

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS SOPORTADAS EN UN
SISTEMA DE LECHO FIJO UTILIZADO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA
FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

MARISOL VERGARA MENDOZA
CÓDIGO: 2047225

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2017

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS SOPORTADAS EN UN
SISTEMA DE LECHO FIJO UTILIZADO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA
FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

MARISOL VERGARA MENDOZA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN INGENIERÍA QUÍMICA

DIRECTOR
RODRIGO TORRES SÁEZ
DOCTOR EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2017

AGRADECIMIENTOS

La realización y finalización de esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo financiero del Departamento de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (COLCIENCIAS), la Universidad Industrial de Santander (UIS) y el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM).

Deseo agradecer a mis compañeros y amigos que me acompañaron durante este recorrido para lograr este objetivo.

A mi director, el profesor Rodrigo Torres quien llegó a apoyarme en este camino con su amplio conocimiento en Bioquímica y a impulsarme con su ánimo para no desfallecer en los innumerables momentos críticos presentados.

A la Doctora Paola Poirrier de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile) por haberme dado la oportunidad de estar en su grupo de investigación durante mi pasantía y con ello lograr acceder a una fuente de conocimiento técnico soporte para mi investigación.

Al profesor Edgar Castillo quien me acompañó como director en el inicio de este camino.

A mis inolvidables compañeros, amigos y confidentes del CEIAM; Doña Luci, Zulmita, Claudia, Paty, Yane, Karina, Lucero, Aldemar, Diego.

A la Vivi, Franz, Pancha, Carlos, Lizeth, Romi y compañeros Chilenos que hicieron todo lo posible por hacerme sentir en casa, mientras estuve con ellos en la ciudad de Valparaíso.

A toda mi familia, mi abuela, mi madre, mi hermana, mis sobrinos y a mi hijo Tomás Haziél quien ha sido el motor principal en este arduo camino.

MARISOL

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	18
1. SELECCIÓN DEL INÓCULO Y DIGESTIÓN ANAEROBIA DE SUSTRATOS ORGÁNICOS.....	28
1.1 FUNDAMENTO TEÓRICO.....	29
1.1.1 Factores que afectan la Digestión Anaerobia.....	31
1.1.2 Inóculos empleados en la Digestión Anaerobia.....	34
1.1.3 Actividad Metanogénica Específica (AME).....	36
1.1.4 Relación inóculo sustrato (RIS).....	36
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1.2.1 Selección de inóculo.....	37
1.2.1.1 Determinación de la Actividad Metanogénica Específica (AME).....	38
1.2.1.2 Producción específica de metano para los inóculos con FO de RSU como sustrato.....	39
1.2.2 Digestión Anaerobia de residuos orgánicos con inóculo seleccionado.....	41
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
1.3.1 Selección del inóculo.....	43
1.3.1.1 Medición de la Actividad Metanogénica Específica.....	43
1.3.1.2 Producción específica de Metano con FO de RSU como sustrato.....	46
1.3.2 Digestión anaerobia de residuos orgánicos con inóculo seleccionado.....	55
2. SELECCIÓN DEL TIPO DE SOPORTE PARA REACTOR METANOGENICO DE PELÍCULA ADHERIDA.....	63
2.1 CONFIGURACIÓN DE REACTORES.....	65
2.2 SOPORTES PARA REACTORES DE PELÍCULA ADHERIDA.....	67
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
2.3.1. Primera etapa experimental con sustrato modelo.....	69
2.3.2. Segunda etapa experimental con sustrato real.....	72
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
2.4.1 Primera etapa experimental con sustrato modelo.....	74
2.4.2. Segunda etapa experimental con sustrato real.....	81

3. BIOQUIMICA DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN REACTOR DE PELÍCULA ADHERIDA	90
3.1 MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA (DA)	90
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	95
3.2.1 Conteo por grupos metabólicos.	95
3.2.2 Conteo por sensibilidad al oxígeno.	97
3.2.3 Aislamiento e identificación de bacterias metanogénicas.	98
3.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	99
3.3.1 Microbiología del Inóculo	99
3.3.1.1 Recuentos por sensibilidad al oxígeno.	99
3.3.1.2 Conteo grupos metabólicos.....	100
3.3.2 Microbiología de la primera fase experimental (cuatro reactores con glucosa como sustrato).....	101
3.3.3 Microbiología de la segunda fase experimental (reactor de película adherida con sustrato real).....	103
3.3.3.1 Recuentos por sensibilidad al oxígeno.	103
3.3.3.2 Recuento por grupos metabólicos.....	104
3.3.3.3 Aislamiento e identificación de bacterias metanogénicas.	106
4. MODELO MATEMÁTICO REACTOR BIOPELÍCULA	110
4.1 INTRODUCCIÓN	110
4.2 REACTORES DE BIOPELÍCULA	111
4.3 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.....	112
4.3.1 Fijación de microorganismos.....	114
4.3.2 Desprendimiento de microorganismos.	115
4.3.3 Diagrama conceptual.	117
4.4 MODELOS MATEMÁTICOS	118
4.5 ESTRUCTURA DEL MODELO	122
4.5.1 Suposiciones del modelo.	124
4.5.2 Balance de sustrato y biomasa suspendida en el reactor.....	125
4.5.3 Crecimiento de la biopelícula.	126
4.5.4 Parámetros cinéticos.....	127
4.5.4.1 Determinación de densidad de la biopelícula.	128
4.5.4.2 Coeficiente de transferencia de masa.	128

4.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
5 CONCLUSIONES	142
6. RECOMENDACIONES.....	145
7. BIBLIOGRAFÍA.....	146
ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y), COEFICIENTE DE DESPRENDIMIENTO (b).....	165
ANEXO B. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VELOCIDAD MEDIA DE MONOD (K_s) Y VELOCIDAD MAXIMA DE UTILIZACIÓN DE MONOD (k).....	166
ANEXO C. RESULTADOS POLYMATH	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de residuos orgánicos en países Latinoamericanos. Tomado de Hoormweg and Bhada-Tata	20
Figura 2. Evolución del número de instalaciones de DA en Europa (Mesofílicas vs. Termofílicas). Tomado de Open-BIO	21
Figura 3. Representación esquemática de la Digestión Anaerobia (Modificado de Zhu)	31
Figura 4. Secuencia experimental para selección del inóculo de acuerdo con la producción específica de metano con FO de RSU como sustrato. Tomado de Castillo et al.; (2006).	41
Figura 5. Diagrama de metodología utilizada en la DA de residuos orgánicos con el inóculo seleccionado.....	42
Figura 6. Evolución de la producción de metano para los lodos PTAR, porcícola y su mezcla a 37 ° C.	44
Figura 7. Comparación análisis ANOVA de producción de metano de los inóculos evaluados.	44
Figura 8. Actividad Metanogénica Específica de los lodos evaluados.	46
Figura 9. Evolución del pH durante la producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato (25 °C ± 2 °C, 8 %ST) y (37 °C ± 2 °C 12 % ST).	49
Figura 10. Producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato (25 °C ± 2 °C, 8 %ST) y (37 °C ± 2 °C 12 % ST).	50
Figura 11. Comparación análisis ANOVA de la producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato (25 °C ± 2 °C, 8 %ST) y (37 °C ± 2 °C 12 % ST).....	51
Figura 12. Producción específica de metano en los reactores de biodegradación anaerobia de residuos sólidos utilizando diferentes tipos de inóculo.	54
Figura 13. Composición porcentual de gases producidos durante la producción específica de metano de FO de RSU utilizando diferentes inóculos. Nota: Los valores expuestos representan el promedio durante toda la operación de los reactores.	55
Figura 14. Producción de metano de los diferentes residuos (R) a 25 °C ± 2 y 37 ° C ± 2 para cada RIS evaluada.	56
Figura 15. Evolución de AGVs y pH para las diferentes RIS a 25 °C ± 2 y 37 ° C ± 2 de temperatura.	58
Figura 16. Rendimiento en producción de metano para diferentes RIS a 25 °C ± 2 y 37 ° C ± 2 de temperatura.....	60
Figura 17. Rendimiento en producción de metano para diferentes RIS a 25 °C ± 2 y 37 ° C ± 2 de temperatura con adición de micronutrientes en los reactores.....	62
Figura 18. Forma de soporte utilizado en la batería de experimentación para la selección del soporte.	70
Figura 19. Montaje de la batería de experimentación para la evaluación de los cuatros soportes para inmovilización de células durante el proceso de biodegradación en reactores anaerobios de película adherida.	71
Figura 20. Montaje de reactor de dos litros para la evaluación del soporte seleccionado para la inmovilización de células durante el proceso de biodegradación en reactor anaerobio de película adherida.....	73
Figura 21. Reactor CSTR Hidrolítico/Acidogénico con FO de RSU como sustrato. Fuente: CEIAM.	74
Figura 22. Variación del pH durante el proceso de biodegradación en reactores anaerobios de película adherida usando diferentes tipos de soporte para inmovilización de células. Tipo de soporte: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4-	

Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, carga orgánica =10 kg DQO/m ³ ·d, TRH = 10 días.	75
Figura 23. Producción de AGV's durante el proceso de biodegradación de glucosa en cuatro (4) reactores anaerobios de película utilizando diferentes tipos soportes para la formación de película adherida e inmovilización celular. Tipo de soporte: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, carga orgánica =10 kg DQO/m ³ ·d, TRH = 10 días.	76
Figura 24. Efecto del tipo de soporte de inmovilización celular sobre el proceso de remoción de carga orgánica (DQO) en los cuatro reactores anaerobios de biopelícula. Tipo de soporte: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, carga orgánica =10 kg DQO/m ³ ·d, TRH = 10 días.....	77
Figura 25. Producción de metano de cada uno de los biorreactores anaerobios de biopelícula utilizando diferentes tipos de soportes: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, carga orgánica =10 kg DQO/m ³ ·d, TRH = 10 días.....	79
Figura 26. Registro fotográfico de la biopelícula formada sobre cada uno de los soportes utilizados al finalizar la etapa de experimentación. Tipos de soportes: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, carga orgánica =10 kg DQO/m ³ ·d, TRH = 10 días.	81
Figura 27. Variación del pH durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en reactor anaerobio de película adherida usando ladrillo cerámico como soporte para la inmovilización de células. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m ³ ·d.....	82
Figura 28. Producción de AGV's y evolución de alcalinidad durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en el reactor con ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m ³ ·d.....	83
Figura 29. Relación AGV/Alcalinidad durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en reactor de película adherida. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m ³ ·d.....	84
Figura 30. Variación de los sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos fijos (SSF) del reactor con ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m ³ ·d.	85
Figura 31. Concentración de biogás del reactor con ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m ³ ·d.....	86
Figura 32. Producción de metano durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en reactor de ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m ³ ·d.....	87
Figura 33. Esquema general de las enzimas microbianas y bacterias involucradas en la DA. Tomado de Divya et al.; (2015).	91

Figura 34. Siembras para el recuento de sensibilidad al oxígeno para mohos y levaduras y bacterias anaerobias.....	100
Figura 35. Recuentos de sensibilidad al oxígeno para el inóculo de mezcla lodo PTAR+ lodo porcícola.	100
Figura 36. Recuento de grupos tróficos del inóculo mezcla lodo PTAR + lodo Porcícola.	101
Figura 37. Grupos microbianos relacionados con el metabolismo bacteriano para los cuatro reactores de la primera fase experimental, expresado en NMP mL ⁻¹	102
Figura 38. Grupos microbianos relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el inóculo y reactor de biopelícula expresados en UFC. mL ⁻¹	104
Figura 39. Grupos microbianos relacionados con el metabolismo bacteriano para el inóculo y el reactor de biopelícula, expresado en NMP mL ⁻¹	105
Figura 40. Morfología microscópica de Methanotrix sp. encontrada en el reactor de biopelícula.	107
Figura 41. Morfología microscópica de Methanosarcina sp. encontrada en el reactor de biopelícula.	107
Figura 42. Etapas del desarrollo de una biopelícula. Tomado de P. Dirckx.	113
Figura 43. Cinco modos de desprendimiento de Biopelícula: abrasión, atrapamiento, erosión, maduración y dispersión. Tomado de Davies	116
Figura 44. Diagrama conceptual de un sistema de Biopelícula. Tomado de: Evaluación y modelado de la cinética de depuración anaerobia de vinazas de la industria alcoholera. Jorge Del Real Olvera.	117
Figura 45. Esquema de estructura de biopelícula tipo hongo. Tomado de P. Dirckx ...	120
Figura 46. Metodología de desarrollo del modelo.....	123
Figura 47. Estructura y perfiles de concentración hipotéticos en la biopelícula. Tomado de Mathematical Modeling Biofilms, 2008.	124
Figura 48. Comparación resultados del modelo y experimental de la concentración de sustrato en el seno del líquido (S _b) para el reactor con LADRILLO como soporte. Factor de correlación de 0.9401.	133
Figura 49. Comparación análisis ANOVA de datos experimentales y modelo para S _b en reactor con ladrillo como soporte.	134
Figura 50. Comparación resultados del modelo y experimental de la concentración de biomasa suspendida en el seno del líquido (X _b) para el reactor de película adherida. Factor de correlación de 0.9695.	135
Figura 51. Comparación análisis ANOVA de datos experimentales y modelo para X _b en reactor de película adherida.....	136
Figura 52. Comparación resultados del modelo y experimental de la formación de metano (RCH ₄) para el reactor de película adherida. Factor de correlación de 0.7801.	138
Figura 53. Comparación análisis ANOVA de datos experimentales y modelo para la formación de metano (RCH ₄) en el reactor de película adherida.....	138
Figura 54. Resultados del modelo de espesor de biopelícula, L _f para el reactor.	139
Figura 55. Resultados del modelo del flujo de sustrato en la biopelícula para el reactor.	141
Figura 56. Cálculo del coeficiente de rendimiento (Y) para el reactor de película adherida.	165
Figura 57. Cálculo del coeficiente de desprendimiento (b) para el reactor de película adherida.....	165
Figura 58. Cálculo de k y K _s para el reactor de película adherida.	166

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de RSU actual y proyección al 2025 de países Latinoamericanos. Tomado de Hoormweg and Bhada-Tata ³ . What a waste. A global review of solid state management. 2012.....	19
Tabla 2. Caracterización físicoquímica de los inóculos evaluados.....	38
Tabla 3. Técnicas analíticas y parámetros utilizados en la caracterización del sustrato. .	40
Tabla 4. Nutrientes adicionados a los reactores para la DA de residuos orgánicos con el inóculo seleccionado.....	43
Tabla 5. Valores de estadístico de Levene para análisis de varianza del volumen de metano de los lodos evaluados.	45
Tabla 6. Composición general del sustrato para la selección del inóculo con carga real de RSU.....	47
Tabla 7. Caracterización físicoquímica del sustrato para la selección del inóculo con carga FO de RSU.	47
Tabla 8. Valores de estadístico de Levene para análisis de la producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato (25 °C ± 2 °C, 8 %ST) y (37 °C ± 2 °C 12 % ST).	51
Tabla 9. Caracterización de sustratos empleados en la evaluación del potencial de metanización.	55
Tabla 10. Porcentaje de proteína, carbohidratos, lípidos y fibra presentes en los sustratos.	56
Tabla 11. Parámetros cinéticos y del reactor utilizados en el modelo.	132
Tabla 12. Resultado de los parámetros evaluados en el modelo para el reactor de película adherida.....	141
Tabla 13. Cálculo de los valores de k y Ks para el reactor de película adherida.....	166

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y), COEFICIENTE DE DESPRENDIMIENTO (b).....	165
ANEXO B. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VELOCIDAD MEDIA DE MONOD (K_s) Y VELOCIDAD MAXIMA DE UTILIZACIÓN DE MONOD (k).....	166
ANEXO C. RESULTADOS POLYMATH	168

ABREVIATURAS

ADM:	Anaerobic Digestion Model
AGVs:	Ácidos Grasos Volátiles
AME:	Actividad Metanogénica Específica
AMH₂:	Arqueas Metanogénicas Hidrogenofílicas
AMA:	Arqueas Metanogénicas del Acetato
AMF:	Arqueas Metanogénicas del Formato
AMM:	Arqueas Metanogénicas del Metanol
BAL:	Bacterias Acetogénicas del Lactato
BAP:	Bacterias Acetogénicas del Propionato
BA:	Bacterias Anaerobias
BFG:	Bacterias Fermentadoras de la Glucosa
BFL:	Bacterias fermentadoras del Lactato
BSR:	Bacterias Sulfatorreductoras
BSRA:	Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato
CEIAM:	Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales
DA:	Digestión Anaerobia
DQO:	Demanda Química de Oxígeno
FO:	Fracción Orgánica
LAD:	Soporte de ladrillo cerámico
MEZC:	Lodo mezcla
ML:	Mohos y Levaduras
NMP:	Número más Probable
PORC:	Lodo Porcícola
PTAR:	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
RSU:	Residuos Sólidos Urbanos

PE: Polímero Extracelular

PVC: Soporte de Policloruro de vinilo

RIS: Relación inóculo sustrato

SF: Sólidos Fijos

SSF: Sólidos Suspendidos Fijos

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos Volátiles

TRH: Tiempo de Retención Hidráulica

UASB: Up Anaerobic Sludge Blanket

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS SOPORTADAS EN UN SISTEMA DE LECHO FIJO UTILIZADO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS.*

AUTOR: Marisol Vergara Mendoza **

PALABRAS CLAVES: Digestión anaerobia, residuos sólidos, biogás, soportes, lodo porcícola, lodo PTAR, modelo matemático.

DESCRIPCIÓN: En esta trabajo, se evaluaron reactores metanogénicos de biopelícula adherida para el tratamiento del efluente generado por un reactor Hidrolítico/acidogénico con Fracción orgánica (FO) de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) como sustrato. En la selección del inóculo se utilizó, lodo porcícola, lodo PTAR y lodo mezcla (MEZC). Los resultados de la Actividad Metanogénica Específica (AME) en unidades de g DQO/ g SSV*d fue de 0.1233 para el lodo PTAR, 0.0454 para el porcícola y 0.1803 para MEZC. Los soportes evaluados para la inmovilización de los microorganismos fueron tusa de mazorca, *luffa cilíndrica*, ladrillo cerámico y espuma de poliuretano. La producción de biogás de los biorreactores fue de 0.232 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}$) para el reactor con ladrillo cerámico como soporte, seguido por la tusa de mazorca con 0.211 $\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}$ y la espuma de poliuretano 0.154 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}$), por último la *luffa cilíndrica* con 0.111 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}$),

En la evaluación del reactor de biopelícula se utilizó como soporte el ladrillo cerámico. La producción de metano obtenida por el reactor fue de 0.27 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$). En el conteo e identificación de los microorganismos metanogénicos se observó la presencia de metanógenos acetoclásticos pertenecientes al género *Methanotrix sp.* y *Methanosarcina sp.*, estos microorganismos utilizan el acetato como principal ruta metabólica para la producción de metano. Por otro lado, se identificó también la presencia de población metanogénica hidrogenofílica (*Methanococcus sp.* y *Methanobacterium sp.*) que utilizan el formato para la producción de metano.

