por su gran amistad.

A mis amigos: Juliana, Wilmer, Angela, Jesús, Lyda, Ana, Andrea, Priscila, Juan Guillermo, Aura y Lucio, con quienes compartí alegrías, tristezas, preocupaciones y éxitos.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. JUSTIFICACIÓN	4
2. OBJETIVOS	7
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1 Digestión anaerobia	9
3.1.1 Etapas de la digestión anaerobia	11
• Hidrólisis	11
• Fermentación (acidogénesis)	13
• Acetogénesis	13
• Metanogénesis	15
3.1.2 Productos de la digestión anaerobia	17
3.1.3 Parámetros ambientales y operacionales que influyen en la digestión anaerobia	18
• Temperatura	18
• Nutrientes	19
• pH	19

• Tiempo de retención hidráulico (TRH)	20
• Carga orgánica	21
• Tóxicos e inhibidores	21
• Nitrógeno amoniacal	22
• Ácidos grasos volátiles (AGV's)	22
• Hidrógeno	22
3.1.4 Digestión anaerobia en dos fases	23
3.2 Caracterización microbiológica	23
4. METODOLOGÍA	27
4.1 Reactores	27
4.1.1 Parámetros operacionales de los reactores.	28
4.2 Inóculo	28
4.3 Sustrato	29
4.4 Toma de muestras	30
4.5 Análisis Fisicoquímicos	30
4.6 Análisis Microbiológicos	31
4.6.1 Recuento por Sensibilidad al Oxígeno	31

4.6.2 Recuento por Grupos Metabólicos	34
4.6.3 Actividad Metanogénica Específica	34
4.7 Aislamiento e Identificación de Bacterias Metanogénicas	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Operación del reactor anaerobio en dos fases y análisis químicos	37
5.2 Análisis microbiológicos	40
5.2.1 Recuentos por Sensibilidad al oxígeno	40
5.2.2 Recuento por Grupos Metabólicos	42
5.2.3 Actividad Metanogénica Específica	46
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIONES	55
8. RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58
ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Esquema de las reacciones que participan en la digestión anaerobia.	10
Fig. 2. Reactor acidogénico (R1) y reactor metanogénico (R3).	28
Fig. 3. Cámara de Anaerobiosis.	30
Fig. 4. Procedimiento seguido para el muestreo del reactor acidogénico.	32
Fig. 5. Procedimiento seguido para el muestreo del reactor metanogénico.	33
Fig. 6. Actividad Metanogénica Específica por desplazamiento de líquido.	35
Fig. 7. Variación diaria de biogás para los reactores acidogénico (líneas punteadas azules) y metanogénico (líneas continuas verdes). (▲)% CO ₂ R1, (Δ)% CH ₄ R1, (●) %CH ₄ R3, (○)% CO ₂ R3.	38
Fig. 8. Variación diaria de la concentración de (AGV's) y la alcalinidad en los reactores acidogénico (líneas punteadas azules) y metanogénico (líneas continuas verdes). (▲) Alcalinidad R1, (Δ) AGV's R1, (●),alcalinidad R3, (○)AGV's R3.	39
Fig. 9. Técnica del NMP para las bacterias fermentadoras.	43

Fig. 10. Técnica del NMP para las bacterias sulfatorreductoras.	43
Fig. 11. Producción de metano a través del tiempo para los sustratos utilizados en los ensayos de la Actividad Metanogénica Específica del reactor metanogénico. (▲) etanol, (Δ) metanol, (●) acetato, (○) formato, (◇).control.	46
Fig. 12. Actividad Metanogénica Específica para el inóculo (barras grises) y para los lodos procedentes del reactor metanogenico (barras blancas).	47
Fig. 13. Producción de metano a través del tiempo para los sustratos utilizados en los ensayos de la Actividad Metanogénica Específica del inóculo. . (▲) etanol, (Δ) metanol, (●) acetato, (○) formato, (◇).control.	48
Fig. 14. Morfología microscópica de <i>Methanotrix sp.</i>	50
Fig. 15. Morfología microscópica de <i>Methanosarcina sp.</i>	50

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características del reactor anaerobio en dos fases.	27
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de la FORSU después de la reducción del tamaño de partícula.	29
Tabla 3. Parámetros operacionales de los reactores.	37
Tabla 4. Grupos microbiales relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el inóculo y los lodos procedentes del reactor acidogénico y metanogénico, expresados en UFC.ml ⁻¹ .	40
Tabla 5. Recuento de microorganismos patógenos para el inóculo y los lodos procedentes del reactor acidogénico y metanogénico, expresado en NMP. ml ⁻¹	41
Tabla 6. Grupos microbiales relacionados con el metabolismo bacterial para el inóculo y los lodos procedentes del reactor acidogénico y metanogénico, expresado en NMP. ml ⁻¹	42
Tabla 7. Análisis fisicoquímicos de los ensayos de AME.	45

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Actividad Metanogénica Específica.	71
ANEXO B. Recuento de los grupos metabólicos por Número Más Probable.	74

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LODOS DURANTE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GAS METANO *

AUTOR: CLAUDIA JOHANNA SANDOVAL LOZANO **

PALABRAS CLAVES: Digestión anaerobia, grupos metabólicos, Número Más Probable (NMP), Actividad metanogénica Específica (AME), Fracción Orgánica de los residuos Sólidos Urbanos (FORSU).

Entre las tecnologías anaerobias actualmente disponibles en el mercado, la digestión anaerobia de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU) se presenta como una alternativa destinada a disminuir el volumen de residuos depositados en los rellenos sanitarios, además de producir un gas combustible conocido como biogás (CH_4 y CO_2) y un efluente rico en nutrientes, el cual puede ser usado como bioabono. En este trabajo se presenta la caracterización microbiológica de lodos anaerobios utilizados durante el arranque y puesta en marcha de un reactor anaerobio en dos fases para el tratamiento de la FORSU. El inóculo utilizado se tomó de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Río Frío y de un digestor anaerobio de residuos porcícolas. Las poblaciones bacterianas se evaluaron mediante el recuento de los grupos metabólicos por la técnica del Número Más Probable (NMP); los grupos relacionados con la sensibilidad al oxígeno y la determinación de la Actividad Metanogénica Específica (AME) empleando acetato, formato, metanol y etanol como sustratos. Paralelamente, se identificaron géneros representativos de las bacterias metanogénicas. Se encontraron grupos metabólicos capaces de transformar la FORSU en un biogás formado principalmente por CH_4 y CO_2 mediante la digestión anaerobia. La AME para el acetato y el formato fue de 2.39 g.DQO- CH_4 /g.SSV.día y 0,94 gDQO- CH_4 /gSSV.día respectivamente. En la identificación se observaron principalmente los géneros, *Methanotrix sp* y *Methanosarcina sp*.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, UIS, Directora Mariela Carreño de Arango, Codirector Edgar F. Castillo

ABSTRACT

TITLE: SLUDGE MICROBIOLOGIC CHARACTERIZATION DURING THE ORGANIC FRACTION OF URBAN SOLID WASTE ANAEROBIC DIGESTION FOR PRODUCING METHANE *

AUTHOR: CLAUDIA JOHANNA SANDOVAL LOZANO **

KEYWORDS: anaerobic digestion, metabolic groups, Most Number Probable (MNP), Specific Methanogenic Activity (SMA), Organic Fraction of Urban Solid Waste (OFUSW).

Between the anaerobic technologies at the moment available in the market, the anaerobic digestion of the Organic Fraction of Urban Solid Waste (OFUSW) appears as an alternative destined to decrease the volume of remainders deposited in the landfills, besides to produce a well-known combustible gas as biogas (CH_4 y CO_2) and a rich effluent in nutrients, which can be used as a biofertilizer. In this work it is presented the microbiological characterization of the anaerobic sludge used during the starting-up of a two phases anaerobic reactor for the anaerobic OFUSW. The inoculum was obtained of the wastewater treatment plant Río Frío and of the anaerobic digester of piggery waste. The bacterial populations was evaluated through the count of the metabolic groups by the technique of Most Number Probable (MNP); the groups related with the oxygen sensitivity and the determination of the Specific Methanogenic Activity (SMA) using acetate, formate methanol y ethanol as substrates. Parallely, representative sorts of methanogenic bacteria were identified. The presence of metabolic groups able to transform the OFUSW in biogas conformant for CH_4 y CO_2 through the anaerobic digestion. The Specific Methanogenic Activity for acetate and formate was of 2.39 g.DQO- CH_4 /g.VSS.day and 0.94 gDQO- CH_4 /g VSS.day respectively. Two sorts, Methanotrix sp and Methanosarcina sp were identified.

*Degree Project

** Science Faculty, Biology School, UIS, director Mariela Carreño de Arango Codirector Edgar F. Castillo

INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico e industrial y la elevada densidad poblacional generada al final del siglo XX, han ocasionado considerables volúmenes de residuos sólidos urbanos (RSU) a nivel nacional e internacional, constituyendo uno de los principales problemas ambientales de la sociedad contemporánea, además de contribuir en la generación de focos de infección que perjudican la salud humana como consecuencia de la falta de control, de alternativas de tratamiento y la ausencia de leyes reguladoras (Lopes, W. *et al.*, 2004; Eriksson, O. *et al.*, 2005). En América Latina la producción de RSU asciende a 118 millones de toneladas al año y en Colombia sobrepasa los 29000 toneladas diarias, de las cuales el 45% son depositadas en los rellenos sanitarios (MAVDT, 2005).

La digestión anaerobia es considerada una de las tecnologías mas eficientes para el tratamiento de los RSU, debido a que en la mayoría de los países latinoamericanos el contenido de Fracción Orgánica (FO) representa entre un 40 – 75%. (Plaza, G. *et al.*, 1996; Sekiguchi, Y. *et al.*, 2001; Sosnowski, P. *et al.*, 2003; Ağdağ, O. N. and Sponza, D. T. 2005; Bezama, A. *et al.*, 2007). En Colombia y específicamente en la ciudad de Bucaramanga el contenido de la FO de los RSU se encuentra alrededor del 63% (Cogán, A. y Rodríguez, I. 2000).

El proceso de digestión anaerobia consiste en la transformación de la materia orgánica a través de una serie de reacciones bioquímicas, en un biogás con un alto contenido de metano, que puede ser aprovechado como fuente de energía y un efluente sólido, con excelentes características para ser utilizado como

fertilizante para el suelo. Durante la primera etapa, participan las bacterias hidrolíticas, encargadas de romper los polímeros orgánicos (polisacáridos, proteínas, y lípidos) para convertirlos a monómeros tales como; los ácidos grasos volátiles de cadena larga, los alcoholes, el hidrógeno (H_2) y el dióxido de carbono (CO_2); posteriormente intervienen las bacterias fermentativas o acidogénicas que transforman los productos formados durante la hidrólisis en ácido acético y compuestos intermediarios como el etanol, el ácido láctico, el ácido propiónico, el ácido fórmico y el ácido butírico, además de H_2 y CO_2 . Estos productos son convertidos en acetato, H_2 y CO_2 por las bacterias acetogénicas. Finalmente, el metano es producido por las bacterias metanogénicas a partir del acetato, el H_2 y el CO_2 (Wheatley, A. 1990; Hedrick, D. *et al.*, 1992; Griffin, M. *et al.*, 1998; Veeken, A. and Hamelers, B. 1999; Solera, R. *et al.*, 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002; Schink, B. 2002; Liu, J. *et al.*, 2004; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

La digestión anaerobia de los RSU requiere del metabolismo coordinado de los grupos microbianos involucrados en el proceso. En tales ambientes, la producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) es mucho más rápida que la tasa de conversión de AGV's a metano, debido a que la velocidad de crecimiento de las bacterias fermentadoras es mayor que la de las acetogénicas y las metanogénicas. Por esta causa los ácidos acumulados, conllevan a la caída del pH y consecuentemente a la inhibición de la metanogénesis (Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. 1991; Campos, A. 2001).

La digestión anaerobia en dos fases ofrece ventajas significativas sobre los procesos convencionales de una sola fase, especialmente la vía en que los microorganismos son retenidos en el reactor, generando la posibilidad de establecer condiciones operacionales que disminuyan los tiempos de arranque del sistema y la especialización de la microbiota en cada reactor, permitiendo la

obtención de una mayor cantidad de productos deseados en cada etapa del proceso (Borzacconi, L. *et al.*, 1995; Mata Alvarez, J. and Llabrés, S. 2000; Sekiguchi, Y. *et al.*, 2001; Yu, H. W. and Smith, G. 2002; Sachs, J. *et al.*, 2003; Liu, J. 2004; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Demirel, G. N. and Chen, S. 2005; Castillo, E. *et al.*, 2006; Demirel, B. and Yenigun, O. 2006).

La estabilidad y eficiencia de los reactores anaerobios es usualmente determinada a través de algunos parámetros fisico-químicos como los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), la concentración de AGV's y la cantidad y la composición del biogás producido. Sin embargo, son pocos los estudios que reportan la composición microbiana y el equilibrio dinámico existente entre las distintas poblaciones involucradas en el proceso. (Ince, *et al.*, 1995; Solera, R. *et al.*, 2001; Schink, B. 2002; Pacheco, J. and Magaña, A. 2003; Sosnowski, P. *et al.*, 2003; Liu, J. *et al.*, 2004; Ağdağ, O. N. and Sponza, D. T. 2005; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Fricke, K. *et al.*, 2005; Hartmann, H. and Ahring, B. 2005).

En este estudio se realiza la caracterización de las diferentes poblaciones microbianas que participan en el proceso de digestión anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) en un reactor anaerobio en dos fases. El inóculo utilizado se tomó de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Río Frío y de un digestor anaerobio de residuos porcícolas. Las poblaciones bacterianas se evaluaron mediante el recuento estándar en placa por siembra profunda para los grupos relacionados con la sensibilidad al oxígeno. Posteriormente, se estimaron los grupos metabólicos por la técnica del Número Más Probable (NMP) y finalmente se determinó la Actividad Metanogénica Específica (AME) para el reactor metanogénico empleando el acetato, el formato, el metanol y el etanol como sustratos. Paralelamente se aislaron e identificaron los géneros representativos de bacterias metanogénicas.

1. JUSTIFICACIÓN

La disposición final y el tratamiento de los residuos sólidos urbanos (RSU) constituyen uno de los principales problemas ambientales de las últimas décadas. Actualmente en el mundo se generan 1600 millones de toneladas al año de RSU, de los cuales el 43% son generados en Asia y Oceanía, el 28% en Norte-América y la Unión Europea (Valdez-Vázquez, I. *et al.*, 2004a). En Latinoamérica y especialmente en Colombia se presenta una generación per cápita de 0.74 Kg/día de RSU (Acuario, G. *et al.*, 1997). Estas cifras son producto de la elevada densidad poblacional y el desarrollo tecnológico e industrial generado al final del siglo XX, que ocasionan considerables volúmenes de residuos humanos y animales, los cuales contribuyen a generar focos de infección que perjudican la salud humana como resultado de la falta de control, de alternativas de tratamiento y la ausencia de leyes reguladoras (Lopes, W. *et al.*, 2004; Eriksson, O. *et al.*, 2005)

En la mayoría de los países de América Latina la composición de los residuos sólidos presentan un porcentaje entre el 40 - 75% de la Fracción Orgánica (FO) (Bezama, A. *et al.*, 2007). En Colombia y específicamente en la ciudad de Bucaramanga el contenido de la FO de los RSU es del 63% con un porcentaje de humedad del 80% (Cogán, A. y Rodríguez, I. 2000). De acuerdo con lo anterior se puede decir que la aplicación de la digestión anaerobia para el tratamiento de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU) contribuye en forma positiva a la disminución de los volúmenes de residuos depositados en los rellenos sanitarios, además de producir un biogás (CH_4 y CO_2) y un excelente biofertilizante (Plaza, G. *et al.*, 1996 ; Harnzawi, N. *et al.*, 1998 ; Mata Alvarez, J.

and Llabrés, S. 2000; Borglin, S. E. *et al.*, 2004; Lopes, W. *et al.*, 2004; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Bezama, A. *et al.*, 2007).

La principal opción utilizada para la disposición de los RSU en la actualidad es el relleno sanitario, aunque existen otras estrategias como el compostaje, la incineración y el reciclaje, pero estas no son ampliamente utilizadas. Diferentes procesos anaerobios, tales como los sistemas en batch, la digestión anaerobia en una fase y la digestión anaerobia en dos fases han sido empleados en el tratamiento de efluentes con altas cargas orgánicas. Cada uno de estos procesos se diferencia por la forma en la que los microorganismos son retenidos en el reactor, sin embargo, la digestión anaerobia en dos fases genera la posibilidad de establecer condiciones operacionales que disminuyan los tiempos de arranque del sistema y la especialización de la microbiota en cada reactor, permitiendo la obtención de una mayor cantidad de productos deseados en cada etapa del proceso (Mata Alvarez, J. and Llabrés, S. 2000; Borzacconi, L. *et al.*, 1995; Sekiguchi, Y. *et al.*, 2001; Yu, H. *et al.*, 2002; Sachs, J. *et al.*, 2003).

La aplicación de la tecnología anaerobia para el tratamiento de residuos sólidos depende en gran medida del desarrollo y el uso de los reactores anaerobios. La estabilidad y la eficiencia de los reactores son usualmente determinadas a través de parámetros tales como los SSV's, la concentración de AGV's o la relación entre ellos y la cantidad y la composición del biogás producido. (Pacheco, J. and Magaña, A. 2003; Sosnowski, P. *et al.*, 2003; Liu, J. *et al.*, 2004; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Fricke, K. *et al.*, 2005; Michaud, S. *et al.*, 2005; Hartmann, H. and Ahring, B. 2005). Sin embargo, son pocas las investigaciones encaminadas a evaluar los reactores a través de las poblaciones microbianas involucradas en el proceso. Uno de los factores críticos para la estabilidad de los reactores anaerobios durante el tratamiento de la FORSU es el mantenimiento de poblaciones metanogénicas

suficientes, ya que una disminución metabólica afecta en forma directa el funcionamiento de los reactores anaerobios en términos de la producción de metano y la calidad del efluente. Las poblaciones de un reactor anaerobio dependen principalmente del sustrato con el que es alimentado y de las condiciones operacionales del sistema. Por ello, es de gran importancia conocer la composición microbiana y el equilibrio dinámico existente entre las distintas poblaciones del reactor que permitan entender el comportamiento de los sistemas anaerobios en el tratamiento de la FORSU. (Ince, O. *et al.*, 1995; Solera, R. *et al.*, 2001; Ağdağ, O. N. and Sponza, D. T. 2005).

Un paso importante dentro del proceso global de la digestión anaerobia es la selección del inóculo. El inóculo debe poseer elevada actividad metanogénica y una población microbiana suficiente. Estas características permiten disminuir los tiempos de retención hidráulica de los reactores anaerobios que normalmente son elevados por la baja tasa de crecimiento de los microorganismos que ocasiona problemas operacionales que dificultan el arranque y la puesta en marcha de los reactores anaerobios (Diaz, M. *et al.*, 2002; Van Lier, J. B. *et al.*, 2001; Griffin, M. *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- Caracterizar microbiológicamente los lodos durante la digestión anaerobia de la fracción orgánica de residuos sólidos para la producción de gas metano.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente los lodos utilizados en la digestión anaerobia.
- Cuantificar la población microbiana que interviene en el proceso de digestión anaerobia.
- Determinar la Actividad Metanogénica Específica de la población microbiana encontrada.
- Identificar géneros representativos de bacterias Metanogénicas.

- Establecer la relación de los grupos metabólicos con la capacidad de producir metano y su influencia en las condiciones operacionales de los reactores.

3. MARCO TEÓRICO

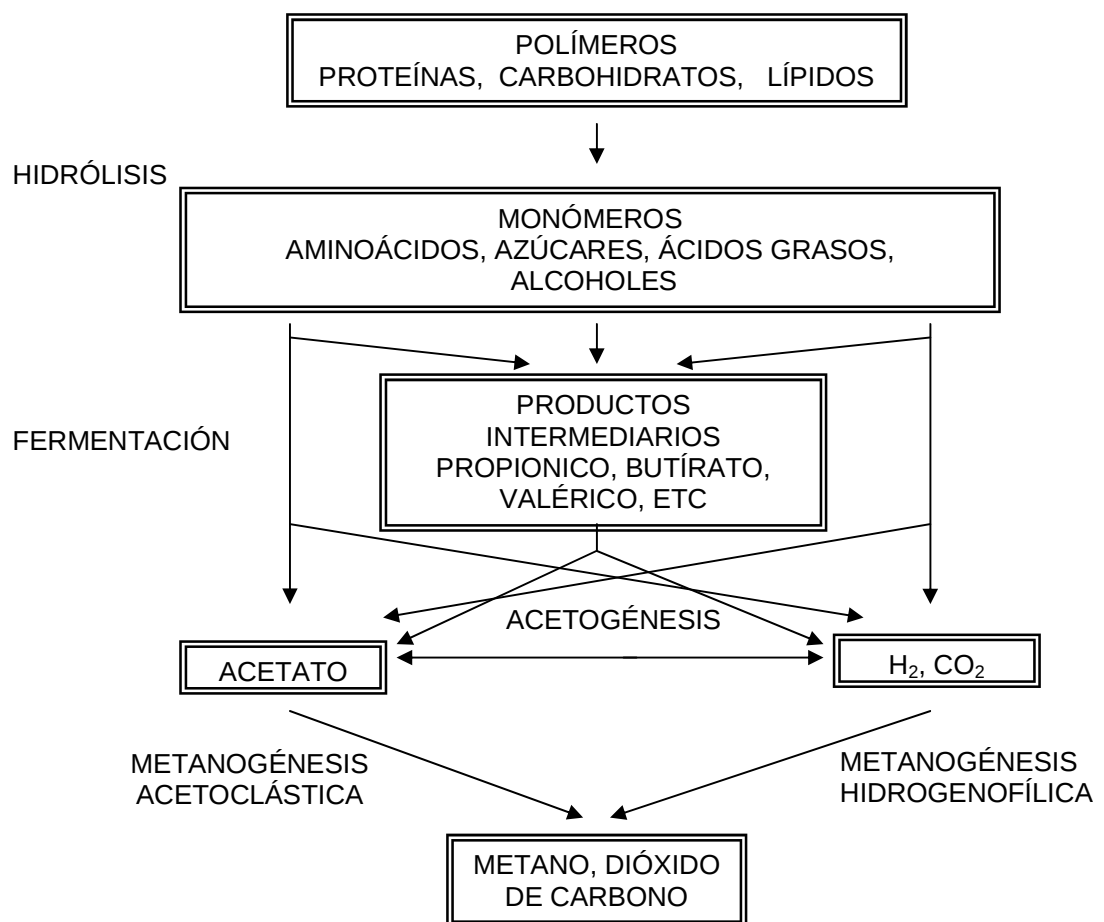
3.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia es el proceso a través del cual la materia orgánica en ausencia de oxígeno libre, es transformada en metano por una serie de reacciones bioquímicas llevadas a cabo por diferentes grupos de bacterias, las cuales utilizan en forma secuencial los productos metabólicos generados por cada uno de ellos. Estos grupos metabólicos están conformados por las bacterias hidrolíticas, bacterias fermentativas (acidogénicas), bacterias acetogénicas y bacterias metanogénicas (Fig. 1).

El proceso se inicia con la hidrólisis de polímeros complejos (polisacáridos, proteínas y lípidos) que por acción de las enzimas extracelulares son hidrolizados a moléculas de bajo peso molecular como los azúcares, los aminoácidos, los ácidos grasos de cadena larga y los alcoholes. Estos productos son transportados a través de la membrana celular para ser fermentados a ácidos grasos con bajo número de carbonos como el ácido acético, el fórmico, el propiónico y el butírico; compuestos reducidos como el etanol, además de hidrógeno y dióxido de carbono. Las bacterias acetogénicas transforman los productos de la fermentación en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente las bacterias metanogénicas convierten los ácidos grasos a acetato, el acetato a metano y dióxido de carbono, o reducen el dióxido de carbono a metano (Zeikus, J. G. 1977; Bryant, M. P. 1979; Wheatley, A. 1990; Hedrick, D. *et al.*, 1992; Schmidt, J. E. and Ahring, B. 1996;

Griffin, M. *et al.*, 1998; Veeken, A. and Hamelers, B. 1999; Solera, R. *et al.*, 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002; Schink, B. 2002; Valentine, D. 2002; Liu, J. *et al.*, 2004; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Gallert, C. and Winter, J. 2005; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

Figura 1. Esquema de las reacciones que participan en la digestión anaerobia. (Hutòn, M. *et al.*, 1999)



Este proceso se produce en ecosistemas naturales como los pantanos, en los sedimentos de lagos y mares, en las zonas anóxicas del suelo, en fuentes de aguas termales sulfurosas, en el tracto digestivo de los rumiantes y en los reactores anaerobios.

3.1.1 ETAPAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

- **HIDRÓLISIS**

Para que los polímeros orgánicos puedan ser utilizados directamente por los microorganismos deben ser hidrolizados en monómeros solubles, para que puedan atravesar la membrana celular. La hidrólisis de estos polímeros (polisacáridos, proteínas y lípidos) es llevada a cabo por enzimas extracelulares excretadas por anaerobios facultativos y estrictos para ser convertidos en moléculas de bajo peso molecular como azúcares, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos.

La hidrólisis de estos polímeros es realizada por diferentes grupos enzimáticos. Entre los principales componentes de la materia orgánica, se encuentra la celulosa, constituida por regiones fibrosas altamente organizadas (región cristalina) que alternan con regiones amorfas menos organizadas unidas a través de enlaces β -1–4 glucosídicos. La degradación de la celulosa depende del estado en el que se encuentre en los residuos. Por ejemplo, cuando la celulosa se encuentra incrustada en una matriz de lignina, esta impide el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa. Por el contrario, si la celulosa está en forma cristalina, las celulasas pueden atacar fácilmente y como consecuencia la hidrólisis puede ser un proceso rápido (Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. 1991; Rozzi, A. and Remigi, E. 2004; Gallert, C. and Winter, J. 2005; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

Las proteínas son hidrolizadas por proteasas en proteosas, peptonas, péptidos de cadena corta y aminoácidos. Los Aminoácidos producidos son degradados a

ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro reducido. Generalmente la tasa de hidrólisis de la proteína es menor que la de los carbohidratos (Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. 1991; Campos, A. 2001).

Los lípidos son degradados por un grupo de enzimas hidrolíticas (lipasas) en los correspondientes ácidos grasos de cadena larga y moléculas de glicerol, galactosa y colina; los cuales son fermentados a ácidos grasos volátiles por acción de las bacterias fermentativas (Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. 1991; Campos, A. 2001).

La digestión anaerobia de los residuos sólidos requiere de un balance entre la tasa de hidrólisis y la tasa de metanogénesis, debido a que las bacterias metanogénicas son más sensibles a la acumulación de ácidos grasos y la correspondiente caída del pH provocando la acidificación del sistema. La tasa de hidrólisis y la velocidad del proceso dependen de factores tales como el pH, la temperatura, la composición del sustrato, el tiempo de retención hidráulica, el tamaño de partícula y la concentración de productos (Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. 1991; Campos, A. 2001).

Si el sustrato tiene un tamaño de partícula grande, la hidrólisis puede ser la etapa limitante del proceso anaerobio, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la absorción de las enzimas hidrolíticas. Entre las principales estrategias utilizadas para la reducción del tamaño de partícula se encuentran los pretratamientos físico-químicos, los cuales conducen al aumento de la tasa de hidrólisis y por consiguiente a la disminución en los tiempos de retención (Veeken, A. and Hamelers, B. 1999; Campos, A. 2001; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

- **FERMENTACIÓN (ACIDOGÉNESIS)**

Los productos resultantes de la hidrólisis son subsecuentemente usados como sustratos para la fermentación formando compuestos que pueden ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas (acético, fórmico, H_2) y compuestos orgánicos más reducidos (láctico, etanol, propionato, butírico) oxidados por las bacterias acetogénicas. Este grupo de bacterias se caracteriza por presentar tasas de crecimiento superiores a las bacterias metanogénicas, que pueden provocar en corto tiempo la acidificación en los reactores anaerobios (Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002; Schink, B. 2002; de Bok, F. A. *et al.*, 2004; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

Las proporciones entre los productos de la fermentación varían en función del consumo de H_2 por parte de las bacterias acetogénicas y las bacterias metanogénicas. Cuando el H_2 es eliminado de forma eficiente las bacterias fermentadoras no producen compuestos reducidos como el etanol, favoreciendo la producción de H_2 y la liberación de energía en forma de ATP (Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. 1991; Campos, A. 2001).

- **ACETOGÉNESIS**

Mientras que algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por las bacterias metanogénicas (H_2 y acetato) otros como los alcoholes, los ácidos grasos y los compuestos aromáticos necesitan ser degradados a acetato, CO_2 , e H_2 , a través de las bacterias acetogénicas. Durante esta fase pueden intervenir:

- Bacterias Acetogénicas Productoras Obligadas de Hidrógeno (OHPA)

Son bacterias sintróficas obligadas, las cuales necesitan asociarse a microorganismos consumidores de hidrógeno como las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas o sulfatorreductoras, debido a que el hidrógeno que producen genera inhibición en su crecimiento bacterial. A esta relación, que permite mantener un balance energético favorable en el sistema se le conoce como transferencia interespecífica de hidrógeno, aunque la transferencia de formato también ha sido considerada como un posible mecanismo. La actividad de las bacterias acetogénicas depende de la concentración de H_2 , siendo posible sólo a valores muy bajos de presión parcial de H_2 . (García, J. L., 1990; Wheatley, A. 1990; de Bok, F. A. *et al.*, 2004; Valdez-Vazquez, I. *et al.*, 2004b; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

- Bacterias Homoacetogénicas

Son anaerobias obligadas y utilizan el CO_2 , como aceptor final de electrones, produciendo acetato como único producto de la fermentación anaerobia (Wheatley, A. 1990; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

- Bacterias Sulfatorreductoras

Las bacterias sulfatorreductoras (BSR) son anaerobios estrictos, que utilizan el sulfato como aceptor de electrones durante la oxidación de los compuestos orgánicos. Estas bacterias pueden utilizar polímeros tales como los almidones, monómeros como los azúcares, los ácidos grasos, el formato, los compuestos alifáticos y los aromáticos, como también el oxígeno molecular para generar equivalentes que reducen el sulfato. En comparación con los metanógenos, los

cuales tienen un espectro de sustratos más bien restringidos, las BSR son metabólicamente más versátiles.

Debido a su gran diversidad las bacterias sulfatorreductoras se dividen en dos grupos: las bacterias que oxidan acetato, las cuales se especializan en la oxidación de ácidos grasos como el acetato y las bacterias no oxidantes del acetato las cuales utilizan el lactato, el piruvato, el etanol o ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía. Ambos grupos participan en la reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno (Mizuno, O. *et al.*, 1998; Elferink, S. *et al.*, 1998; García, J. L. *et al.*, 2000; Campos, A. 2001; Díaz, M. *et al.*, 2002).