Finalmente, el modelo matemático del reactor de película adherida fue validado por los resultados experimentales para la concentración de sustrato (Sb). Las predicciones del modelo con relación a la concentración de biomasa activa y la producción de metano presentaron diferencias entre los datos experimentales y el modelo, observándose una marcada diferencia al alcanzar el estado estacionario.

* Tesis para optar el título de Doctor en Ingeniería Química

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Doctor Rodrigo Torres Sáez.

ABSTRACT

TITLE: CHARACTERIZATION OF BIOFILMS SUPPORTED GROWTH IN A FIXED BED SYSTEM USED FOR THE ANAEROBIC DIGESTION OF THE ORGANIC FRACTION OF THE URBAN SOLID WASTE *

AUTHOR: Marisol Vergara Mendoza **

KEYWORDS: Anaerobic digestion, solid waste, biogas, support, pig sludge, sewage sludge, mathematical model.

DESCRIPTION: In this work, the evaluation of methanogenic of biofilm reactors for the effluent treatment generated by a Hydrolytic / acidogenic reactor with Organic Fraction (OF) of Urban Solid Waste (USW) as substrate was carried out. The selection of the inoculum was carried out from pig sludge, sewage sludge and a mixture of these. The Specific Methanogenic Activity (SMA) in units of $\text{gDQO} / \text{g SSV} \cdot \text{d}$ were 0.1233 for the sewage sludge, 0.0454 for pig and 0.1803 for the mixture. The supports evaluated for microorganism's immobilization were cob ear, cylindrical luffa, ceramic brick and polyurethane foam. The biogas production was $0.232 (\text{m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg DQOremoved})$ for the reactor with brick as support, followed by the ear of corn with $0.211 \text{ m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg DQO}$ removed and the foam Polyurethane $0.154 (\text{m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg DQOremoved})$, finally the *cylindrical luffa* with $0.111 (\text{m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg DQOremoved})$.

In the biofilm reactor evaluation, the ceramic brick was used as support. The methane production obtained by the reactor was $0.27 (\text{m}^3 \text{CH}_4 / \text{kg DQOremoved} / \text{d})$. In counting and identification of the methanogenic microorganisms, the presence of acetoclastic methanogens belonging to the genus *Methanotrix sp.* and *Methanosarcina sp.*, was observed. These microorganisms use acetate as the main metabolic pathway for methane production. On the other hand, the presence of a methanogenic hydrogenophilic population (*Methanococcus sp.* and *Methanobacterium sp.*), that used the format for the production of methane was also identified.

Finally, the mathematical model of the biofilm reactor was validated by the experimental results in the case of the substrate concentration (Sb). The predictions of the model in relation to active biomass concentration and methane production showed differences between the experimental data and the model, with a marked difference in steady state.

* Tesis to obtain the degree of Doctor in Chemical Engineering

** Physical Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Ph. D Rodrigo Torres Sáez.

INTRODUCCIÓN

La generación de residuos sólidos es una actividad que ha acompañado al hombre desde sus inicios. El contenido de estos residuos sólidos ha ido cambiando con el desarrollo industrial y depende en gran medida del modo de vida de los habitantes de cada región. La composición de los residuos sólidos urbanos (RSU) en países desarrollados es diferente a los países en vías de desarrollo. Se destaca un alto contenido de materia orgánica putrescible, humedad y un bajo contenido de materiales reciclables en la composición de los RSU en los países de la región de América Latina y el Caribe. Todo esto resulta determinante al momento de decidir las alternativas de tratamiento y las posibilidades de recuperación de materiales.

De acuerdo con un estudio realizado por Hoornweg y Bhada-Tata para el Banco Mundial ¹, la generación global actual de RSU es aproximadamente de 1.3 billones de toneladas por año y se espera un incremento a 2.2 billones de toneladas por año para el 2025. Esto representa un aumento de generación de 1.2 a 1.42 kg por persona por día en los próximos diez años.

En América Latina, la producción de RSU asciende a unas 160 millones de toneladas año y en Colombia se presenta una generación promedio de 27918 toneladas por día de residuos. En la **Tabla 1** se observa la producción de RSU en países latinoamericanos y su proyección al año 2025. En Colombia, en la disposición final de los residuos, el 93.8 % de los municipios utilizan relleno sanitario, el 5 % botadero a cielo abierto, el 0.7 % planta integral, 0.3 % enterramiento, el 0.07 a cuerpos de agua y el 0.04 % quemas. En las 32 capitales del país se generan el 65.3 % de las toneladas generadas a nivel nacional ².

¹ HOORMWEG, D. and BHADA-TATA, P. What a waste. A global Review of solid state management. Urban Development Series Knowledge Papers. The World Bank. Washington D.C. 2012.

² SUPERINTENDENCIA DE SERVICIOS PUBLICOS DOMICILIARIOS- SSPD. Situación de la disposición final de residuos sólidos en Colombia. Diagnóstico 2011.

Tabla 1. Producción de RSU actual y proyección al 2025 de países Latinoamericanos. Tomado de Hoormweg and Bhada-Tata ³. What a waste. A global review of solid state management. 2012.

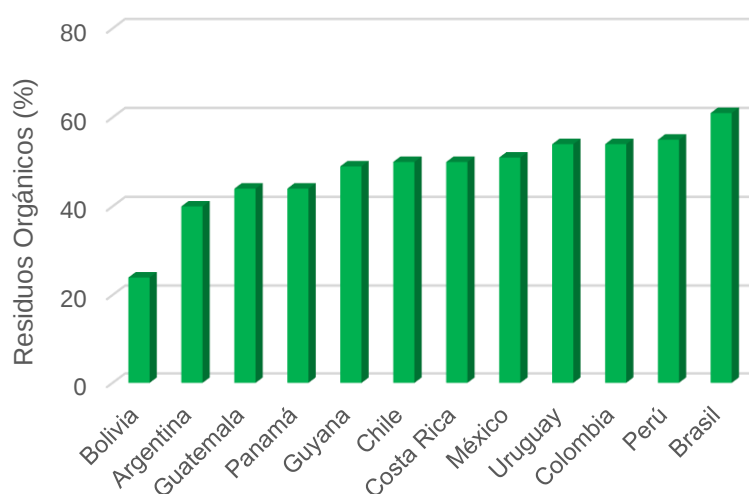
PAÍS	ACTUAL		PROYECCIÓN 2025	
	kg/cápita/d	t/d	kg/cápita/d	t/d
Argentina	1.22	41096	1.85	80420
Bolivia	0.33	1863	0.7	6333
Brasil	1.03	149096	1.6	330960
Chile	1.08	14493	1.5	26483
Colombia	0.95	27918	1.5	66269
Costa Rica	1.36	3260	1.8	7151
Ecuador	1.13	8603	1.5	18041
El Salvador	1.13	3945	1.6	9161
Guatemala	2	10466	2	22956
Guyana	5.33	1151	3.5	805
Honduras	1.45	4110	1.8	9979
México	1.24	99014	1.75	179000
Nicaragua	1.1	3123	3	12687
Paraguay	0.21	630	0.6	3350
Panamá	1.21	2438	1.65	5777
Perú	1	18740	1.4	35830
Surinam	1.36	466	1.6	622
Uruguay	0.11	329	0.6	2000
Venezuela	1.14	25507	1.5	51089

En términos generales, la composición de los RSU en Latinoamérica contienen porcentajes de materia orgánica putrescible (entre 50 y 80), papel y cartón (entre 8 y 18%), plástico y caucho (entre 3 y 14%) y vidrio y cerámica (entre 3 y 8%)³. En la **Figura 1** se muestra el porcentaje de material orgánico en los RSU de países Latinoamericanos. En Colombia, los RSU presentan una composición en términos

³ HOORMWEG, D. and BHADA-TATA, P. Op. cit.

generales de un 54% de materia orgánica (residuos de comida en su gran mayoría) y 46 % de residuos inorgánicos. En la ciudad de Bucaramanga, los RSU contienen materia orgánica en un 88 % ⁴. Esta composición permite la utilización de un método biológico para el tratamiento de estos residuos.