- **METANOGENESIS**

Los microorganismos metanogénicos son considerados los más importantes dentro del consorcio de microorganismos anaerobios, ya que son los responsables de la formación de metano y de la eliminación de los productos intermedios producidos durante la digestión anaerobia. Desde un punto de vista metabólico, la formación de metano es un tipo de respiración anaerobia en la cual, el dióxido de carbono actúa como aceptor de electrones y el hidrógeno es utilizado para reducirlo.

Para lograr un adecuado desarrollo de las bacterias metanogénicas en reactores anaerobios, se requiere mantener condiciones favorables para su desarrollo tales como: un potencial redox de -330 mv, anaerobiosis estricta, un pH cercano a la neutralidad (6.8 a 7.2) y cantidades mínimas de sulfatos y nitratos (Campos, A. 2001; Díaz, M. *et al.*, 2002). De acuerdo a los sustratos que degradan se pueden establecer dos grupos:

- Bacterias Metanogénicas Acetoclásticas (BMA)

Producen metano y CO₂ a partir del acetato, el cual es utilizado como fuente de carbono y energía; se estima que por esta vía de metanogénesis se produce el 70% del total de metano generado en un reactor.

En la mayoría de los reactores anaerobios se encuentran dos géneros representativos de bacterias metanogénicas acetoclásticas, *Methanosarcina sp* y *Methanotrix sp*, los cuales difieren con respecto a su afinidad por el sustrato, su tasa de crecimiento y sustratos específicos. *Methanosarcina sp*, es el metanógeno más versátil, capaz de utilizar varios sustratos incluyendo hidrógeno y acetato, mientras *Methanotrix sp* (anteriormente *Methanosaeta*), se caracteriza porque solo degrada acetato (Fukuzaki, S. *et al.*, 1990a; Garcia, J. L. 1990; Coates, J. *et al.*, 1996; Garcia, J. L. *et al.*, 2000; Rozzi, A. and Remigi, E. 2004).

- Bacterias Metanogénicas Hidrogenofílicas (BMH₂)

Las BMH₂ obtienen la energía a través de la oxidación del hidrógeno y el formato en presencia de dióxido de carbono que actúa como aceptor de electrones, por esta vía se produce aproximadamente el 30% del metano generado en un reactor. Al consumir el hidrógeno producido, las metanogénicas mantienen una baja presión parcial de hidrógeno entre 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm (< 10 Pa), lo cual es necesario para el funcionamiento de las bacterias acetogénicas productoras obligadas de H₂. (Fukuzaki, S. *et al.*, 1990b; Garcia, J. L. 1990; Voolapalli, R. and Stuckey, D. 1999; Kim, M. *et al.*, 2002; de Bok, F. A. *et al.*, 2004).

Las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas pueden ser sustituidas por las bacterias sulfatorreductoras en ambientes con una concentración alta de sulfatos, compitiendo entonces por el hidrógeno disponible cuando existen limitaciones de dicho sustrato. La acumulación de sulfuros, puede inhibir la fase metanogénica en los digestores anaerobios, disminuyendo el pH (valores menores a 4), generando olores desagradables y afectando los equipos (Sekiguchi, Y. *et al.*, 2001; Rozzi, A. and Remigi, E. 2004; Gallert, C. and Winter, J. 2005; Kotsyurbenko, O. R. 2005).

3.1.2 PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

El producto principal de la digestión anaerobia es el biogás, compuesto en un 50 a 70% de metano, en un 30 a 50% de dióxido de carbono y trazas de otros gases como el nitrógeno, el ácido sulfhídrico, el monóxido de carbono e hidrógeno. La cantidad de gas producido es muy variable, aunque generalmente oscila alrededor de los 350 L/kg de sólidos degradables, con un contenido en metano del 70%. Aunque su potencia calorífica no es muy grande, puede sustituir al gas de la ciudad, utilizándose en las siguientes aplicaciones: como fuente de calor (cocina, alumbrado), en la calefacción y como combustible de motores acoplados a generadores eléctricos.

Por otra parte, el efluente producido durante la digestión está compuesto por diversos productos orgánicos e inorgánicos que pueden ser utilizados para la fertilización de suelos debido a su alto contenido de nutrientes (Campos, A. 2001).

3.1.3 PARÁMETROS AMBIENTALES Y OPERACIONALES QUE INFLUYEN EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Existen diversos factores que influyen considerablemente en el éxito de la digestión anaerobia.

- Temperatura

El proceso anaerobio se produce en la naturaleza en un amplio intervalo de temperaturas, que van desde los 4°C a 110°C. La eficiencia del proceso, no obstante, es muy diferente ya que la temperatura afecta directamente la tasa de crecimiento de los microorganismos que interviene en el proceso de digestión anaerobia. Existen tres intervalos principales de temperatura en los cuales pueden sobrevivir estos microorganismos, el psicrófilico (por debajo de 20°C), el mesófilico (entre 20°C a 40°C) y el termófilico (mayor de 45°C). El intervalo más utilizado en los reactores anaerobios para el tratamiento de residuos sólidos es el mesófilico, aunque en la actualidad existe una fuerte tendencia a utilizar el tratamiento termófilico debido a sus ventajas, tales como, su capacidad para tratar altas cargas, cortos tiempos de retención, baja producción de lodos y la destrucción de agentes patógenos. Sin embargo, el tratamiento termófilico puede presentar problemas de estabilidad en los reactores y generar un efluente de baja calidad comparado con el proceso mesófilico (Campos, A. 2001; Kim, M. *et al.*, 2002; Van Lier, J. B. *et al.*, 2001; Wu, M. C. *et al.*, 2006). El intervalo psicrófilico se plantea como poco viable debido a que se necesita un reactor de gran tamaño, sin embargo, simplifica mucho el diseño y presenta menores problemas de estabilidad (McHugh, S. *et al.*, 2004; Seghezzi, L. 2004; Kotsyurbenko, O. R. 2005). La temperatura también está íntimamente relacionada con el tiempo que debe permanecer la biomasa dentro del reactor. A medida que aumenta la temperatura se incrementa la actividad metabólica de las bacterias y en consecuencia se

produce una disminución en los tiempos de retención. Dentro de los grupos metabólicos involucrados en el proceso de digestión anaerobia, las bacterias metanogénicas son las más sensibles a los cambios de temperatura, debido su baja tasa de crecimiento en comparación con los otros grupos presentes.

- Nutrientes

Los principales nutrientes requeridos por los microorganismos anaerobios para su desarrollo y crecimiento, son el carbono (C) y el nitrógeno (N). Sin embargo, si el contenido de nitrógeno es muy alto, la reproducción de las bacterias se inhibe debido a la alta alcalinidad. Lo ideal es una relación C/N de 20:1 a 30:1; una relación menor de 8:1 inhibe la actividad bacteriana por el excesivo contenido de amonio. El proceso microbiológico no solo requiere de estos nutrientes, sino que también deben estar presentes en un cierto equilibrio otros minerales como el azufre, el fósforo, el potasio, el calcio, el magnesio, el hierro, el magnesio, el zinc, el selenio, entre otros (Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002).

- pH

El valor y la estabilidad del pH en un reactor anaerobio es un parámetro extremadamente importante ya que la metanogénesis se lleva a cabo cuando este se mantiene en valores cercanos a la neutralidad (6.8 y 7.2). Los desequilibrios entre la producción y el consumo de los ácidos grasos volátiles en los reactores anaerobios conducen al descenso del pH, produciéndose la acidificación del reactor. La disminución del pH trae como resultado la inhibición de las poblaciones metanogénicas y por consiguiente una disminución en la producción de metano, aumento del contenido de dióxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno. Muchos

aspectos del metabolismo microbial son ampliamente influenciados por variaciones del pH, entre los cuales se encuentran, la utilización de fuentes de carbono y energía, la eficiencia en la degradación del sustrato, la síntesis de proteínas y la liberación de productos metabólicos de la célula. A pesar de esto, el pH no se considera una variable de control óptima, ya que se requiere de un tiempo considerable para detectar una variación importante del mismo en el sistema. (Van Lier, J. B. *et al.*, 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002; Horiuchi, J. *et al.*, 2002; Hu, Z. *et al.*, 2004; Seghezzo, L. 2004; Leitão, R. C. *et al.*, 2006).

- Tiempo de retención hidráulico (TRH)

Este parámetro depende típicamente del tipo de reactor utilizado. En los sistemas continuos el tiempo de retención hidráulico coincide con el tiempo de retención celular, es decir de la biomasa, por lo que el tiempo de retención deberá ser suficientemente largo para permitir el desarrollo de la población bacteriana. El tiempo de retención se ve afectado por el tipo de sustrato y la temperatura. La selección de altas temperatura implica una disminución en los tiempos de retención y por consiguiente serán menores los volúmenes de reactor necesarios para digerir una determinada cantidad de sustrato. Con relación al tipo de sustrato, generalmente los materiales con mayor contenido de carbono demandarán mayores tiempos de retención para ser totalmente convertidos a metano. Si se tiene en cuenta la baja velocidad de crecimiento de las bacterias metanogénicas y además que el 90% de la energía utilizada es para la producción de metano y solo el 10% para síntesis celular, el tiempo que se requiere para formar una biomasa activa implica el tiempo de residencia de los microorganismos que participan en el proceso (Wang, Q. *et al.*, 1997; Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002).

- Carga Orgánica

La carga orgánica es la cantidad de materia orgánica, expresada normalmente en unidades de Demanda Química de Oxígeno (DQO) o de sólidos volátiles, por unidad de reactor y unidad de tiempo, siendo directamente dependiente de la concentración del sustrato y del tiempo de retención (Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002).

- Tóxicos e inhibidores

La toxicidad se refiere a la perturbación originada por una sustancia sobre un proceso metabólico o sobre la viabilidad de los microorganismos. Esta se encuentra en función de varios factores, tales como, la concentración, los efectos de sinergismo, el antagonismo, la formación de complejos y la aclimatación. En general la velocidad de crecimiento bacteriano aumenta con la concentración de sustrato, sin embargo, a concentraciones altas un sustrato pueden resultar tóxicos o inhibidor para la actividad microbiana. Los fenómenos de antagonismo y sinergismo también están en función de la concentración. El antagonismo es la reducción del efecto tóxico de un sustrato en presencia de otro y el sinergismo es el aumento de la toxicidad de una sustancia causada por la presencia de otra. La formación de complejos resulta, también, fundamental. Si una sustancia no está en solución, no puede penetrar dentro de la célula, y por tanto no podrá afectar el metabolismo del organismo. La magnitud del efecto tóxico de una sustancia puede minimizarse por la aclimatación de los microorganismos al tóxico; durante este proceso las bacterias logran reorganizar las rutas metabólicas que han sido bloqueadas por la presencia del material tóxico (Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002). Entre los principales tóxicos presentes en los reactores anaerobios encontramos:

- Nitrógeno amoniacal

Aunque el nitrógeno amoniacal es un nutriente esencial para el crecimiento de los microorganismos, una concentración elevada del mismo puede limitar su crecimiento. Elevadas concentraciones de amonio producen un descenso en la velocidad de crecimiento de las bacterias metanogénicas, pero no en la tasa de crecimiento de las acidogénicas o acetogénicas. Entre los microorganismos metanogénicos los consumidores de ácido acético son más sensibles a la inhibición por amonio que los consumidores de H₂ (Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002).

- Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

Los AGV's pueden inhibir algunos de los procesos que tienen lugar en un reactor anaerobio. Por ejemplo, la acumulación de propiónico en el reactor, especialmente de la forma no ionizada, puede inhibir la acetogénesis a partir del ácido propiónico y la metanogénesis acetoclástica. La acumulación del ácido acético, puede inhibir la acetogénesis a partir del ácido propiónico, y la acetogénesis a partir del ácido butírico. Sin embargo, son necesarias concentraciones de ácido acético muy altas para que llegue a afectar a la producción de metano, por encima de 4000 mg/L o más. (Fukuzaki, S. *et al.*, 1990a; Fukuzaki, S. *et al.*, 1990b; Campos, A. 2001; Wang, J. *et al.*, 2006).

- Hidrógeno

El hidrógeno es un importante intermediario del proceso anaerobio y su acumulación puede provocar la inhibición de la acetogénesis, con la consiguiente

acumulación de AGV's, estando especialmente descrita la acumulación de propiónico (Fukuzaki, S. *et al.*, 1990b; Campos, A. 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002).

3.1.4 DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DOS FASES

La digestión anaerobia en dos fases es un proceso en el cual se emplean dos reactores separados, en el primer reactor ocurre la hidrólisis y la acidogénesis de la materia orgánica compleja, mientras que en el segundo se lleva a cabo la acetogénesis y la metanogénesis del material acidificado. Los microorganismos acidogénicos y metanogénicos involucrados en el proceso de descomposición de la materia orgánica compleja en reactores anaerobios, no solo divergen en términos de sus requerimientos nutricionales y pH, sino también con respecto a su fisiología, cinética de crecimiento y su habilidad para tolerar condiciones de estrés ambiental. Por lo tanto, condiciones que son favorables para las bacterias acidogénicas como TRH cortos y bajos valores de pH pueden ser inhibidores para las bacterias metanogénicas. Los procesos de digestión anaerobia en dos fases ofrecen ventajas significativas en comparación con los sistemas de tratamiento anaerobio de una sola fase, en donde las condiciones son impuestas por ambos grupos metabólicos. Un proceso anaerobio en dos fases permite seleccionar y enriquecer los diferentes grupos metabólicos de cada reactor y controlar independientemente las condiciones operacionales proporcionando estabilidad a los reactores. (Yu, H. W. and Smith, G. 2002 ; Sachs, J. *et al.*, 2003; Bouallagui, H. *et al.*, 2004; Liu, J. *et al.*, 2004; Bouallagui, H. *et al.*, 2005; Demirel, G. N. and Chen, S. 2005; Demirel, B. and Yenigun, O. 2006).

3.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Los microorganismos anaerobios presentan cierto grado de dificultad para ser cultivados debido a que algunos miembros requieren largos periodos de incubación para su crecimiento, condiciones de anaerobiosis estrictas y algunos son difíciles de separar debido a sus interacciones sintróficas.

La caracterización y cuantificación de los grupos metabólicos presentes en los reactores anaerobios se ha llevado a cabo por numerosos métodos tales como conteo directo por Microscopía de Epifluorescencia y cuantificación de la coenzima F_{420} , conteo en placa (Solera, R. *et al.*, 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002; Rozzi, A. and Remigi, E. 2004), medida de la Actividad Metanogénica Específica (AME) (Grotenhuis, J. *et al.*, 1991; Alves, M. *et al.*, 1998; Diaz, M. *et al.*, 2002), Número Más Probable (NMP) (Dowel, R. 1972; Grotenhuis, J. *et al.*, 1991; Diaz, M. *et al.*, 2002) y más recientemente, por técnicas Moleculares (Griffin, M, *et al.*, 1998).

Los métodos convencionales para la caracterización de los lodos se basan en el crecimiento de las diferentes poblaciones en medios selectivos. En primer lugar está la técnica del NMP, en la cual las diluciones seriadas del lodo son inoculadas en medios selectivos; con este método se maneja un intervalo de confianza del 95%. (Beliaeff, B. and Mary, J-Y. 1993; Trajstman, A. C. 1996; Gonzales, J. 1996; Briones, A. and Wolfgang, R. 1999).