Figura 1. Porcentaje de residuos orgánicos en países Latinoamericanos. Tomado de Hoormweg and Bhada-Tata ⁵



Existen alternativas tecnológicas para el manejo de residuos sólidos que permiten su evacuación y buscan beneficios tanto económicos como ambientales y sociales. La pirólisis, el compostaje aerobio, la gasificación, el reciclaje, el relleno sanitario y la DA, en baja y alta concentración de sólidos, son tecnologías alternativas para el tratamiento de residuos sólidos ⁶. El relleno sanitario es uno de los métodos de disposición de RSU más utilizado; en la mayoría de los casos estos sitios de disposición no cumplen con los requisitos ambientales exigidos y son simplemente

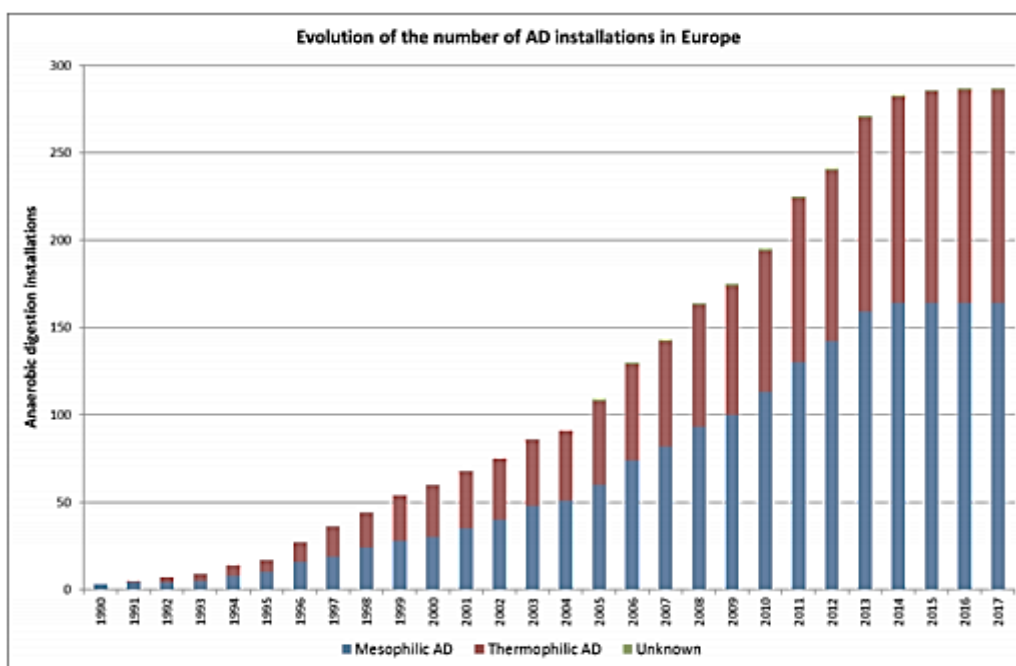
⁴ PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS. PGIRS 2016-2027. Formulación y actualización. Alcaldía de Bucaramanga. 2015.

⁵ HOORMWEG, D. and BHADA-TATA, P. Op. cit.

⁶ ARAFAT, H., JIJAKLI, K., AHSAN, A. Environmental performance and energy recovery potential of five processes for municipal solid waste treatment. En: Journal of cleaner production. 2013; p. 1-8.

sitios de disposición a cielo abierto, convirtiéndose en generadores de contaminación que perjudican a la comunidad que vive bajo su área de influencia. En Estados Unidos y Europa, se han establecido porcentajes de reducción para los residuos municipales biodegradables que deben ingresar a los rellenos sanitarios tomando como base la cantidad ingresada en 1995. Es así como para el 2013 se esperaba reducir los residuos a un valor del 50% y en el 2020 a 35% ⁷. La búsqueda en la reducción del contenido orgánico en los rellenos sanitarios es una forma de disminuir la producción de metano en estos sitios y evitar la emisión de este gas de efecto invernadero hacia la atmósfera. En la actualidad en Europa existen más de 270 instalaciones de DA para el tratamiento de residuos. En la **Figura 2** se observa la evolución en el número de estas instalaciones.

Figura 2. Evolución del número de instalaciones de DA en Europa (Mesófilicas vs. Termófilicas). Tomado de Open-BIO ⁸.



⁷ WARD, A.J. HOBBS, P.J, HOLLIMAN, P. J. and JONES, D.L. Optimisation of the anaerobic digestion of agriculture resources. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2008; p. 7928-7940.

⁸ OPEN-BIO. Opening bio-based markets via standards, labelling and procurement Work package 6 Managed end-of-life options Deliverable N° 6.6: Review on standards for biogasification. 2014.

Los avances en la investigación de la digestión anaerobia (DA) se han centrado principalmente en el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales. En esta área, ya se encuentran grandes plantas de tratamiento alrededor del mundo. Se han establecido diferentes variables de proceso, tales como temperatura, tiempo de retención hidráulico, velocidades de carga orgánica; entre otras, así como el tipo de reactores y las facilidades de los mismos. Los reactores más utilizados en estos bioprocesos son los reactores anaerobios de manto de lodos de flujo ascendente (UASB en inglés), desarrollado en la década de los ochenta en Holanda por Lettinga⁹ y su grupo de investigación. Se han estudiado las condiciones operacionales de estos reactores, así como lo relacionado con la microbiología del sistema, el cual ha permitido establecer la conformación de las especies microbiológicas presentes en el gránulo.

En el área de tratamiento de residuos sólidos aplicando DA se han utilizado los mismos principios básicos del tratamiento de residuos líquidos. Cabe destacar que los residuos sólidos contienen una mayor carga orgánica comparada con los residuos líquidos, representada por la demanda química de oxígeno (DQO). Esta característica de elevada DQO permite el uso de reactores de película adherida que pueden llegar a tener una buena eficiencia de remoción y producción de biogás.

La DA se realiza con mayor frecuencia en sistemas de una etapa. Sin embargo, en búsqueda de mejorar condiciones operativas que permitan obtener una mayor eficiencia de remoción de carga orgánica y un mayor volumen de metano, se ha implementado la DA en sistemas de dos etapas ^{10 11 12 13}. En estos sistemas se

⁹ LETTINGA, G., VAN NELSEN, A.F.M., HOBMA, S.W., DE ZEEW, W., and KLAPWIJK, A. Use of the Up flow Sludge Blanket (USB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment, especially for anaerobic treatment. En: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.; 22. 1980; p. 699 – 734.

¹⁰ SANDOVAL, C.J, VERGARA, M., CARREÑO, M. CASTILO, E. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. En: *Waste Management*. Vol.; 29. 2009; p. 704–711.

¹¹ LUO, G.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011, p. 8700–8706.

¹² HEEG, K.; POHL, M.; SONTAG, M.; MUMME, J.; KLOCKE, M.; NETTMANN, E. Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as the sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. En: *Systematic and Applied Microbiology*. Vol.; 37. 2014, p. 590–600.

¹³ ZUO, Z.; WU, SH.; ZHANG, W.; DONG, R. Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 146. 2013, p. 556–561.

separan las etapas de los procesos de hidrólisis/acidificación de los de acetogénesis/metanogénesis, logrando establecer condiciones operacionales que permitan la especialización de la microbiota para cada una de las etapas. Los reactores de dos etapas pueden mejorar la estabilidad del proceso comparado con el de una etapa, especialmente cuando se digiere materia prima fácilmente hidrosoluble ya que se puede lograr un mejor control en la etapa hidrolítica/acidogénica ¹⁴. El material que pasa de la primera etapa a la segunda se encuentra homogeneizado y estabilizado facilitando las condiciones para el desempeño de los microorganismos metanogénicos ^{15 16 17 18}.

Uno de los reactores de DA de RSU más utilizados son los reactores en suspensión totalmente agitados ^{19 20}. En estos momentos existe un conocimiento muy amplio de los fenómenos que rigen la formación de los gránulos en los biorreactores en suspensión, así como el papel que juegan dichos gránulos en la transformación del sustrato y obtención del biogás ^{21 22}. Los reactores de biopelícula se utilizan cuando los reactores de biomasa suspendida se encuentran limitados debido a la baja concentración de microorganismos y/o el tiempo de residencia hidráulico, tal como

¹⁴ BOUALLAGUI, H., TOUHAMI, Y., BEN CHEIKH, R., HAMDIA, R.M. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. En: *Process Biochemistry*. Vol.; 40. 2005; p. 989 – 995.

¹⁵ RINCÓN, B.; BORJA, R.; MARTÍN, M.A.; MARTÍN, A, Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic–acidogenic step. En: *Waste Management*. Vol.; 29. 2009, p. 2566–2573.

¹⁶ LIM, J-W., CHEN, C.L., HO, I.J.R., WANG, J.Y Study of microbial community and biodegradation efficiency for single- and two-phase anaerobic co-digestion of brown water and food waste. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 147. 2013; p.193–201.

¹⁷ NATHAO, C., SIRISUKPOKA, U., PISUTPAISAL, N. Production of hydrogen and methane by one and two stage fermentation of food waste. En: *International Journal Hydrogen Energy*. Vol.; 38(35). 2013; p. 15764–15769.

¹⁸ ZUO, Z.; WU, SH.; ZHANG, W.; DONG, R. Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 146. 2013, p. 556–561.

¹⁹ FERNANDEZ, J., PEREZ, M., ROMERO, L.I. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: influence of initial total solid concentration. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 101. 2010, p.6322–6328.

²⁰ FONGSATITKUL, P., ELEFSINIOTIS, P., WAREHAM, D.G. Effect of mixture ratio, solids concentration and hydraulic retention time on the anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. En: *Waste Management Research*. Vol.; 28. 2010, p. 811–817.

²¹ PEVERE, A., GUIBAUD, G., GOIN, E., VAN HULLEBUSCH, E., LENS, P. Effects of physico-chemical factors on the viscosity evolution of anaerobic granular sludge. En: *Biochemical Engineering Journal*. Vol.; 43 (3). 2009, p. 231–238.