En segundo lugar, se encuentra la AME que indica la capacidad del consorcio microbiano para transformar la materia orgánica en metano y se define como la masa de sustrato en forma de DQO que es convertida a metano por unidad de

biomasa y por unidad de tiempo: gDQO-CH₄/gSSV día. Se mide bajo condiciones de saturación de sustrato, por lo tanto, la concentración de AGV's deberá ser suficiente para que su difusión en el lecho del lodo no constituya una limitante. Por ejemplo, en ensayos estáticos con frecuencia el lodo sedimenta y forma una capa que limita la difusión del sustrato. La AME se usa para seleccionar lodos adaptados para emplearlos como inóculo; establecer el grado de degradable de diversos sustratos; estimar la máxima carga orgánica que puede ser aplicada a un determinado lodo y monitorear la composición microbiana de ambientes metanogénicos. La AME del lodo puede verse afectada por el tiempo que el lodo requiere para adaptarse al sustrato, este periodo se denomina fase log o fase de adaptación. Por esta razón se recomienda realizar dos alimentaciones al ensayo. La segunda alimentación se inicia cuando se ha logrado la conversión de metano de por lo menos el 80% del sustrato adicionado en la primera alimentación (Díaz, M. *et al.*, 2002; Mohammad, J. and Vinod, T. 1999).

Li, Y. *et al.*, (1997), evaluaron la medida de la Actividad Metanogénica usando varios sustratos y la población de bacterias metanogénicas por la técnica del NMP en un reactor a escala laboratorio para el tratamiento de lodos provenientes de aguas residuales, encontrando que el promedio de la AME en el reactor fue de 29.3 ml-CH₄/g-VSS.día, conduciendo a una disminución en el tiempo de retención hidráulica del reactor. En resumen, tanto las bacterias metanogénicas acetoclásticas como la hidrogenofílicas fueron enumeradas por el orden de 10⁷ NMP/ml o 10⁹ NMP/g-SSV.

Ince, O. *et al.*, en 1997, observaron cambios en el número y la composición de la población microbiana en un reactor anaerobio inoculado con lodo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Inicialmente examinaron el lodo utilizando microscopia de fluorescencia lo cual reveló que los

grupos más dominantes fueron *Methanococcus* y *Methanosarcina*. El número de metanógenos autofluorescentes permaneció entre un 6.7 % y 8.3% de la población microbiana total. La AME mostró un incremento del 50% en el número de bacterias metanogénicas con respecto a las no metanogénicas (20%) después de 14 semanas de operación. Esto también es confirmado por los resultados del NMP y los conteos microscópicos.

Por otra parte, investigaciones realizadas por Agrawal, L. *et al.*, en 1997, encontraron que la AME tomada en el día 400 de un reactor UASB a diferentes tiempos de operación, fue de 6.9 para las bacterias metanogénicas acetoclásticas ($0.30 \text{ KgDQO-CH}_4/\text{KgSSVdía}$), 2.5 para las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas ($0.36 \text{ KgDQO-CH}_4/\text{KgSSVdía}$), 0.83 para las bacterias acetogénicas del propionato en ausencia de sulfato ($0.03 \text{ Kg CH}_3\text{COOH-DQO/kg SSV.día}$) y 4.4 para las bacterias acetogénicas del propionato en presencia de sulfato ($0.19 \text{ KgDQO-CH}_4/\text{KgSSVdía}$). El lodo usado como semilla en el reactor contenía 10^5 - 10^6 UFC/g-SSV de bacterias metanogénicas, 10^4 UFC/gr-SSV de bacterias acetogénicas y 10^4 - 10^7 UFC/gr-SSV de bacterias sulfatorreductoras. El incremento de la AME con respecto al lodo semilla fue corroborado por la población microbiana en un orden de 2 a 4 para las bacterias metanogénicas, 3 para las bacterias acetogénicas y 2 a 3 para las bacterias sulfatorreductoras.

4. METODOLOGÍA

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

4.1. REACTORES

Se empleó un reactor anaerobio en dos fases (reactor acidogénico (R1) y un reactor metanogénico (R3)), contruidos en acero inoxidable, con capacidad de 30 L y un volumen útil de 24 L, además de control automático de agitación y temperatura (Ver Tabla 1, Fig. 2).

Tabla 1. Características del reactor anaerobio en dos fases.

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Material del reactor	Acero inoxidable. Calibre 18
Agitación	Agitador concéntrico helicoidal con barredor inferior.
RPM	40
Motor	0.5 Hp, 220 V, Trifásico.
Sistema de calentamiento	Resistencia sumergida de Ferro-Niquel, 800 W.
Medidor de temperatura	Termocupla tipo J.
Control de temperatura y agitación	Controlador digital de temperatura TZ4ST (AUTONIC), Timmer digital.

Figura 2. Reactor acidogénico (R1) y reactor metanogénico (R3).



Fuente: Claudia Johanna Sandoval

4.1.1 PARÁMETROS OPERACIONALES DE LOS REACTORES

Se reportan los parámetros necesarios como: el tipo de reactor, el sustrato, el pH, la temperatura, la Carga Orgánica Total (COT) y Volumétrica (COV) y el Tiempo de Retención Hidráulica (TRH). (Solera, R. *et al.*, 2001; Diaz, M. *et al.*, 2002).

4.2 INÓCULO

El reactor es inoculado con una mezcla 1:1 (v/v) de lodos procedentes de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) Río Frío, localizada en el municipio de Girón, Santander y de un digestor anaerobio para el tratamiento de los residuos porcícolas ubicado en la finca Gavassa de la mesa de los Santos, Santander (Castillo, E. *et al.*, 2006).

4.3 SUSTRATO

Se utilizó la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU) como sustrato durante el arranque del reactor acidogénico (R1) y el efluente del mismo como sustrato para el reactor metanogénico (R3). Estos residuos fueron colectados en la plaza de mercado del barrio San Francisco ubicada en la zona metropolitana de Bucaramanga. Posterior a su recolección fueron sometidos a un proceso de trituración para proporcionar un tamaño adecuado de partícula (4 – 6 mm) ya que este parámetro influye notoriamente en el proceso de digestión anaerobia. Las características fisicoquímicas de este sustrato se reportan en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de la FORSU después de la reducción del tamaño de partícula.
(Castillo, E. *et al.*, 2006)

PARÁMETRO	UNIDADES	VALOR
Tamaño de partícula	Mm	4 – 6
Densidad real	Kg / m ³	1052
Densidad aparente	Kg / m ³	864
Sólidos totales	Kg / m ³	168.3
	% (p / p)	16.0 – 18.0
Sólidos volátiles	Kg / m ³	158.8
	% (p / p)	15.1
	% ST	94.4
Carbono orgánico total	% (p / p)	39.0 – 48.0
Nitrógeno total	% (p / p)	0.35 – 1.19
Potasio	% (p / p)	2.46
Fósforo	% (p / p)	0.22
Relación C/N		32.77
Relación C/K		15.85
Relación C/P		177.27

4. 4 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas por duplicado en recipientes estériles con un volumen de 1000 ml. Posteriormente se burbujearon con N_2 y CO_2 en una proporción 80:20 y se almacenaron bajo refrigeración a 4 °C hasta ser procesadas. La inoculación del lodo para la AME y las diluciones para los recuentos microbiales, se realizaron en la cámara de anaerobiosis bajo una atmósfera de N_2 y CO_2 (80% - 20%) (Fig. 3). Los viales y las botellas utilizadas se sellaron con tapones de caucho, lo cual permite el uso de jeringas para inocular o agregar soluciones (Díaz, M. *et al.*, 2002).

Figura 3. Cámara de Anaerobiosis



Fuente: Claudia Johanna Sandoval

4.5 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

La concentración de AGV's, el pH, la alcalinidad y la producción de biogás fueron medidos diariamente. Los AGV's fueron determinados según el procedimiento

descrito por Anderson, G. K. and Yang G. (1992). El contenido de metano y CO₂ en el biogás fue medido por un analizador de gases Bacharach modelo GA-94. La Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) fueron determinados según las recomendaciones del Standard Methods (APHA, 1995).

4.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Se realizaron tres muestreos por reactor para los recuentos microbiológicos tanto en el reactor acidogénico (Fig. 4) como en el reactor metanogénico (Fig. 5).

4.6.1 RECuento POR SENSIBILIDAD AL OXÍGENO

Se empleó la técnica de recuento estándar en placa por siembra profunda para los siguientes grupos: las Bacterias Aerobias y Anaerobias Facultativas (BAAF), las Bacterias Anaerobias (BA), los Mohos y Levaduras (ML). Se sembraron dos cajas por dilución y dos diluciones por muestra. Se incubaron a 35°C, en la siguiente forma: las BAAF bajo condiciones aerobias durante 48 horas, las BA durante 8 días bajo atmósfera de anaerobiosis y los ML durante 8 días a temperatura ambiente. (Díaz, M. *et al.*, 2002). Al terminar el periodo de incubación se realizó el recuento seleccionando la dilución con crecimiento más homogéneo (30 – 300 colonias), se tomó el promedio de las dos cajas y se dividió por el volumen de muestra sembrado teniendo en cuenta la dilución. Los datos se reportaron en UFC.ml⁻¹. Adicionalmente se realizó un recuento de Coliformes Totales y Fecales utilizando la técnica de NMP (APHA, 1995).

Figura 4. Procedimiento seguido para el muestreo del reactor acidogénico.

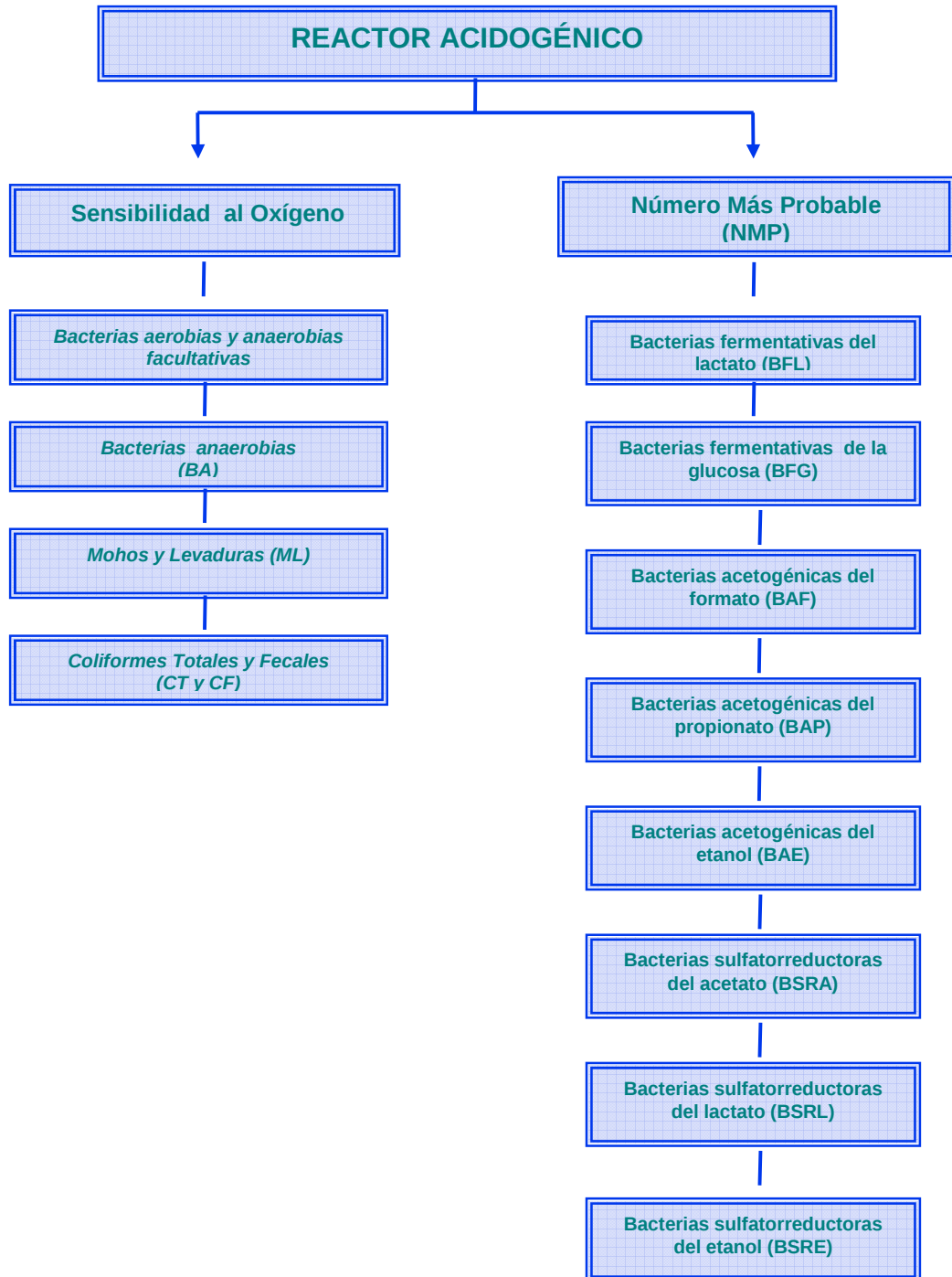
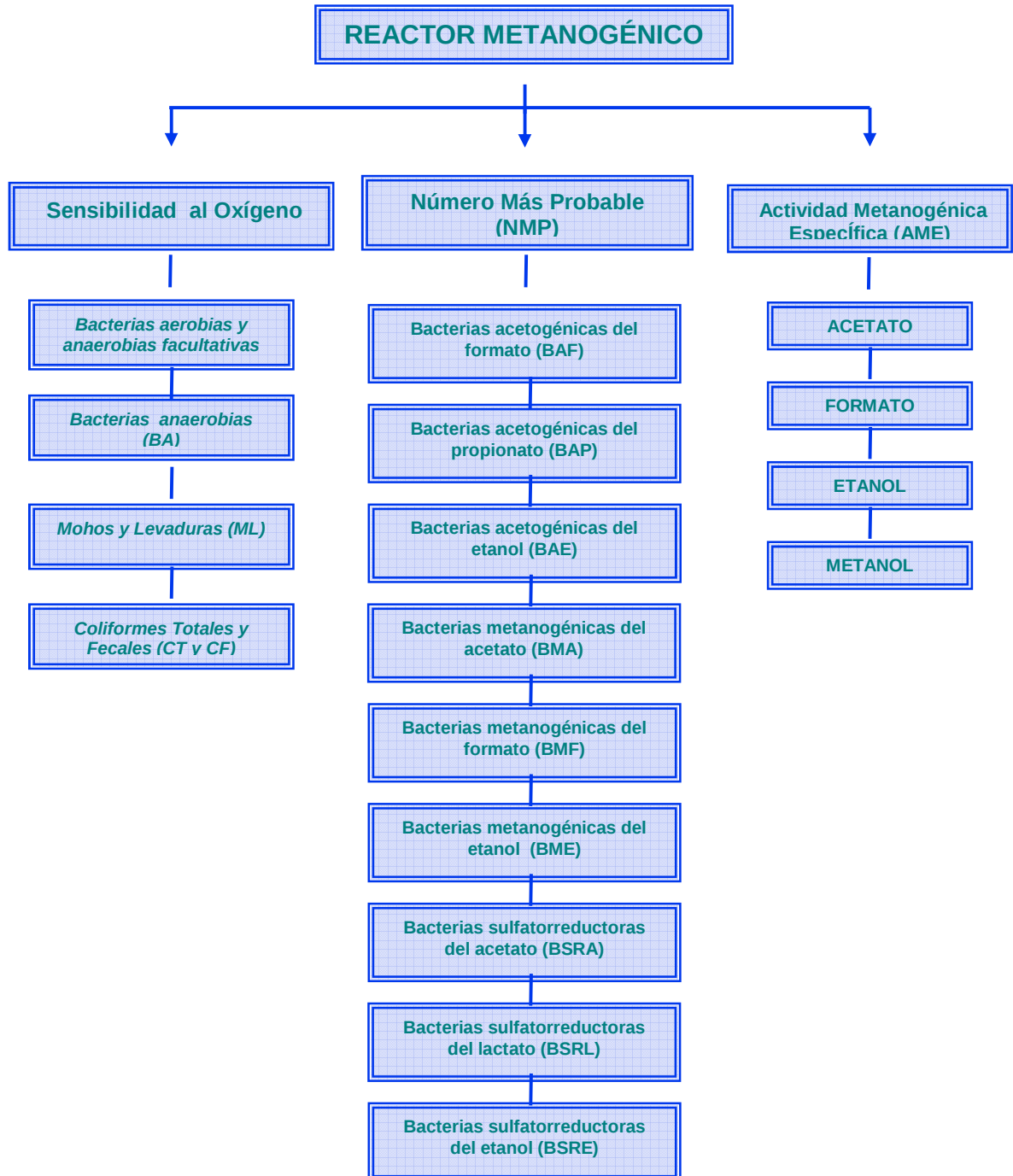


Figura 5. Procedimiento seguido para el muestreo del reactor metanogénico.



4. 6. 2 RECuento POR GRUPOS METABóLICOS

Las poblaciones microbiales fueron estimadas por la técnica de Número Más probable (NMP) (Anexo B) usando los medios de cultivo descritos por Balch, para los siguientes grupos: las Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG) y el Lactato (BFL); las Bacterias Acetogénicas del Propionato, el Formato y el Etanol (BAP, BAF, BAE); las Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA), el Lactato (BSRL) y el Etanol (BSRE); las Bacterias Metanogénicas del Acetato, el Formato, y el Metanol (BMA, BMF, BMM). Para el recuento de los grupos metabólicos se inocularon tres viales o botellas por dilución y tres diluciones por muestra. El crecimiento de las bacterias acetogénicas y metanogénicas fue reportado como el número de tubos positivos por detección de metano a través de un analizador de gases, Bacharach; para las bacterias sulfatorreductoras fue estimado por la formación de un precipitado negro (FeS) y para las bacterias fermentadoras por la acidificación del medio (cambio de color azul a amarillo). Se incubaron a 35°C durante el tiempo necesario dependiendo del grupo metabólico. Todos los procedimientos descritos fueron corridos en una cámara de anaerobiosis bajo atmósfera controlada de N₂ y CO₂ (80% - 20%) (Diaz, M. *et al.*, 2002). El número de tubos positivos en las diferentes diluciones fue usado para obtener el NMP según la tabla de probabilidades reportada en el Standard Methods (APHA, 1995).

ACTIVIDAD METANOgÉNICA ESPECÍFICA (AME)

Para la realización de estos ensayos se utilizaron los lodos del reactor metanogénico. Como reactores se usaron botellas Mariotte de 500 ml, con un volumen útil de 250 ml selladas herméticamente. Las botellas fueron llenadas con 200 ml del medio descrito por Diaz, M. *et al.*, 2002, 40 ml de lodo y 10 ml de sustrato bajo una atmósfera de N₂ y CO₂ (80% - 20%). La producción de metano fue medida por el método de desplazamiento de líquido usando una solución de

hidróxido de sodio (NaOH) al 1% e indicador de fenoftaleína (Fig. 6) (Anexo A). Los sustratos usados para esta prueba fueron, el acetato (600 mM); el formato (2400 mM), el metanol (1000 mM) y el etanol (1000 mM). Se monitoreó la producción diaria de metano y a partir de los datos obtenidos se calcularon las AME. El contenido de las botellas de Mariotte fue mezclado manualmente antes de cada lectura. La misma cantidad de sustrato adicionada durante la primera alimentación fue suministrada para la segunda alimentación. Todas las pruebas fueron conducidas a 38°C y ejecutadas por duplicado (Poetsch, P. and Koetz, P. 1998; Mohammad, J. and Vinod, T. 1999; Diaz, M. *et al.*, 2002).

Figura 6. Actividad Metanogénica Específica por desplazamiento de líquido.



Fuente: Claudia Johanna Sandoval

4.8 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METANOGENICAS

La siembra se realizó por duplicado en la cámara de anaerobiosis con una atmósfera de N₂ y CO₂ (80% - 20%) a partir de cultivos de enriquecimiento tomados del reactor metanogénico, empleando los medios diferenciales publicados en la base de datos de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Para la identificación de la población microbiana se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas de las colonias diferenciándolas según su morfología, características tintoriales y bioquímicas de acuerdo al manual de Bergey's (Staley, J. *et al.*, 2000).

5. RESULTADOS

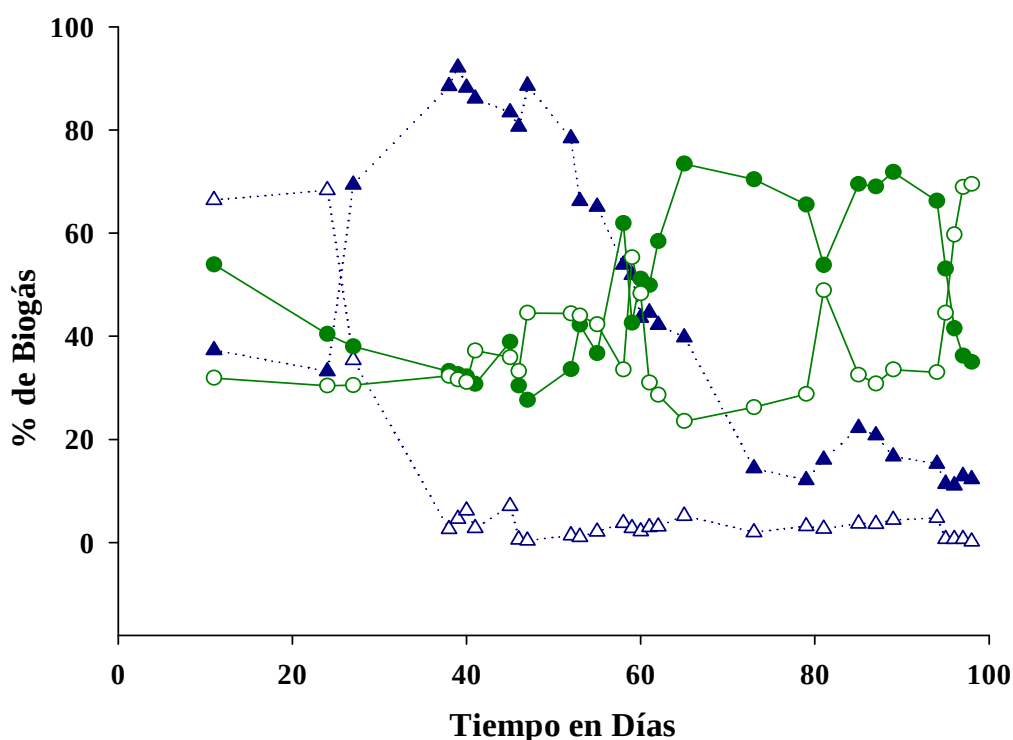
5.1. OPERACIÓN DEL REACTOR ANAEROBIO EN DOS FASES Y ANÁLISIS QUÍMICOS

El reactor fue inoculado bajo condiciones anaerobias con una mezcla 1:1 (v/v) de los lodos procedentes de la PTAR de Río Frió Girón y de un digestor para el tratamiento de residuos porcícolas. El arranque de los reactores se realizó empleando las proporciones de lodo, sustrato y agua sugeridas por Griffin, M. *et al.* (1998), a temperaturas controladas y operadas durante 100 días. Para la aclimatación de la microbiota, el sistema es alimentado con una solución de melaza al (10% p/v) referida al volumen de operación del reactor. A partir de los 30 días el reactor acidogénico se alimentó con 1.8 Kg de la FORSU mientras el reactor metanogénico fue alimento con 1.6 L del efluente de R1. Los parámetros operacionales del reactor anaerobio en dos fases son reportados en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros operacionales de los reactores.

PARÁMETROS	REACTOR ACIDOGENICO	REACTOR METANOGENICO
Temperatura	35°C	38°C
PH	5.0 – 6.5	7.5 – 8.0
TRH	10 días	15 días
Carga Orgánica Total (COT)	1.8 Kg.día ⁻¹	-----
Carga Orgánica Volumétrica (COV)	1.6 L.día ⁻¹	0.8 L.día ⁻¹

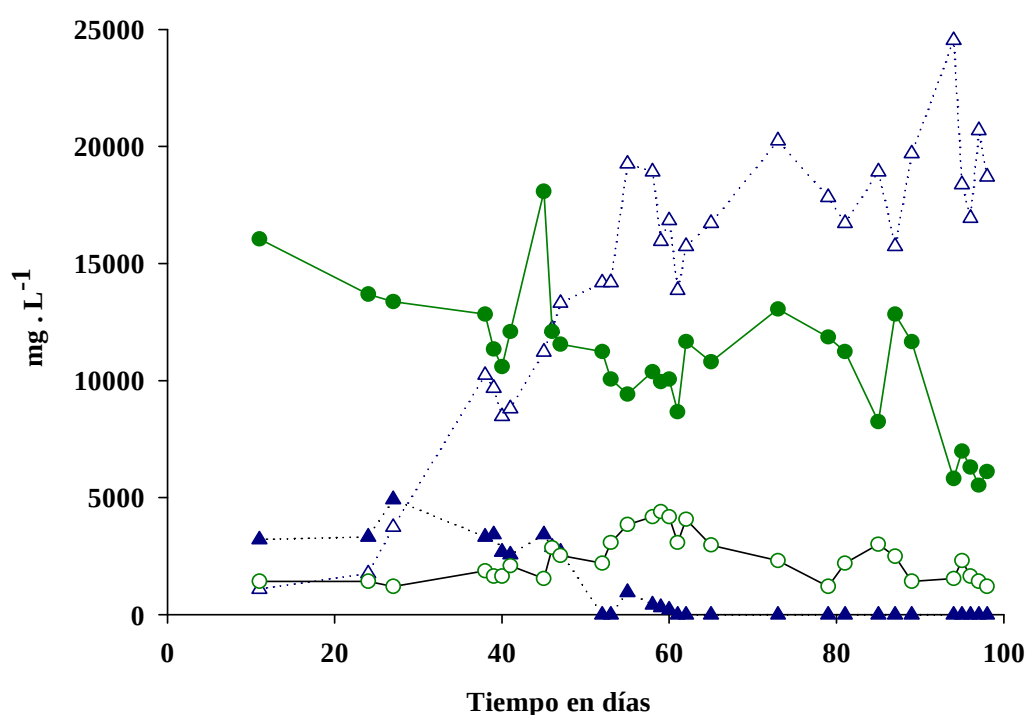
Figura. 7. Variación diaria de biogás para los reactores acidogénico (líneas punteadas azules) y metanogénico (líneas continuas verdes). (▲)% CO₂ R1, (Δ)% CH₄ R1, (●) %CH₄ R3, (○) % CO₂ R3.



El porcentaje de biogás (metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂)) para el reactor acidogénico (R1) y el reactor metanogénico (R3) se presenta en la Fig. 7. Durante la puesta en marcha del reactor acidogénico el contenido de CH₄ hallado fue alrededor del 70%, sin embargo, este comienza a disminuir después del día 25 de operación. Por otro lado, la cantidad de CO₂ se incrementó hasta alcanzar un valor máximo del 90% a los 40 días y a partir de los 50 días disminuyó gradualmente hasta obtener un porcentaje entre el 10% - 20%. En el reactor metanogénico los porcentajes de CH₄ y CO₂ oscilaron entre el 30% y el 60% durante los primeros 60 días, no obstante, los niveles de CH₄ fueron relativamente superiores a los de CO₂

durante los últimos 40 días de operación. Para este reactor se obtuvo un valor máximo de CH₄ del 70% con un porcentaje de CO₂ del 25% en el día 68.

Figura. 8. Variación diaria de la concentración de (AGV's) y la alcalinidad en los reactores acidogénico (líneas punteadas azules) y metanogénico (líneas continuas verdes). (▲) Alcalinidad R1, (△) AGV's R1, (●) alcalinidad R3, (○)AGV's R3.



La concentración de AGV's en el reactor acidogénico se incrementó drásticamente durante todo el proceso de digestión anaerobia llegando a alcanzar valores alrededor de los 25000 mg.L⁻¹ a los 95 días de operación y como una consecuencia de este comportamiento, la alcalinidad disminuyó hasta llegar a cero. La concentración de AGV's osciló entre los 14000 mg.L⁻¹ y 25000 mg.L⁻¹ durante los últimos 50 días. En el reactor metanogénico la concentración de AGV's

se presentó por debajo de los 4000 mg.L⁻¹ durante el tiempo de operación. Por otro lado, se observó una disminución de la alcalinidad durante todo el proceso, con una concentración máxima de 18000 mg.L⁻¹ en el día 48 y una concentración final entre los 6000 mg.L⁻¹ a los 7000 mg.L⁻¹ (Fig. 8).

5.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

5.2.1 RECUEENTOS POR SENSIBILIDAD AL OXÍGENO

Tabla 4. Grupos microbiales relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el inóculo y los lodos procedentes del reactor acidogénico y metanogénico, expresados en UFC. MI⁻¹.

GRUPOS	INÓCULO	RECUEENTOS REACTOR ACIDOGÉNICO			RECUEENTOS REACTOR METANOGÉNICO		
		30 días	60 días	90 días	30 días	60 días	90 días
Bacterias aerobias y anaerobias facultativas (BAAF)	1.7 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁷	4.6 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷	8.4 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁷	2.8 x 10 ⁷
Bacterias anaerobias (BA)	9.9 x 10 ⁵	9.2 x 10 ⁷	5.0 x 10 ⁷	8.7 x 10 ⁷	7.5 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁸	8.9 x 10 ⁷
Mohos y levaduras (ML)	2.4 x 10 ⁵	5.1 x 10 ⁷	4.6 x 10 ⁷	4.2 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁶	8.9 x 10 ⁷

Los recuentos relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el inóculo y los reactores acidogénico y metanogénico se consignan en la Tabla 4. El reactor acidogénico se caracterizó por presentar una proporción de bacterias anaerobias (BA) alta, seguidas por las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (BAAF) y los mohos y las levaduras (ML). Sin embargo, este comportamiento no se presentó a los 90 días, en donde se observó una mayor cantidad de ML (4.2 x 10⁷ UFC. MI⁻¹) que de BAAF (1.6 x 10⁷ UFC. MI⁻¹). En el reactor metanogénico predominó la población de BA excepto a los 30 días, en donde se encontraron en

menor cantidad (7.5×10^6 UFC. ML^{-1}). Los ML presentaron los valores más bajos, sin embargo, se detectó una mayor cantidad a los 30 días de operación. No se detectó el crecimiento de hongos filamentosos y la población dominante fueron las levaduras, quienes intervienen en procesos de fermentación con producción de ácidos y poseen una alta afinidad por sustratos ricos en carbohidratos. Los conteos realizados para el inóculo presentaron una proporción de BAAF alta, seguidas por las BA y en menor cantidad los ML.

Tabla 5. Recuento de microorganismos patógenos para el inóculo y los lodos procedentes del reactor acidogénico y metanogénico, expresado en NMP. ML^{-1}

GRUPOS	INÓCULO	RECUEENTOS			RECUEENTOS		
		REACTOR ACIDOGÉNICO			REACTOR METANOGENICO		
		30 días	60 días	90 días	30 días	60 días	90 días
Coliformes Totales (CT)	1.1×10^7	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	2.4×10^3	1.1×10^5	1.1×10^5
Coliformes fecales (CF)	1.1×10^7	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	2.4×10^3	1.1×10^5	1.1×10^5

Los recuentos de coliformes totales y fecales se presentan en la Tabla 5. En el reactor acidogénico se encontraron valores por el orden de 10^5 NMP. ml^{-1} , mientras en el reactor metanogénico se reportaron valores por el orden de 10^3 NMP. ml^{-1} a 10^5 NMP. ml^{-1} . Al comparar los recuentos del inóculo (10^7 NMP. ml^{-1}) con los reactores (10^5 NMP. ml^{-1}) se observó una disminución de los microorganismos patógenos.