²² ABBASI, T., ABBASI, S.A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol.; 16 (3). 2012, p. 1696–1708.

ocurre con los reactores de crecimiento lento o cuando las concentraciones de alimentación se encuentran diluidas. En estos casos los reactores de biopelícula aseguran la retención de altas concentraciones de biomasa y mejoras en su conversión volumétrica. Las principales ventajas de los reactores de biopelícula son su buen funcionamiento a elevadas cargas orgánicas y su capacidad para manejar cargas de choque que brindan la posibilidad de manejar RSU como sustrato. El desarrollo de los reactores de biopelícula ha sido posible en gran medida al mayor conocimiento en los procesos biológicos, cinéticos y de transferencia de masa que ocurren en el exterior y en el interior de la biopelícula, así como la caracterización de la estructura, la composición y la dinámica poblacional. Los reactores de película fija pueden tolerar cargas de choque a una carga hidráulica constante y recobrar su funcionamiento normal en pocos días ²³. El arranque del reactor puede ser rápido después de un período de ausencia de alimento (uno o dos días para alcanzar la capacidad máxima después de tres semanas de ausencia de alimento).

En los reactores de biopelícula anaerobia, la eficiencia de remoción de material orgánico está directamente relacionada con las características del material de soporte utilizado para la inmovilización de microorganismos anaerobios. El número y tipo de células adheridas al soporte puede variar de un soporte a otro. La adhesión celular puede ser afectada por varias propiedades fisicoquímicas de los materiales y por la hidrodinámica en los reactores, el cual es un factor importante durante el establecimiento de la primera capa microbiana ²⁴ ²⁵. Se han probado una amplia variedad de materiales como soporte para este tipo de reactores. Un material puede ser adecuado para la formación de biopelícula en parámetros que influyen en el funcionamiento del reactor; tales como; la velocidad de remoción de sustrato y la

²³ ZHAO, H.; LI, J.; LI, J.; YUAN, X.; PIAO, R.; ZHU, W.; LI, H.; WANG, X.; CUI, Z. Organic loading rate shock impact on operation and microbial communities in different anaerobic fixed-bed reactors. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 140. 2013, p.211–219.

²⁴ SINGH, S.P. and PRERNA, P. Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol.; 13 (6-7). 2009, p. 1569–1575.

²⁵ ESCUDIÉ, R., CRESSON, R., DELGENÈS, J.P., BERNET, N. Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. En: *Water Research*. Vol.; 45. 2011; p. 1-10.

velocidad de flujo del biogás o parámetros físicos de los soportes, como; el área superficial específica y la rugosidad ^{26 27 28}.

Algunos resultados experimentales han demostrado las ventajas en la utilización de soportes corrugados en la fijación de microorganismos y en la obtención de elevadas eficiencias de remoción de materia orgánica. Los efectos de cambios drásticos en la carga sobre el funcionamiento de reactores anaerobios de lecho fijo han sido evaluados y se ha demostrado la capacidad de recuperación de este tipo de reactores. Esta capacidad de recuperación se ha atribuido al diseño de la biopelícula inmovilizada la cual permite la inhibición temporal de la biopelícula y la recuperación de la actividad cuando se restablecen las condiciones favorables ^{29 30}.

A pesar de disponer una amplia información experimental acerca del funcionamiento de los reactores de película adherida para el tratamiento de aguas residuales, aún no se tiene una visión completa y se dispone aún de menos información respecto al uso de estos reactores en el tratamiento efluentes provenientes de la primera etapa hidrolítica/acidogénica en el caso de procesos en dos fases para el tratamiento de la fracción orgánica de residuos sólidos. Por esta razón y con base en resultados preliminares, se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Qué factores hidrodinámicos y microbiológicos influyen sobre el funcionamiento de reactores de película adherida para el tratamiento de un efluente proveniente de la primera etapa hidrolítica/acidogénica de un sistema de dos etapas para el tratamiento de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (RSU)?.

Para responder esta pregunta, en este trabajo de tesis de doctorado se evaluó el

²⁶ GARCIA, M.L.; LAPA, K.R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage. En: Journal of Environmental Management. Vol.; 88. 2008, p. 1471–1477.

²⁷ DONG, Z., LUB, M., HUANG, W., XU, X. Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier. En: Journal of Hazardous Materials. Vol.; 196. 2011; p.123– 130.

²⁸ KARADAG, D., KOROGLU, E.O., OZKAYA, B., CAKMAKCI, M., A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. En: Process Biochemistry. Vol.; 50 (2). 2015, p. 262-271.

²⁹ BARBOSA, A.K., ZAIAT, M., FORESTI, E. Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads. En: Journal of Environmental Management. Vol.; 76. 2005, p. 319–325.

³⁰ NAJAFPOUR, G.D. Bioconversion of Cheese Whey to Methane in an Upflow Anaerobic Packed Bed Bioreactor. En: Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. Vol.; 24 (1). 2010.

efecto de factores hidrodinámicos y microbiológicos en reactores de película adherida para el tratamiento del efluente de RSU.

El libro de tesis se divide en cuatro capítulos. En el primer capítulo se presenta la selección del inóculo entre el lodo proveniente de una granja porcícola ubicada en la Mesa de los Santos (Santander) y el lodo de un reactor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales de Río Frío ubicada en Girón (Santander) y su respectiva mezcla. De igual forma en este capítulo se evaluó la producción de metano de diferentes sustratos orgánicos representativos de la fracción orgánica (FO) de los residuos sólidos urbanos (RSU). El capítulo 2 se centra en la selección del soporte a ser utilizado en el reactor de película adherida de acuerdo con los resultados de biogás obtenido. En el tercer capítulo se presenta la caracterización microbiológica de los reactores de película adherida. El cuarto capítulo contiene el modelo matemático del reactor de biopelícula utilizado en la biodegradación anaerobia del efluente proveniente del reactor hidrolítico/acidogénico.

Los objetivos planteados para el desarrollo de este trabajo de tesis Doctoral fueron:

Objetivo principal

Caracterizar el proceso de formación y estabilización de la biopelícula soportada en un medio inerte para la biodigestión anaerobia de la FO de RSU.

Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto del tipo de soporte en la formación de la biopelícula y el porcentaje de remoción de carga orgánica en un sistema de DA para el tratamiento de la FO de los RSU, a partir de consorcios microbianos nativos.
- ✓ Analizar el efecto de la hidrodinámica del sistema sobre la formación y el desempeño de la biopelícula en el proceso de DA.

- ✓ Establecer los parámetros cinéticos de la biopelícula formada en el soporte seleccionado.
- ✓ Evaluar el sistema biopelícula-soporte en un reactor de lecho fijo para la DA del efluente proveniente de la fase hidrolítica en el tratamiento de la FO de RSU.

1. SELECCIÓN DEL INÓCULO Y DIGESTIÓN ANAEROBIA DE SUSTRATOS ORGÁNICOS

La DA es un proceso común para el tratamiento de efluentes orgánicos. En la mayoría de los procesos de digestión, la hidrólisis constituye la etapa limitante, dependiendo del tipo de sustrato ³¹. Cuando el sustrato contiene poca celulosa, como en el caso de residuos de vegetales y frutas, el paso limitante es más la metanogénesis que la hidrólisis ³².

En la DA se deben tener en cuenta varios factores, uno de ellos es encontrar el balance ideal entre el alimento que pueden consumir los microorganismos y la concentración del mismo en el sustrato. La limitación por materia orgánica causa una disminución en la producción de metano durante la anaerobiosis, mientras que un exceso de la misma inhibe la actividad microbiana o por lo menos causa una fase de latencia en los microorganismos. Otros factores a tener en cuenta en la DA son los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), los Sólidos Totales (ST) y el inóculo. En el caso de los AGVs, éstos pueden causar inhibición en el proceso debido a su acumulación como consecuencia de desequilibrios en el medio que provocan un desbalance entre los microorganismos acidogénicos y metanogénicos.

El contenido de ST afecta la reología y viscosidad del contenido en el interior del reactor, la dinámica de fluido y la sedimentación de sólidos que influye directamente sobre las velocidades de transferencia de masa ^{33 34}. De otro lado, el inóculo aporta gran parte del grupo de microorganismos encargados de la transformación del sustrato. Existen diferentes tipos de inóculo y dependiendo de su origen presentan

³¹ FDEZ.-GÜELFO, L.A., ÁLVAREZ-GALLEGO, C., SALES MÁRQUEZ, D., ROMERO GARCÍA, L.I Biological pretreatment applied to industrial organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW): Effect on anaerobic digestion. En: Chemical Engineering Journal. Vol.; 172. 2011; p. 321– 325.

³² Bouallagui, Op., cit.

³³ WU, G., HEALY, M.G. y ZHAN, X., Effect of the solid content on anaerobic digestion of meat and bone meal. En: Bioresource Technology. Vol. 100. 2009; p. 4326-4331.

³⁴ KARTHIKEYAN, O.P., VISVANATHAN, C. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: a review. Rev. En: Environment Science Biotechnology. Vol.; 12. 2013; p. 257–284.

diferentes tipos de microorganismos. Dentro de los inóculos más utilizados se encuentran los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales, lodos porcícolas, avícolas y el rumen de vaca^{35 36}. La relación inóculo sustrato (RIS) es un factor determinante en el desempeño de los reactores anaerobios que muestra la capacidad de los sistemas en la producción de biogás.