5.2.2 RECuentos por Grupos Metabólicos

Tabla 6. Grupos microbiales relacionados con el metabolismo bacterial para el inóculo y los lodos procedentes del reactor acidogénico y metanogénico, expresado en NMP / ml⁻¹

GRUPOS METABÓLICOS	INÓCULO	RECuentos REACTOR ACIDOGÉNICO			RECuentos REACTOR METANOGENICO		
		30 días	60 días	90 días	30 días	60 días	90 días
Bacterias Fermentadoras de glucosa (BFG)	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	ND*	ND	ND
Bacterias Fermentadoras de lactato (BFL)	2.9 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁵	ND	ND	ND
Bacterias Acetogénicas del Propionato (BAP)	4.6 x 10 ⁴	2.6 x 10 ⁵	4.6 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	8.0 x 10 ⁵
Bacterias Acetogénicas del Formato (BAF)	4.6 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵
Bacterias Acetogénicas del Etanol (BAE)	4.6 x 10 ⁴	2.6 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵
Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA)	2.7 x 10 ³	1.1 x 10 ⁴	1.5 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁵	2.9 x 10 ⁴	2.8 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁵
Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato (BSRL)	3.6 x 10 ³	1.1 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁵	7.4 x 10 ⁴	7.4 x 10 ⁴	7.5 x 10 ⁴
Bacterias Sulfatorreductoras del Etanol (BSRE)	1.1 x 10 ³	1.1 x 10 ⁴	3.6 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁵	2.9 x 10 ⁴	2.9 x 10 ⁴	2.9 x 10 ⁵
Bacterias Metanogénicas del Acetato (BMA)	8.0 x 10 ⁵	ND	ND	ND	4.6 x 10 ⁵	9.3 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵
Bacterias Metanogénicas del Formato (BMF)	2.6 x 10 ⁴	ND	ND	ND	4.6 x 10 ⁵	8.0 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵
Bacterias Metanogénicas del Metanol (BMM)	1.1 x 10 ⁴	ND	ND	ND	1.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁴	3.0 x 10 ³

* No se determinaron

Los conteos por grupos metabólicos para el inóculo, el reactor acidogénico y el reactor metanogénico son reportados en la Tabla 6. Con respecto al metabolismo bacterial, las bacterias fermentadoras (BF) presentaron un incremento entre 10⁴ NMP.ml⁻¹ y 10⁶ NMP.ml⁻¹ en el reactor acidogénico, siendo las más abundantes las BFG que alcanzaron valores de 1.1 x 10⁶ NMP.ml⁻¹ a los 90 días de operación

(Fig. 9). Este grupo metabólico no fue determinado para el reactor metanogénico ya que sus condiciones operacionales no son óptimas para el crecimiento de las BF.

Figura 9. Técnica del NMP para las bacterias fermentadoras



Fuente: Claudia Johanna Sandoval

En el reactor acidogénico se observó un incremento en la población de bacterias sulfatorreductoras (BSR) por el orden de 10^4 NMP.m l^{-1} a 10^5 NMP.m l^{-1} alcanzando valores máximos de 2.4×10^5 NMP.m l^{-1} a los 90 días. En el reactor metanogénico, las BSRA y las BSRE aumentaron ($10^4 - 10^5$ NMP.m l^{-1}), mientras las BSRL permanecieron constantes 7.4×10^4 NMP.m l^{-1} (Fig. 10).

Figura 10. Técnica del NMP para las bacterias sulfatorreductoras



Fuente: Claudia Johanna Sandoval

Para el caso de las bacterias acetogénicas (BA), se encontraron poblaciones por el orden de 10^5 NMP.ml⁻¹ en el reactor acidogénico. Dentro de este grupo metabólico las bacterias más representativas fueron las BAP que alcanzaron valores de 4.6×10^5 NMP.ml⁻¹ a los 60 días de operación, sin embargo, se observó una disminución de la población a los 90 días. Las BAF presentaron valores constantes de 1.1×10^5 NMP.ml⁻¹, mientras las BAE disminuyen en cantidad (1.1×10^5 NMP.ml⁻¹). En el reactor metanogénico la población de BA presentó una disminución a los 60 días por el orden de 10^4 NMP.ml⁻¹. En este reactor la población más abundante fueron las BAP, las cuales se encontraron por el orden de 8.0×10^5 NMP.ml⁻¹ a los 90 días.

Las bacterias metanogénicas obtuvieron valores por el orden de 10^5 NMP.ml⁻¹, sin embargo, se observó una disminución en la población metanogénica de los conteos realizados a los 90 días de operación. Las BMA comparadas con las BMF presentaron poblaciones similares en el reactor metanogénico, mientras los valores más bajos fueron reportados para las BMM.

5.2.3 ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECIFICA

Tabla 7. Análisis fisicoquímicos de los ensayos de AME.

MUESTRA	DQO (mg/ml)	SSV (g/ml)	pH
Inóculo	80	1	7.7
Acetato	23	0.5	8.5
Acetato duplicado	40	1	8.5
Formato	30	0.5	9.0
Formato duplicado	29	0.5	9.1
Metanol	36	0.5	8.2
Metanol duplicado	22	0.5	7.9
Etanol	33	1.5	7.7
Etanol duplicado	29	1.0	7.5

Los análisis fisicoquímicos para los ensayos de AME empleando diferentes sustratos se reportan en la Tabla 7. La producción de metano para los lodos procedentes del reactor metanogénico se observa en la Fig. 11.

La producción de metano para los cuatro sustratos, se inicia una vez éstos se adicionan a los ensayos. Las bacterias metanogénicas acetoclásticas (BMA) y las bacterias metanogénicas del metanol (BMM) comienzan a utilizar eficientemente el acetato hasta los 10 días y el metanol hasta los 4 días, momento en el cual se evidencia una fase estacionaria que indica el agotamiento del sustrato. Cuando se realizó la segunda alimentación las BMA presentaron valores que sobrepasaron los 250 ml de metano, mientras que las BMM alcanzaron valores de 350 ml de metano. La producción de metano por parte de las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas (BMH) y las bacterias metanogénicas del etanol (BME) comienzan al adicionar formato y etanol a los ensayos, observándose una fase exponencial hasta los 4 y 12 días del ensayo respectivamente; seguidas de una fase

estacionaria. No se observó producción de metano después de la segunda alimentación para las BMH y las BME. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos del cálculo de la actividad metanogénica. Se encontraron valores de 2.39 gDQO-CH₄/gSSV.día para el acetato, 0,94 gDQO-CH₄/gSSV.día para el formato y 0.65 gDQO-CH₄/gSSV.día para el metanol. No se detectó AME para el etanol (Fig. 12). Los valores de la AME reportados fueron calculados después de la segunda alimentación según las recomendaciones de Diaz, M. *et al.*, 2002.

Figura 11. Producción de metano a través del tiempo para los sustratos utilizados en los ensayos de la Actividad Metanogénica Específica del reactor metanogénico. (▲) etanol, (△) metanol, (●) acetato, (○) formato, (◇).control.

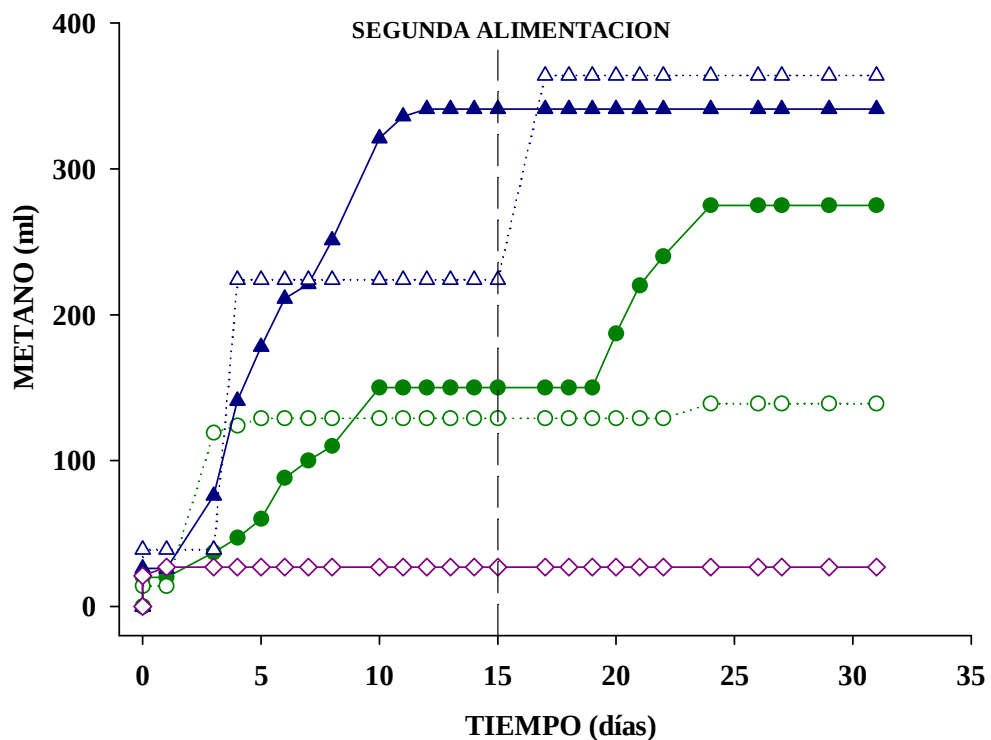
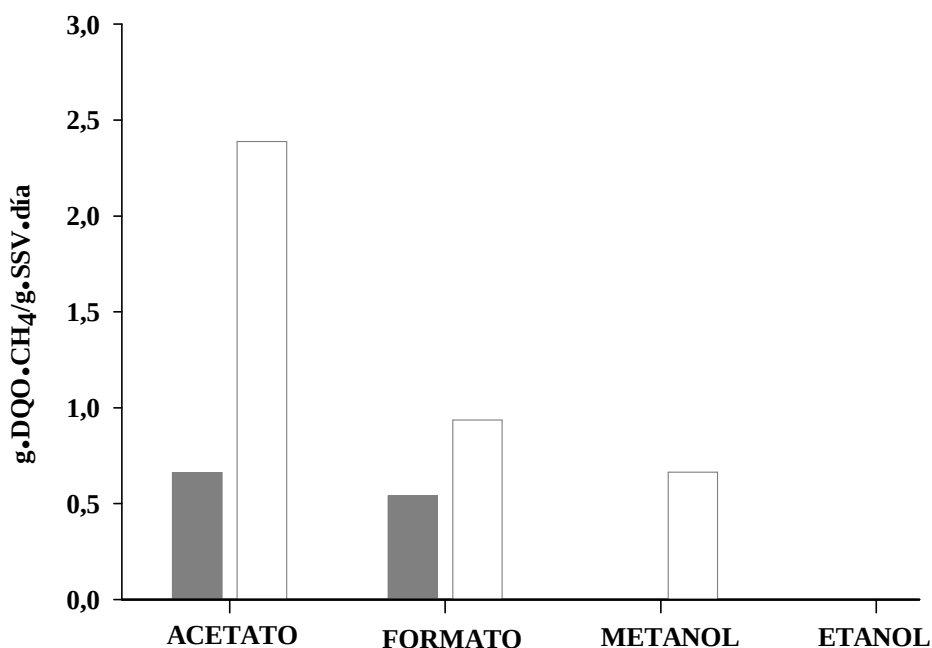
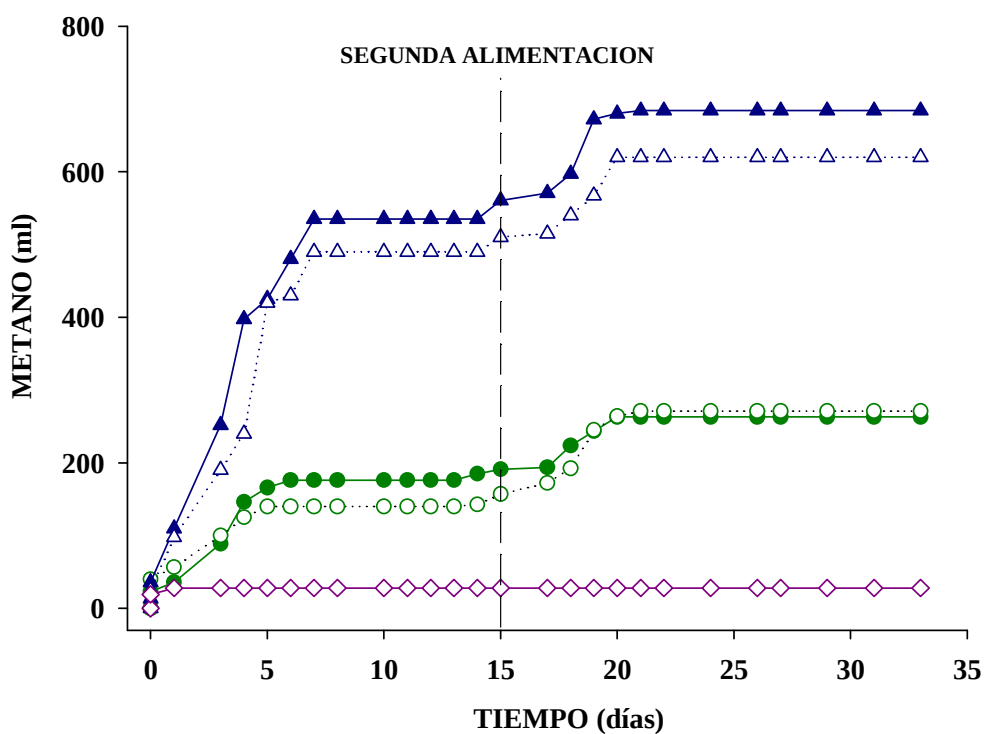


Figura 12. Actividad Metanogénica Específica para el inóculo (barras grises) y para el los lodos procedentes del reactor metanogénico (barras blancas).



La producción de metano para el inóculo utilizado durante la digestión anaerobia de la FORSU se presenta en la Fig. 13. Las bacterias metanogénicas acetoclásticas (BMA) y las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas (BMH) comienzan a utilizar eficientemente el acetato y el formato hasta los 5 días, observándose el inicio de la fase estacionaria, lo cual indica el agotamiento del sustrato. Después de realizada la segunda alimentación las BMA y las BMH comenzaron a producir metano hasta los 20 días del ensayo. La producción de metano para las bacterias metanogénicas del metanol (BMM) y las bacterias metanogénicas del etanol (BME) se inició una vez estos se adicionaron a los ensayos. Después de la segunda alimentación las BMM y BME, presentan una fase exponencial cuyos valores sobrepasaron los 600 ml de metano para las BMM y 680 ml de metano para las BME.

Figura 13. Producción de metano a través del tiempo para los sustratos utilizados en los ensayos de la Actividad Metanogénica Específica del inóculo. (▲) etanol, (△) metanol, (●) acetato, (○) formato, (◇) control.



La mayor producción de metano se observó en los ensayos alimentados con etanol y metanol, sin embargo, este comportamiento no coincide con los resultados obtenidos del cálculo de la actividad metanogénica donde se encontraron valores de 0,66 gDQO-CH₄/gSSV.día para el acetato y 0,54 gDQO-CH₄/gSSV.día para el formato, mientras para el etanol y el metanol no se detectó AME (Fig. 12).

Como resultado de los procedimientos de aislamiento llevados a cabo para los lodos procedentes del reactor metanogénico, se observó la presencia de bacilos filamentosos, utilizadores de acetato, cuyas características morfológicas y bioquímicas correspondían al género *Methanotrix sp* (Fig. 14). También se observó la presencia de cocos irregulares capaces de utilizar varios sustratos, incluyendo acetato y formato pertenecientes al género *Methanosarcina sp* (Fig. 15). Así como representantes de la población metanogénica hidrogenofílica de los géneros *Methanococcus sp* y *Methanobacterium sp*.