En este capítulo, se presenta la selección del inóculo a utilizar en los reactores. Esta selección se realizó de acuerdo con los resultados de la AME; así como la producción de metano de los tres inóculos con una mezcla de FO de RSU como sustrato a dos temperaturas; $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $37^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los inóculos utilizados fueron lodo proveniente de un digestor secundario de una planta de aguas residuales, lodo porcícola y la mezcla uno a uno de los mismos. Posteriormente, se evaluó la producción de metano de residuos orgánicos bajo diferentes RIS, temperatura y la adición de micronutrientes y elementos trazas a los reactores.

1.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

La DA es un proceso biológico en el cual se genera energía, se reducen las emisiones de gases efecto invernadero y se obtiene un efluente valioso que puede ser utilizado como acondicionador de suelos. La DA ofrece ventajas significativas sobre los sistemas aerobios, tales como; bajo consumo de energía, reducción en la formación de sólidos, bajo requerimiento de nutrientes, recuperación de energía a partir del metano producido y el manejo de elevadas cargas orgánicas. El biogás producido está compuesto por un 48 – 65 % de metano, 36 – 41 % de dióxido de carbono, un 17 % de nitrógeno, 32 – 100 ppm de sulfuro de hidrógeno y trazas de

³⁵ GARCIA-PEÑA, E.I., PARAMESWARAN, P., KANG, D.W., CANUL-CHAN, M., KRAJMALNIK-BROWN, R. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 9447–9455.

³⁶ LI, D., LIU, S.; MI, L.; LI, Z., YUAN, Y., YAN, Z., LIU, X. Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and cow manure. En: Bioresource Technology. Vol., 189.2015; p. 319–326.

otros gases ³⁷ ³⁸. Desde el punto de vista energético, la DA comparada con un proceso aerobio convencional, presenta grandes ventajas. El proceso aerobio requiere gran cantidad de energía para la aireación y entre un 40 y 60 % de la materia orgánica es convertida en lodo que requiere estabilización, mientras que en el sistema anaerobio, sólo se obtiene un 10 % de lodo, lo que implica además un menor requerimiento de nutrientes ³⁹.

La DA ha sido descrita como un proceso de múltiples etapas o subprocesos donde se lleva a cabo un grupo de reacciones en serie y en paralelo ⁴⁰ como se muestra en la **Figura 3**.

En este proceso tienen lugar cuatro etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. En la *hidrólisis*, los polímeros complejos como proteínas, carbohidratos y grasas se hidrolizan por la acción de enzimas extracelulares (celulasas, amilasas, proteasas y lipasas) en productos solubles más sencillos, de tamaño tan pequeño que les permite atravesar la membrana celular de los microorganismos. En la *acidogénesis*, los compuestos sencillos como; aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y alcoholes se transforman en ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, amoníaco, hidrógeno y dióxido de carbono. En la *acetogénesis*, los ácidos grasos de cadena corta se convierten en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Al final, en la *metanogénesis*, se produce metano a partir de hidrógeno mediante bacterias metanogénicas hidrogenofílicas y a partir de acetato mediante metanógenos acetoclásticos.

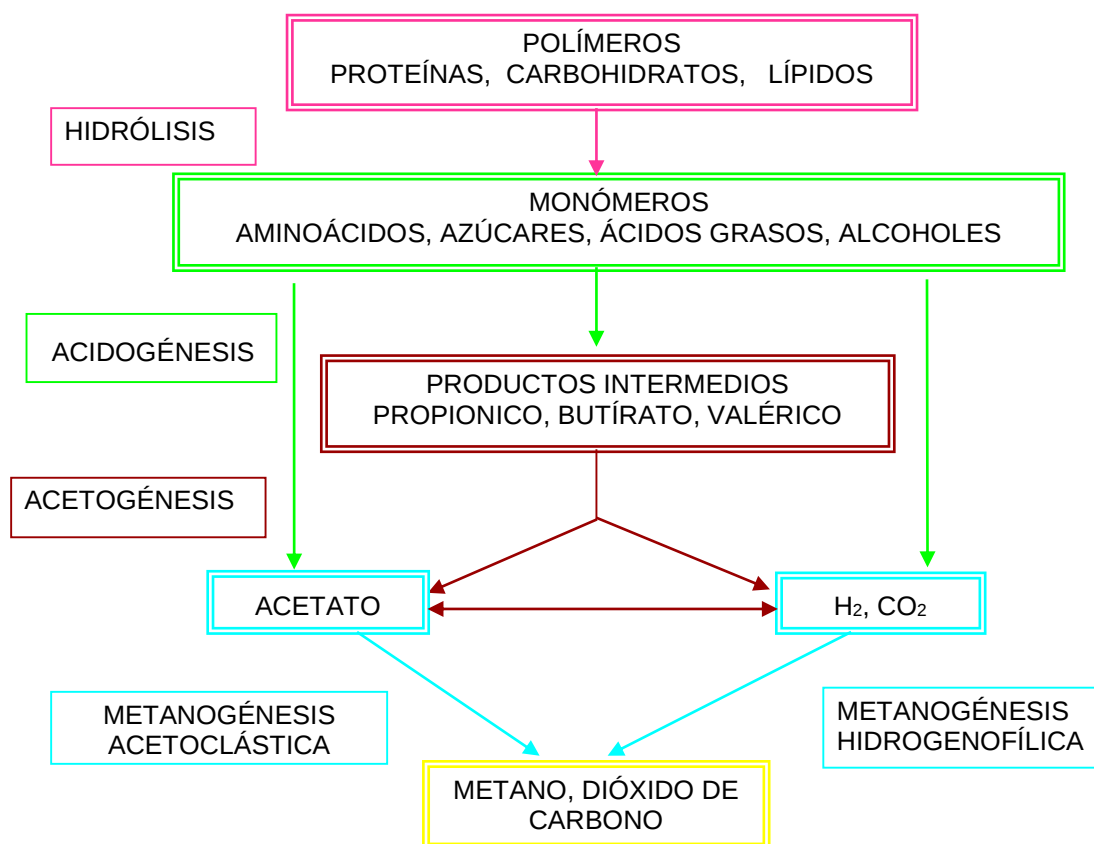
³⁷ KHALID, A., ARSHAD, M., ANJUM, M., MAHMOOD, T., DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste – review. En: Waste Management. Vol.; 31. 2011, p. 1737–1744.

³⁸ GARCIA-PEÑA, E.I., PARAMESWARAN, P., KANG, D.W., CANUL-CHAN, M., KRAJMALNIK-BROWN, R. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 9447–9455.

³⁹ MAO, CH., FENG, F., WANG, X., REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol.; 45. 2015; p. 540–555.

⁴⁰ ZHU. Op. cit

Figura 3. Representación esquemática de la Digestión Anaerobia (Modificado de Zhu ⁴¹)



1.1.1 Factores que afectan la Digestión Anaerobia. La digestión anaerobia es un sistema de interacciones complejas, lo que la hace susceptible de sufrir alteraciones por la variación de condiciones internas y externas ^{42 43}. A continuación se presentan las variables más representativas que intervienen en el proceso.

La temperatura. La temperatura afecta directamente la velocidad de las reacciones biológicas, influenciando la actividad metabólica de los microorganismos. A su vez,

⁴¹ ZHU. Op. cit

⁴² AMANI, T.; NOSRATI, M.; AND SREEKRISHNAN, T.R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. En: Environmental Rev. Vol.; 18. 2010: p. 255-278.

⁴³ LABATUT, R.A., ANGENT, L.T., SCOTT, N.R. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (3). 2011, p. 2255–2264.

tiene un efecto marcado sobre la velocidad de transferencia de gases, la viscosidad, la tensión superficial y la sedimentación de algunos sólidos biológicos. La eficiencia de los procesos anaerobios es altamente dependiente de la temperatura. La digestión anaerobia se lleva a cabo en varios intervalos de temperatura: el mesofílico que va de 15 – 40 °C, con un valor óptimo alrededor de 35 °C; el termofílico de 45 – 60 °C, con un valor óptimo de 55 °C y el psicrófilico de < 15 °C. La temperatura no sólo afecta la velocidad del proceso, sino también el nivel de degradación alcanzado o la biodegradabilidad final ⁴⁴.

El pH. El proceso de digestión anaerobia está relativamente limitado a un intervalo de pH entre 6.5 – 7.5 ^{45 46}. Un valor del pH fuera de este intervalo puede llevar a un desequilibrio del proceso. Cada grupo bacteriano que contribuye al proceso de la digestión anaerobia tiene un pH óptimo y puede crecer en un intervalo específico. La metanogénesis y la acetogénesis tienen un pH óptimo aproximado a 7, mientras la acidogénesis tiene un pH óptimo de 6. En un reactor anaerobio una inestabilidad en la velocidad de consumo del sustrato puede llevar a una acumulación de ácidos grasos volátiles, los cuales causan una caída en el pH ⁴⁷.

La alcalinidad. Es la capacidad del sistema para soportar y amortiguar la presencia de ácidos sin disminuir su pH. Esto ocurre por el efecto buffer debido a la presencia de iones hidroxilo (OH⁻), carbonato (CO₃⁼) y bicarbonato (H₂CO₃⁻). Algunos reportes han mostrado que el Na₂CO₃ y el NaHCO₃ tienen un mayor efecto en la estabilización de la DA de Residuos Sólidos Municipales (RSU) comparado con el NaOH, el orden de capacidad buffer de mayor a menor fue CO₃⁼, H₂CO₃⁻ y OH⁻ ⁴⁸.