Figura 14. Morfología microscópica de *Methanotrix* sp.

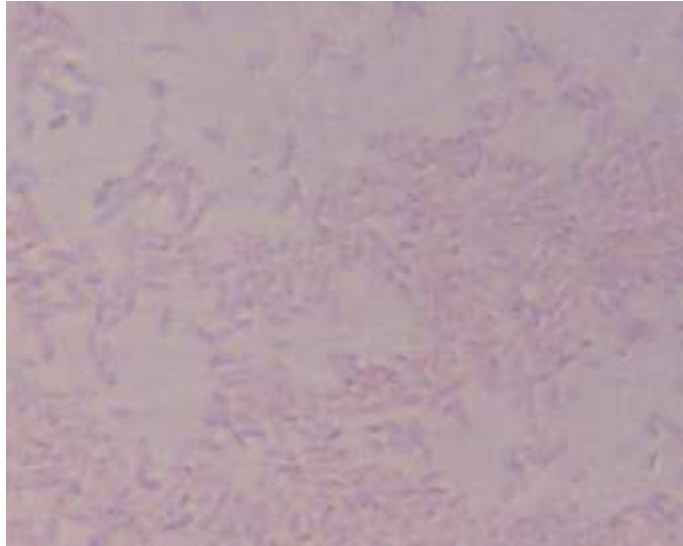
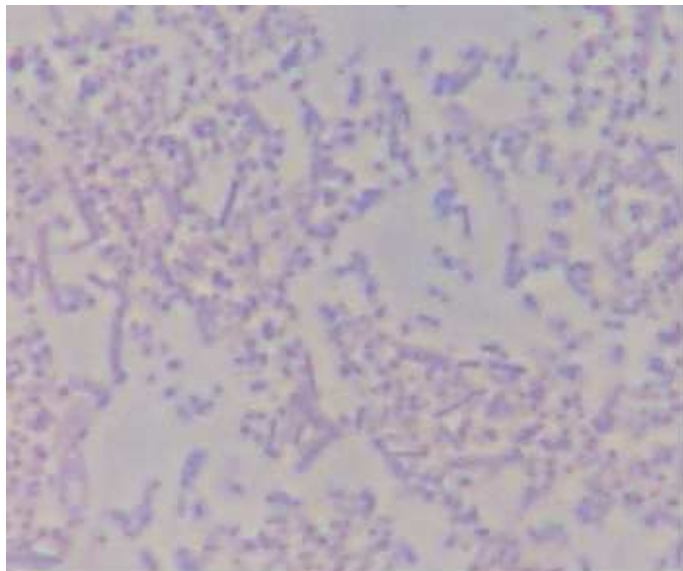


Figura 15. Morfología microscópica de *Methanosarcina* sp.



Fuente: Claudia Johanna Sandoval

6. DISCUSIÓN

La transformación eficiente de la FORSU en los reactores anaerobios requiere del esfuerzo coordinado de varios grupos metabólicos involucrados en la conversión de la materia orgánica en un biogás formado principalmente por metano y dióxido de carbono.

El incremento prolongado en la concentración de los AGV's (25000 mg.L^{-1}) en los lodos procedentes del reactor acidogénico, al igual que los niveles de CO_2 detectados durante el proceso de digestión anaerobia, pueden ser atribuidos a la presencia de una población balanceada de bacterias acidogénicas que transforman la FORSU (Fig. 8). La comparación de los recuentos obtenidos para los diferentes grupos metabólicos en el reactor acidogénico mostró un predominio de la población fermentativa seguida por la acetogénica y la sulfatorreductora, sin embargo, la población de BSR presentó valores más altos ($2.4 \times 10^5 \text{ NMP.ml}^{-1}$) que la población acetogénica ($1.1 \times 10^5 \text{ NMP.ml}^{-1}$) a los 90 días de operación, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de las BSR para utilizar el etanol y el lactato como sustratos, intermediarios que son generados por las bacterias fermentadoras que en ausencia de sulfatos pueden metabolizar estos compuestos transformándolos en acetato, CO_2 e H_2 .

La población de metanógenos acetoclásticos e hidrogenofílicos se incrementó cuando los AGV's fueron consumidos durante la transformación de la FORSU (Fig. 8). En los lodos evaluados del reactor metanogénico hubo un predominio de la población metanogénica del acetato y el formato por el orden de 10^5 NMP.ml^{-1} en

los recuentos realizados a los 30 y 60 días. Sin embargo, se detectó una disminución de la población metanogénica y un aumento en la población sulfatorreductora a los 90 días de operación, sin que aparentemente exista competencia por los sustratos entre estos grupos metabólicos, ya que se detectó actividad metanogénica. Esto nos sugiere que los recuentos de BSR encontrados no afectarían la actividad metanogénica del reactor. Por el contrario, ha sido reportado que en reactores anaerobios en los que la concentración de sulfatos es baja, la población sulfatorreductora podría comportarse como las bacterias acetogénicas, debido al metabolismo fermentativo de esta población, por lo que la transferencia interespecífica de hidrógeno podría llevarse a cabo entre la población sulfatorreductora y metanogénica (Elferink, S. *et al.*, 1998; Mizuno, O. *et al.*, 1998; Zhou, G. and Fang, H. 1998; Fukui, M. *et al.*, 2000; Nielsen, H. *et al.*, 2004; Valdez-Vazquez, E. *et al.*, 2004). Al relacionar este hecho con los valores obtenidos para la población acetogénica (10^5 NMP.ml⁻¹) se puede inferir que la baja concentración de AGV's podría ser el resultado de las interacciones simtróficas encontradas en el sistema, donde las bacterias acetogénicas producen hidrógeno y las BMH o BSR lo consumen.

La prueba de la actividad metanogénica en los lodos procedentes del reactor metanogénico, demostró el establecimiento de una población metanogénica con una prevalencia por la conversión de los sustratos tipos ácidos (2.39 g.DQO-CH₄/g.SSV.día para el acetato y 0,94 gDQO-CH₄/gSSV.día para el formato) que con sustratos tipo alcohol (0.65 gDQO-CH₄/gSSV.día para el metanol y 0 gDQO-CH₄/gSSV.día etanol). Por otro lado, los ensayos de la AME en los lodos utilizados para el arranque del reactor anaerobio en dos fases presentan una mayor capacidad para la conversión del acetato (0,66 gDQO-CH₄/gSSV.día) y del formato (0,54 gDQO-CH₄/gSSV.día). Al comparar los resultados obtenidos de la AME del inóculo y los lodos procedentes de reactor metanogénico se observó un incremento significativo en los ensayos alimentados con el acetato, seguidos por

el formato y el metanol. La preferencia por utilizar el acetato y el formato como sustratos por parte de las bacterias metanogénicas, coincide con los valores obtenidos por el NMP, para las poblaciones metanogénicas. No se encontró la presencia de poblaciones metanogénicas que utilicen el etanol como fuente de carbono durante la digestión anaerobia de la FORSU. Esto sugiere que la adaptación de las poblaciones microbianas de los lodos utilizados como inóculos para el tratamiento de la FORSU, ha sido un proceso efectivo. Los resultados de este estudio coinciden con los reportados por otros investigadores (Fukuzaki, S. *et al.*, 1995; Ince, O. *et al.*, 1995; Coates, J. *et al.*, 1996; Agrawal, L. *et al.*, 1997; Li, Y. Y. *et al.*, 1996; Li, Y. Y. *et al.*, 1997; Alves, M. *et al.*, 1998; Lay J. *et al.*, 1998; Nopharatana, A. *et al.*, 1998; Poetsch, P. and Koetz, P. 1998; Mohammad, J. and Vinod, T. 1996; Mohammad, J. and Vinod, T. 1999; Nielsen, H. *et al.*, 2004).

La presencia de metanógenos acetoclásticos pertenecientes al género *Methanotrix sp* y *Methanosarcina sp* en el reactor metanogénico, posiblemente se debe a que estos microorganismos utilizan el acetato como la principal ruta metabólica para la producción de metano. Por otro lado, la producción de metano a partir del formato sería el resultado de la presencia de la población metanogénica hidrogenofílica (*Methanococcus sp* y *Methanobacterium sp.*) que utilizan este tipo de sustrato. Estos resultados son consistentes con los valores obtenidos del cálculo de la AME, donde se observó la presencia de microorganismos que consumen el acetato y el formato como fuentes de carbono para la producción de metano. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores quienes observaron la presencia de bacilos filamentosos pertenecientes al género *Methanotrix sp* como el metanógeno acetoclástico más abundante en reactores anaerobios. La ventaja competitiva de *Methanotrix sp* sobre *Methanosarcina sp*, puede ser explicada por su alta afinidad por el acetato, mientras el género *Methanosarcina sp* se caracteriza por su habilidad para utilizar múltiples sustratos,

incluyendo hidrógeno y formato, lo cual le confiere una alta tasa de crecimiento y una ventaja competitiva en sistemas estables, en los cuales los niveles de acetato son bajos. (Fukuzaki, S. *et al.*, 1995; Qian, X. and Morton, A. B. 1996; Agrawal, L. *et al.*, 1997; Alves, M. 1998; Griffin, M. *et al.*, 1998; Elferink, S. *et al.*, 1998; McMahon, K. D. *et al.*, 2001; McMahon, K. D. *et al.*, 2004; Ince, B. *et al.*, 2003)

Los resultados presentados en este estudio aportan evidencia sobre la dinámica poblacional en reactores anaerobios que tratan la FORSU. Sin embargo, la complejidad de estos sistemas hace difícil concluir acerca de todas las interacciones del proceso.

7. CONCLUSIONES

La digestión anaerobia en dos fases es un proceso adecuado para la degradación de la FORSU, de acuerdo con los resultados de la cuantificación de los distintos grupos metabólicos involucrados en ella, que permitió correlacionar la estabilidad de los reactores anaerobios con el crecimiento de estos grupos.

El análisis de resultados de nuestra investigación indican que es importante encontrar un balance entre las poblaciones al interior de los reactores para convertir la FORSU en metano.

En el reactor metanogénico no se detectó competencia por los sustratos entre la población sulfatorreductora y la metanogénica, lo cual es atribuido a los efectos de sinergismos entre estos microorganismos.

La prueba de la AME con el etanol mostró que este sustrato posiblemente no fue utilizado para la producción de metano por parte de las BMM.

En el reactor metanogénico se presentó una producción de metano sostenida evidenciada por los valores de AME relativamente altos para el acetato y el formato, lo cual sugiere que este parámetro puede ser un indicador que permite determinar las condiciones de estabilidad de los reactores anaerobios.

Los lodos procedentes del reactor metanogénico se consideran un inóculo adecuado para el arranque de nuevos reactores anaerobios para el tratamiento de la FORSU, de acuerdo a la eficiencia obtenida en la producción de metano y la población microbiana reportada.

8. RECOMENDACIONES

Aunque se identificaron géneros de las poblaciones metanogénicas, es indispensable realizar nuevas investigaciones para la identificación *in situ*, empleando técnicas moleculares que permitan determinar la población microbial involucrada en la digestión anaerobia en dos fases de la FORSU.

Se recomienda determinar la producción de hidrógeno ya que su acumulación puede provocar la inhibición de la acetogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

ACUARIO, G., ROSSIN, A., TEIXEIRA, P. y ZEPEDA, F. 1997. Diagnóstico de la situación del manejo de Residuos Sólidos Municipales en América Latina y el Caribe. Publicación conjunta del Banco Interamericano de Desarrollo y la Organización Panamericana. Washington, D.C. Julio. No.ENV.97-107.

AĞDAĞ, O. N. and SPONZA, D. T. 2005. Co-digestion of industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling reactors. *Process Biochemistry*. 40:1871–1879.

AGRAWAL, L. K., HARADA, H., TSENG, I-C. and OKUI, H. 1997. Treatment of dilute wastewater in a UASB reactor at a moderate temperature: microbiological aspects. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 83(2): 185-190.

ALVES, M., PEREIRA, A., MOTA, M., NOVAIS, J. and COLLERAN, E. 1998. Staged and non-staged anaerobic filters: microbial activity segregation, hydrodynamic behaviour and performance. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 99-108.

ANDERSON, G. K. and YANG, G. 1992. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environ. Res.* 64: 53-59.

APHA, AWWA and WEF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19 th edition. *American public Health Association*. Washington, D.C. USA.

BELIAEFF, B. and MARY, J-Y. 1993. The most probable number estimates and the usefulness of confidence intervals. *Wat. Res.* 29(4): 1213-1214.

BEZAMA, A., AGUAY, P., KONRAD, O., NAVIA, R. and LORDER, K. 2007. Investigations on mechanical biological treatment of waste in South America: Towards more sustainable MSM management strategies. *Waste Management*. 27(2): 228-237.

BOUALLAGUI, H., TORRIJOS, M., GODON, J. J., MOLETTA, R., CHEIKH, R. B., TOUHAMI, Y., DELGENES, J. P. and HAMDI, M. 2004. Two-phases anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: bioreactors performance. *Biochemical Engineering Journal*. 21:193–197.

BOUALLAGUI, H., TOUHAMI, Y., CHEIKH, R. B. and HAMDI, M. 2005. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*. 40: 989–995.

BORGLIN, S. E., HAZEN, T. C. and OLDENBURG, C. M. 2004. Comparison of Aerobic and Anaerobic Biotreatment of Municipal Solid Waste. *J. Air & Waste Manage.* 54:815–822.

BORZACCONI, L., LÓPEZ, I. and VIÑAS, M. 1995. Application of anaerobic digestión to the treatment of agroindustrial effluents in Latin America. *Wat. Sci. Tech.* 32(12): 105-111.

BRIONES, A. M. and WOLFGANG, R. 1999. Estimating microbial population counts by ‘most probable number’ using Microsoft Excel. *Journal of Microbiological Methods*. 35: 157-161.

BRYANT, M. P. 1979. Biological methane production theoretical aspects. *Journal of animal science*. 48(1): 193-201.

CASTILLO, E., CRISTANCHO, D. and ARELLANO, V. 2006. Study of the operational conditions for anaerobic digestion of urban solid wastes. *Waste Management*. 26:546–556.

CAMPOS, A. 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria universitat de lleida. Tesis de doctorado. Escola tècnica superior d'Enginyeria Agrària Departament de Medi Ambient i Ciències del Sòl Laboratori d'Enginyeria Ambiental (LEA).

COATES, J., COUGHLANB, M. and COLLERANB, E. 1996. Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *Journal of Microbiological Methods*. 26: 237-246.

COGÁN, A. M. y RODRÍGUEZ, I. C. 2000. Diagnóstico, análisis y planteamiento de alternativas ambientales para minimizar la contaminación originada por los residuos tóxicos y peligrosos en el vertedero municipal el carrasco. Tesis de Grado. *Universidad Industrial de Santander (UIS)*. Pág. 73.

de BOK, F. A. M., PLUGGE, C. M. and STAMS, A. J. M. 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*. 38: 1368–1375.

DEMIRER, G. N. and CHEN, S. 2005. Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. *Process Biochemistry*. 40: 3542–3549.

DEMIREL, B. and YENIGUN, O. 2006. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource Technology*. 97: 1201–1208.

DIAZ, M., ESPITIA, V. y MOLINA, P. 2002. Digestión Anaerobia. Una aproximación a la Tecnología. *Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología*. Primera edición.

DOWELL, R. 1972. Comparison of techniques for isolation and identification of anaerobic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 25: 1335-1343.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. [Base de datos en línea]. Versión en HTML. Braunschweig (Germany), 2000. Disponible en Internet: <http://www.dsmz>.

ELFERINK, S. J. W. H., VORSTMAN W. J. C., SOPJES, A. and STAMS, A. J. M. 1998. Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater. *FEMS Microbial. Rev.* 27, 185-194.

ERIKSSON, O., REICH, M. C., FROSTELL, B., BJÖRKLUND, A., ASSEFA, G., SUNDQVIST, J. -O., GRANATH, J., BAKY, A. and THYSELIUS, L. 2005. Municipal solid waste management from a systems perspective. *Journal of Cleaner Production*. 13: 241–252.

FUKUI, M., SUH, J. and URUSHIGAWA, Y. 2000. In situ substrates for sulfidogens and methanogens in municipal anaerobic sewage digesters with different levels of sulfate. *Wat. res.* 34(5):1515-1524.

FUKUZAKI, S., NISHIO, N. and NAGAI, S. 1990a. Kinetics of the Methanogenic Fermentation of Acetate. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(10):3158-3163.

FUKUZAKI, S., NISHIO, N., SHOBAYASHI, M. and NAGAI, S. 1990b. Inhibition of the Fermentation of Propionate to Methane by Hydrogen, Acetate, and Propionate. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(3): 719-723.

FUKUZAKI, S., NISHIO, N. and NAGAI, S. 1995. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates. *Journal of fermentation and bioengineering*. 79(4): 354-359.

FRICKE, K., SANTEN, H. and WALLMANN, R. 2005. Comparison of selected aerobic and anaerobic procedures for MSW treatment. *Waste Management* 25: 799–810.

GALLERT, C. and WINTER, J. 2005. Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems. *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications*. Edited by H.-J. Jördening and J. Winter 1-48.

GARCIA, J-L., PATEL, B. K. C. and OLLIVIER, B. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe*. 6: 205-226.

GARCIA, J-L. 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 87: 297-308.

GONZALEZ, J. M. 1996. A general purpose program for obtaining Most Probable Number tables. *Journal of Microbiological Methods*. 26: 215-218.

GRIFFIN, M. E., McMAHON, K. D., MACKIE, R. I. and RASKIN, L. 1998. Methanogenic population dynamics during start-up anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering*. 57(3): 342-355.

GROTENHUIS, J. T. C., SMIT, M., PLUGGE, C. M., YUANSHENG, X., VAN LAMMEREN, A. A. M., STAMS, A. J. M. and ZEHNDER, A. J. B. 1991. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(7): 1942-1949.

HARNZAWI, N., KENNEDY, K. J. and MCLEAN, D. D. 1998. Anaerobic digestion of co-mingled municipal solid waste and sewage sludge. *Wat. Sci. Tech.* 38(2): 127-132.

HARTMANN, H. and AHRING, B. 2005. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. *Water Research* 39: 1543–1552.

HEDRICK, D. B., WHITE, T., GRUCKERT, J. B., JEWELL, W.J. and WHITE, D. 1992. Microbial biomass and community structure of a phase-separated methanogenic reactor determined by lipid analysis. *Journal of industrial Microbiology*. 9: 193-199.

HORIUCHI, J. I., SHIMIZU, T., TADA, K., KANNO, T. and KOBAYASHI, M. 2002. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*. 82:209–213.

HUTÒAN, M., MRAFKOVÁ, L., DRTIL, M. and DERCO, J. 1999. Methanogenic and nonmethanogenic activity of granulated sludge in anaerobic baffled reactor. *Chem. Papers*. 53(6): 374-378.

HU, Z-H., WANG, G. and YU, H-Q. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*. 21:59-62.

INCE, B. K., INCE, O. and AYMAN OZ, Nn. 2003. Changes in acetoclastic methanogenic activity and microbial composition in an Upflow Anaerobic Filter. *Water, Air, and Soil Pollution*. 144: 301–315.

INCE, O. G., ANDERSON, G. K. and KASAPGIL, B. 1995. Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system. *Wat. Res.* 29(1): 349-355.

INCE, O. G., ANDERSON, G. K. and KASAPGIL, B. 1997. Composition of the microbial population in a membrane anaerobic reactor system during start-up. *Wat. Res.* 3(1): 1-10.

KIM, M., AHN, Y-H. and SPEECE, R. E. 2002. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Research* 36: 4369–4385.

KOTSYURBENKO, O. R. 2005. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*. 53: 3–13.

LAY, J. J., LI, Y. Y. and NOIKE, T. 1998. Dynamics of methanogenic activities in a landfill bioreactor treating the organic fraction of municipal solid wastes. *Wat. Sci. Tech.* 38(2):177-184.

LEITÃO, R. C., VAN HAANDEL, A. C., ZEEMAN, G. and LETTINGA, G. 2006. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresource Technology*. 97: 1105–1118.

LI, Y. Y., NOIKE, T., KATSUMATA, K. and KOUBAYASHI, H. 1996. Performance analysis of the full-scale egg-shaped digester in treating sewage sludge of high concentration. *Wat. Sci. Tech.* 34(3-4): 483-491.

LI, Y. Y., MIZUNO, O., MIYAHARA, T., NOIKE, T. and KATSUMATA, K. 1997. Ecological analysis of the bacterial system in a full-scale egg-shaped digester treating sewage sludge. *Wat. Sci. Tech.* 36(6-7): 471-478.

LIU, J., OLSSON, G. and MATTIASSON, B. 2004. On-line monitoring of a two-stage anaerobic digestion process using a BOD analyzer. *Journal of Biotechnology*. 109: 263–275.

LOPES, W. S., DUARTE, L. and SHIVA, P. 2004. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 94: 261–266.

MATA-ALVAREZ, J. and LLABRÉS, S. M. P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. 74: 3-16.

MICHAUD, S., BERNET, N., BUFFIERE, P. and DELGENES, J. P. 2005. Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. *Process Biochemistry*. 40(8): 2751–2755.

Ministerio de Ambiente, Vivienda y desarrollo Territorial (MAVDT). República de Colombia. 2005.

- MIZUNO, O., LI, Y. Y. and NOIKE, T. 1998. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogénico phase of anaerobic digestion. *Wat. Res.* 32 (5): 1626-1634.
- MOHAMMAD, J. and VINOD, T. 1996. Methanogenic activity and performance of UASB, DSFF and USFF reactors. *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6): 483-487.
- MOHAMMAD, J. and VINOD T. 1999. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA.* 25(3): 345-350.
- McHUGH, S., CARTON, M., COLLINS, G. and O'FLAHERTY, V. 2004. Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16–37 °C. *FEMS Microbiology Ecology.* 48: 369–378.
- McMAHON, K. D., STROOT, P. G., MACKIE, R. I. and RASKIN, L. 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions II: microbial population dynamics. *Wat. Res.* 35(7): 1817–1827.
- McMAHON, K. D., ZHENG, D., STAMS, A. J. M., MACKIE, R. I. and RASKIN, L. 2004. Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnology and Bioengineering.* 87(7): 823 – 834.
- NIELSEN, H. B., MLADENOVSKA, Z., WESTERMANN, P. and AHRING, B. K. 2004. Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55 °C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering* 86(3): 291-300.
- NOPHARATANA, A., CLARKE, W. P., PULLAMMANAPPALLIL, P. C., SILVEY P. and CHYNOWETH, D. P. 1998. Evaluation of methanogenic activities during

anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 6(4):169-174.

PACHECO, J. and MAGAÑA, A. 2003. Arranque de un reactor anaerobio. *Ingeniería*. 7(1): 21-25.

PAVLOSTATHIS, S. G. and GIRALDO-GOMEZ, E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Control*. 21:411-490.

POETSCH, P. and KOETZ, P. R. 1998. Sistema de determinação da atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios. *Rev. Bras. de agrociência* 4 (3): 161-165.

PLAZA, G., ROBREDO, P., PACHECO, O. and TOLEDO A. 1996. Anaerobic treatment of municipal solid waste. *Wat. Sci. Tech.* 33(3): 169-175.

QIAN, X. and MORTON, A. B. 1996. Enumerations of anaerobic refuse-decomposing microorganisms on refuse constituents. *Waste Management & Research* 14: 151–161.

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.

SACHS, J., MEYER, U., RYS, P. and FEITKENHAUER, H. 2003. New approach to control the methanogenic reactor of a two-phase anaerobic digestion system. *Water Research*. 37: 973–982.

- SCHMIDT, J. E. and AHRING, B. 1996. Review Granular Sludge Formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(3):229-246.
- SCHINK, B. 2002. Anaerobic digestion: concepts, limits and perspectives. *Water science and technology*. 45(10):1-8.
- SEGHEZZO, L. 2004. Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions. Thesis Wageningen University.
- SEKIGICHI, Y., KAMAGATA, Y. and HARADA, H. 2001. Recent advances in methane fermentation technology. *Environmental Biotechnonology*. 12: 277-282.
- SOLERA, R., ROMERO, L. I. and SALES, D. 2001. Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods. *Anaerobe* 07: 79–86.
- SOSNOWSKI, P., WIECZORECK, A. and LEDAKOWICZ, S. 2003. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Enviromental Research*. 7: 609-616.
- STALEY, J., BRIANT, M., PFENNIG, N. and HOIT, J. 2000. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkilms. Volumen 3.
- TRAJSTMAN, A. C. 1996. A note on the characterization of the most probable number. *Statistics & Probability Letters*. 29:293-295.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I., RÍOS-LEAL, E., ESPARZA-GARCÍA, F., CECCHI, F. and POGGI-VARALDO. 2004a. Hydrogen production from the organic fraction of

municipal solid waste using semi-continuous solid substrate anaerobic reactors: influence of the temperature. Proceedings of the H₂-age Conference: When, Where, Why. Pierucci S. (ed) AIDIC Publ, 16-19/May, Pisa, Italy.

VALDEZ-VAZQUEZ, I., RIOS-LEAL, E., ESPARZA-GARCÍA, F., CECCHI, F. PAVAN, P. and POGGI-VARALDO, H. 2004b. A review on hydrogen production with anaerobic mixed cultures. Proceedings of the H₂-age Conference: When, Where, Why. Pierucci S. (ed) AIDIC Publ, 16-19/May, Pisa, Italy.

VALENTINE, D. 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 271–282.

VAN LIER, J. B., TILCHE, A., AHRING, B. K., MACARIE, H., MOLETTA, R., DOHANYOS, M., HULSHOFF POL, L. W., LENS, P. and VERSTRAETE, W. 2001. New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. 43(1):1–18.

VEEKEN, A. and HAMELERS, B. 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technology*. 69: 249-254.

VOOLAPALLI, R. and STUCKEY, D. 1999. Relative importance of trophic group concentrations during anaerobic degradation of volatile fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1): 5009–5016.

WHEATLEY, A. 1990. Anaerobic digestion: A waste treatment technology. *Critical reports on Applied Chemistry*. Volume 31.

WANG, Q., NOGUCHI, C.K., KUNINOBU, M., HARA, Y., KARIMOJO, K., OGAWA, H.I. and KATO, Y. 1997. Influence of hydraulic retention time on anaerobic digestion of pretreated sludge. *Biotechnology Techniques* 11(2):105-108.

WANG, J., SHEN, D. and XU, Y. 2006. Effect of acidification percentage and volatile organic acids on the anaerobic biological process in simulated landfill bioreactors. *Process Biochemistry* 41:1677–1681.

WU, M-C., SUN, K-W. and ZHANG, Y. 2006. Influence of temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of municipal organic solid waste. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 7(3):180-185.

YU, H. W., HANSON, A. and SMITH, G. 2002. Energy recovery from grass using two-phase anaerobic digestion. *Waste Management*. 22: 1-5.

ZEIKUS, J. G. 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. *Bacteriological Rev.* 41(2): 514-541.

ZHOU G. and FANG, H. 1998. Competition between methanogenesis and sulfidogenesis in anaerobic wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 38(8-9): 317-324.

ANEXO A

ACTIVIDAD METANOGÉNICA ESPECÍFICA (AME)

1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo se realiza a escala de laboratorio en botellas de mariotte de 500 ml, empleando un medio de cultivo que contiene micro y macronutrientes, se adiciona el sustrato seleccionado y el inóculo en estudio bajo condiciones de anaerobiosis. Para el seguimiento de la actividad se mide la cantidad de metano por el método de desplazamiento de líquido. El biogás producido se burbujea en una solución alcalina (NaOH o KOH) con $\text{pH} > 12$ en la que el CO_2 es absorbido y el metano desplazara un volumen igual a la solución.

2. MATERIALES Y EQUIPOS

- ✓ Botellas de mariotte de 500 ml, con tapón de caucho y selladas herméticamente.
- ✓ Sistema de mangueras y agujas para comunicar las botellas.
- ✓ Incubadora o baño de María.
- ✓ Solución de NaOH con fenoftaleina como indicador de pH.
- ✓ Medio de cultivo.
- ✓ Solución de nutrientes.
- ✓ Analizador de gases (Bacharach) modelo GA-94 para la detección de metano.

3. SEGUIMIENTO

Determinar diariamente la producción de metano a intervalos de tiempo regulares. Es importante agitar la botella que contiene el lodo antes de la lectura para liberar el gas del lodo y conseguir mayor contacto entre el sustrato y el lodo. Las lecturas se realizan hasta cuando la producción de metano sea constante a través del tiempo.

4. CÁLCULOS

1. Construir una gráfica de volumen (ml) acumulado de metano en (Y) contra tiempo acumulado en horas (X).
2. Seleccionar la zona de mayor pendiente de la curva y calcular el valor numérico de dicha pendiente, la cual esta expresada en (ml de CH₄/h).

Para calcular la AME se utiliza la siguiente ecuación:

$$AME = (P * 24) / (FC * V * SSV)$$

Donde,

P: Pendiente de curva en ml/h.

FC: Factor de conversión de DQO a CH₄, en ml CH₄/g DQO. Este valor dependerá de la temperatura y presión. (Tabla 8).

V: Volumen del los utilizado en el ensayo en litros.

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles.

Tabla 8. Factores de conversión de gramos de DQO a mililitros de CH₄, bajo diferentes temperaturas y a una presión de 1 atmósfera *.

TEMPERATURA (°C)	ml CH ₄ seco /g de DQO	ml CH ₄ húmedo / g de DQO
10	363	367
15	369	376
20	376	385
25	382	394
30	388	405
35	395	418
40	401	433
45	408	450
50	414	471

* Si la determinación de la AME se realiza a mayores altitudes sobre el nivel del mar, se puede corregir el factor de conversión para la presión atmosférica, así: $FC \times 760 / \text{presión atmosférica del lugar (mm de mercurio)}$.

ANEXO B

RECuento DE LOS GRUPOS METABOLICOS POR NÚMERO MAS PROBABLE (NMP)

1. PRINCIPIO DEL METODO

Se realizan diluciones seriadas del lodo en estudio, con las diluciones seleccionadas se inoculan tres viales por dilución; se identifican los tubos positivos de acuerdo con las características de cada grupo bacterial, realizando los cálculos del número mas probable con base en la tabla de probabilidades reportada por el Standard Methods (APHA, 1995).

2. MATERIALES Y EQUIPOS

- ✓ Medios de cultivo y agua reducida.
- ✓ Botellas serologicas de 60 ml y 500 ml.
- ✓ Cámara de anaerobiosis.
- ✓ Incubadora a 35°C.
- ✓ Analizador de gases (Bacharach) modelo GA-94 para la detección de metano.

3. PROCEDIMIENTO

La muestra de lodo se introduce en la cámara de anaerobiosis para realizar las diluciones; se diluye 1 ml de lodo en 9 ml de agua reducida.

La inoculación de los viales se realiza con jeringas, bajo flujo de N₂ teniendo las precauciones necesarias para evitar la contaminación de los medios; se inocula 0.2 ml por tubo de dilución correspondiente, se siembran 3 tubos por dilución.

La incubación se realiza a 35°C durante el periodo recomendado para cada grupo metabólico.