⁴⁴ BOWEN, E.J., DOLFING, J., DAVENPORT, R.J., READ, F.L., CURTIS, T. P. Low-temperature limitation of bioreactor sludge in anaerobic treatment of domestic waste- water. En: Water Science Technology. Vol.; 69. 2014, p.1004 – 1013.

⁴⁵ PALATS, J., LAURENI, M., ANDRÉS, M.V, FLOTATS, X., NIELSEN, H.B, ANGELIDAKI, I. Strategies for recovering inhibition caused by long chain fatty acids on anaerobic thermophilic biogas reactors. En: Bioresource Technology. Vol.; 100. 2009; p. 4588–96.

⁴⁶ ZHANG, P., CHEN, Y., ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: effect of pH. En: Water Research. Vol.; 43.2009, p. 3735 - 3742.

⁴⁷ PALACIO-BARCO, E., ROBERT-PEILLARD, F., BOUDENNE, J-L., COULOMB, B. On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes. En: Analytica Chimica Acta. Vol.; 668 (1). 2010, p. 74–79.

⁴⁸ DONG, J., ZHAO, Y., HONG, M. Influence of alkalinity on the stabilization of municipal solid waste in anaerobic simulated bioreactor. En: Journal of Hazardous Materials. Vol.; 163. 2009, p.717–722.

Los ácidos grasos volátiles (AGV). Estos ácidos son el resultado de la fase de acidogénesis y corresponden al ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, principalmente ⁴⁹. Se han reportado valores de AGVs que van desde 200 hasta 1000 mg ácido acético/L para sistemas que operan a temperaturas termofílicas y con alto contenido de sólidos en el sustrato. Los incrementos en la carga orgánica pueden generar que los niveles de los AGV's se eleven, provocando un efecto de inhibición en la microbiota ⁵⁰.

Los nutrientes. Los microorganismos requieren tanto del nitrógeno como del carbono para desarrollar su metabolismo. Diversos experimentos muestran que la actividad metabólica de los metanógenos es mayor con relaciones de C/N entre 8-20 ⁵¹. Otros elementos de gran importancia son el fósforo que interviene en la síntesis de ácidos nucleicos y el potasio que incrementa la permeabilidad de la pared celular, lo que ayuda al intercambio de nutrientes; un micronutriente de gran importancia es el molibdeno ya que su presencia ayuda a inhibir el desarrollo de las bacterias sulfatorreductoras, responsables de la producción de H₂S ⁵².

Contenido de sólidos totales (ST). El contenido de ST influye en el rendimiento de la DA, especialmente en la eficiencia de producción de biogás y metano. El proceso de DA puede ser clasificado de acuerdo con el contenido de ST. La DA húmeda maneja %ST ≤ 10%, la semiseca ST del 10 – 20 % y la seca ST ≥ 20 % ⁵³. Los procesos de digestión húmeda ofrecen la ventaja de dilución de compuestos inhibitorios por acción del agua requerida, así como el no requerimiento de equipos

⁴⁹ PANDEY, P., NDEGWA, P., SOUPIR, M., ALLDREDGE, R., PITTS, M. Efficacies of inocula on the start up of anaerobic reactors treating dairy manure under stirred and unstirred conditions. En: Biomass and Bioenergy. Vol.; 35. 2011; p. 2705 – 2720.

⁵⁰ GUO, C., YANG, Z., HUANG, J., WANG, H., XU, H., WANG, L. Effects of temperature and organic loading rate on the performance and microbial community of anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste. En: Chemosphere. Vol.; 105. 2014, p.146–51.

⁵¹ YENIGÜN, O., DEMIRE, L. B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. En: Process Biochemical. Vol.; 48. 2013; p. 901–11.

⁵² FENG, X.M., KARLSSON, A., SVENSSON, B.H., BERTILSSON, S. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste-linking process to microbial communities. En: FEMS Microbiology Ecology. Vol.; 74. 2010, p. 226–240.

⁵³ YI, J., DONG, B., JIN, J., DAI, X. Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. En: PLOS ONE. Vol.; 9(7). 2014, p. 1-10.

mecánicos. La digestión seca ofrece la posibilidad de trabajar con elevadas cargas orgánicas, 10 kg SV m³ d⁻¹ o más ^{54 55}.

El tiempo de retención hidráulico (TRH). El TRH es una medida que describe el tiempo promedio que un sustrato permanece en un reactor. En este sistema el TRH mínimo es determinado por la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos más lentos. Si el TRH es muy corto, el sistema puede fallar debido al lavado de estos microorganismos necesarios para la DA. A TRHs cortos se pueden obtener elevadas velocidades de producción de biogás, pero menos eficiencia de degradación de la materia orgánica, asociada a la pérdida de estabilidad ^{56 57}.

1.1.2 Inóculos empleados en la Digestión Anaerobia. Algunos autores destacan la importancia de la presencia y características del inóculo, en búsqueda de un arranque eficiente del sistema y un equilibrio de población bacteriana. Entre los inóculos utilizados se pueden mencionar; el estiércol de cerdo y vaca para el tratamiento de FO de RSU ⁵⁸, lodo PTAR para tratar estiércol porcícola como sustrato ⁵⁹, líquido drenado de digestor anaerobio de FO de RSU ⁶⁰, líquido ruminal

⁵⁴ DUAN, N., DONG, B., WU, B., DAI, X. High-solid anaerobic digestion of sewage sludge under mesophilic conditions: feasibility study. En: Bioresource Technology. Vol.; 104. 2012; p.150–156.

⁵⁵ ANGELONIDI, E AND SMITH, S.R. A comparison of wet and dry anaerobic digestion processes for the treatment of municipal solid waste and food waste. En: Water and Environment Journal. Vol.; 29. 2015, p. 549–557.

⁵⁶ ZAHER, U., CHEONG, D-Y., WU, B., CHEN, Sh. Producing Energy and Fertilizer From Organic Municipal Solid Waste. Department of Biological Systems Engineering Washington State University. 2007, p. 14-15.

⁵⁷ DAREIOTI, M.A., KORNAROS, M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. En: Bioresource Technology. Vol.; 167. 2014, p.407-415.

⁵⁸ FORSTER-CARNEIRO, T., PEREZ, M., ROMERO, L.I., SALES, D. Dry thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: Focusing on the inoculum sources. En: Bioresource Technology. Vol.; 98. 2007; p. 3195–3203.

⁵⁹ GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., GARCÍA-ENCINA, P.A., Impact of substrate to inoculums ratio in anaerobic digestion of swine slurry. En: Biomass Bioenergy. Vol.; 33. 2009; p. 1065–1069.

⁶⁰ CHARLES, W., WALKER, L., CORD-RUWISCH, R. Effect of pre-aeration and inoculums on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. En: Bioresource Technology Vol.; 100. 2009; p. 2329–2335.

en la DA de plantas acuáticas ⁶¹ y lodo de un digestor de estiércol de pollo para el tratamiento de residuos de vinagre ⁶² .

El origen del inóculo y algunos pretratamientos influyen en la producción de metano. La evaluación del origen del inóculo ha demostrado la influencia de esta variable en la producción de metano para diferentes residuos ⁶³ ⁶⁴ ⁶⁵. El lodo granular ha demostrado buen desempeño como inóculo debido a su elevada actividad y concentración de microorganismos metanogénicos ⁶⁶. ⁶⁷ Algunos autores recomiendan la preincubación del inóculo para mejorar su desempeño en la DA ⁶⁸ ⁶⁹ .

En la búsqueda del aumento en la capacidad de degradación de sustratos por parte de los inóculos se ha planteado la mezcla de éstos. Esta alternativa da la posibilidad de aprovechar el efecto sinérgico entre los consorcios microbianos dando como resultado una mejor digestión si se compara con sistemas que emplean solo un tipo de inóculo ⁷⁰ .

⁶¹ YUE, Z-B, WANG, J., LIU, X-M., YU, H-Q. Comparison of rumen microorganism and digester sludge dominated anaerobic digestion processes for aquatic plants. En: Renewable Energy. Vol.; 4. 2012; p. 255-258.

⁶² FENG, L., LI, Y., CHEN, C., LIU, X., XIAO, X., MA, X., ZHANG, R., HE, Y., y LIU, G. Biochemical methane potential (BMP) of vinegar residue and the influence of feed to inoculum ratios on biogas production. En: Bioresources. Vol.; 8(2). 2013; p. 2487-2498.

⁶³ CHAMY, R. and RAMOS, C. Factors in the determination of methanogenic potential of manure. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (17). 2011, p.7673- 7677.

⁶⁴ RAPOSO, F., DE LA RUBIA, M.A., FERNANDEZ-CEGRI, V., BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic sub- strates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures. En: Renewable Sustainable Energy Rev. Vol.; 16. 2012, p. 861–877.

⁶⁵ REGUEIRO, L., VEIGA, P., FIGUEROA, M., ALONSO-GUTIERREZ, J., STAMS, A.J.M., LEMA, J.M., CARBALLA, M. (2012) Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. En: Microbiology Research. Vol.; 167. 2012, p. 581–589.

⁶⁶ DE VRIEZE, J., RAPORT, L., WILLEMS, B., VERBRUGGE, S., VOLCKE, E., MEERS, E. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. En: Microbial Biotechnology. Vo.; 8 (5), p. 776-786.

⁶⁷ FERRER, P., CAMBRA-LÓPEZ, M., CERISUELO, A., PEÑARANDA, D., MOSET, V. The use of agricultural substrates to improve methane yield in anaerobic co-digestion with pig slurry: Effect of substrate type and inclusion level. En: Waste Management. Vol.; 34. 2014; p. 196–203.

⁶⁸ ANGELIDAKI, I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., CAMPOS, J.L., GUWY, A.J. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. En: Water Science Technology. Vol.; 59. 2009, p. 927–934.

⁶⁹ ELBESHISHY, E., NAKHLA, G., HAFEZ, H. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. En: Bioresource Technology. Vol.; 110. 2012, p. 18–25.

⁷⁰ ALVAREZ, J.A; OTERO, L.; LEMA, J.M. A methodology for optimizing feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. En: Bioresource Technology. Vol.; 101. 2010; p. 1153-1158.

1.1.3 Actividad Metanogénica Específica (AME). La AME puede definirse como la máxima capacidad de producción de metano por un grupo de microorganismos anaerobios, realizada en condiciones controladas de laboratorio que permita la máxima actividad bioquímica de conversión del sustrato orgánico a metano ⁷¹. Las unidades en las que se expresa son mg DQO/g SSV · día, o mL CH₄/g SSV · día. El conocimiento de la AME de un lodo permite establecer la capacidad máxima de eliminación de DQO de la fase líquida, permitiendo estimar la carga orgánica máxima que puede ser aplicada a un reactor impidiendo su desestabilización; asimismo, la AME también permite determinar la concentración mínima de biomasa requerida en el reactor para garantizar la reducción de la carga orgánica aplicada ⁷².

Para determinar la actividad metanogénica se alimenta el producto intermedio (AGVs), estos corresponden a ácidos grasos volátiles de cadena corta formados normalmente en el proceso anaerobio por la acción de bacterias acidogénicas. Se recomienda una concentración de AGV entre 3.5 y 4.5 g AGV/L. En los ensayos se utiliza ácido propiónico, butírico y acético.

Los métodos más utilizados en la medición del metano en la AME son el desplazamiento de líquido y la cromatografía de gases. En algunos casos al comparar estos dos métodos de medición no se presentan diferencias estadísticas significativas ⁷³.

1.1.4 Relación inóculo sustrato (RIS). El rendimiento en la producción de metano puede ser calculado dividiendo el metano obtenido bajo condiciones de operación

⁷¹ CHERNICHARO, C. Principios do tratamento biológico de águas residuárias. Universidad Federal de Minas Gerais. Vol V. Brasil. 2007.

⁷² AQUINO, S., CHERNICHARO, C., FORESTI, E., FLORENCIO DOS SANTOS, M. and MONTEGGIA, L. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) En Lodos Anaeróbios. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol.; 12 (2). 2007.

⁷³ SANABRIA, J., DURÁN, M.F, GUTÉRREZ, N. Comparación de dos métodos de medición de actividad metanogénica específica en reactores anaerobios aplicados al tratamiento de vinazas. En: Revista Ingeniería y región. Vol.; 9. 2012; p. 75-82.

estándar de presión y temperatura por la cantidad de sustrato adicionado ⁷⁴. Uno de los factores de mayor influencia en la medición del rendimiento en la producción de metano es la relación inóculo sustrato (RIS). Cada sustrato tiene una RIS óptima, considerando la concentración de AGVs que puede llegar a producir y su capacidad para regular el medio debido a la producción de amoníaco por la hidrólisis de proteínas ⁷⁵. Un incremento en la RIS puede ocasionar sobrecargas debido a la acumulación de AGVs ⁷⁶. Se han realizado evaluaciones de RIS con diferentes sustratos. Zhuo ⁷⁷ utilizó valores de RIS entre 0.1 a 3 para el procesamiento de un residuo sólido proveniente de la producción de queso de soya, obteniendo una máxima producción de metano con RIS entre 0.6 a 0.9. Boulanger ⁷⁸, empleó RIS entre 0 a 4 para la degradación anaerobia de RSU con una producción máxima de metano para la RIS de 2.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Selección de inóculo. Los inóculos evaluados fueron, un lodo granular proveniente de un reactor secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de Río Frío (PTAR), ubicada en Girón (Santander), un lodo porcícola proveniente de la granja ubicada en la Mesa de los Santos (Santander) (PORC) y una mezcla 1:1 (v/v) formada por los inóculos ya mencionados (MEZ).

⁷⁴ RAPOSO, F., BANKS, C.J., SIEGERT, I., HEAVEN, S., BORJA, R. Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. En: *Process Biochemistry*. Vol.; 41. 2006, p. 1444–1450.

⁷⁵ LESTEUR, M., BELLON-MAUREL, V., GONZALEZ, C., LATRILLE, E., ROGER, J.M., JUNQUA, G., STEYER, J.P. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: a review. En: *Process Biochemical*. Vol.; 45 (4). 2010, p. 431–440.

⁷⁶ LABATUT. Op. Cit.

⁷⁷ ZHOU, Y.; ZHANG, Z.; NAKAMOTO, T.; LI, Y.; YANG, Y.; UTSUMI, M.; SUGIURA, N. Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. En: *Biomass and Bioenergy*. Vol.; 35. 2011, p. 3251 – 3256.

⁷⁸ BOULANGER, A.; PINET, E.; BOUIX, M.; BOUCHEZ, T.; MANSOUR, A.A. Effect of inoculum to substrate ratio (I/S) on municipal solid waste anaerobic degradation kinetics and potential. En: *Waste Management*. Vol.; 32. 2012, p. 2258–2265.

En la **Tabla 2** se presenta la caracterización físicoquímica de los lodos evaluados. Esta caracterización fue realizada de acuerdo con la metodología del Standard Methods ⁷⁹.

Tabla 2. Caracterización físicoquímica de los inóculos evaluados

INÓCULO	AGVs (g/L)	pH	ST (g/L)	SSV (g/L)
PTAR	1.9	7.2	28.3	19.4
PORCÍCOLA	2.2	8.1	98.5	47.2
MEZCLA	2.7	7.7	57.1	30.1

Fuente: CEIAM –UIS

1.2.1.1 Determinación de la Actividad Metanogénica Específica (AME). Los ensayos para la AME se realizaron en reactores de 0.5 L a una temperatura de 37 °C ± 2 °C durante 25 días, con cada inóculo evaluado por duplicado y con su respectivo blanco. El blanco para cada uno de los lodos consistió en un reactor de 0.5 L, al cual se añadió solo lodo bajo las mismas condiciones de temperatura sin adición de sustrato. En cada reactor se añadió un volumen de inóculo equivalente a 1.5 g SSV, con un medio adecuado para el buen desempeño de las bacterias metanogénicas, los reactores fueron aforados a 0.4 L. El medio estaba compuesto por 50 mL/L de solución mineral de Balch libre de sulfato, 10 mL/L de solución de oligoelementos libre de sulfato, 0.3 g/L de K₂HPO₄, 10 mL/L de solución de resarzurina, 0.1 g/L de extracto de levadura, 0.1 g/L de tripticasa, 2 g/L de NaHCO₃, 0.5 g /L de cisteína. Posterior a una esterilización se adicionaron 3.1 mL/L de Na₂S (2% p/v) y solución diluida de vitaminas de Balch. El sustrato utilizado fue una mezcla de ácido acético de 6.4 (%v), propiónico 1.7 (%v) y butírico 1.7 (%v), que corresponden a AGVs de cadena corta que se forman durante el proceso anaerobio. El pH fue mantenido en 7.0 con una solución de hidróxido de sodio. El volumen de

⁷⁹ APHA, WEF, AWWA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. 1995.

metano se midió por medio del método de desplazamiento de líquido alcalino ⁸⁰. La AME fue calculado de acuerdo con la ecuación 1 ⁸¹.

$$AME = \frac{P}{FC * V * SSV} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

AME: Actividad metanogénica específica (g DQO/g SSV*día)

P: Máxima pendiente de la cinética de producción de metano (mL/d)

FC: Factor de conversión de g DQO (425 mL CH₄ húmedo/g DQO a 35 ° C)

V: Volumen de inóculo utilizado (L)

SSV: Concentración de SSV en el inóculo (g/L)

1.2.1.2 Producción específica de metano para los inóculos con FO de RSU como sustrato. Los residuos utilizados como sustrato para esta etapa se recolectaron diariamente de sitios de preparación de alimentos en una plaza de mercado en Bucaramanga que representan los hábitos de alimentación de la población. En la **Tabla 3** se muestran las técnicas analíticas y los parámetros utilizados en la caracterización de los residuos.

Los residuos fueron sometidos a un proceso de trituración hasta obtener un tamaño de partícula (4-6 mm) que puede llegar a favorecer la disponibilidad del sustrato a los microorganismos.

⁸⁰ ANGELIDAKI, I., KARAKASSHEV, D., BATSTONE, D., PLUGGE, C., STAMS, A. Biomethanation and its potential. En: Methods in enzymology. Vol.; 494. 2011; p. 327-351.

⁸¹ SCHNEIDERS, D., DIAS DA SILVA, J., TILL, A., LAPA, K.R. PINHEIRO, A. Specific methanogenic activity (SMA) of industrial sludge from the aerobic and anaerobic biological treatment. En: Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. Vol.; 8 (2). 2013; p. 135-145.

Tabla 3. Técnicas analíticas y parámetros utilizados en la caracterización del sustrato.

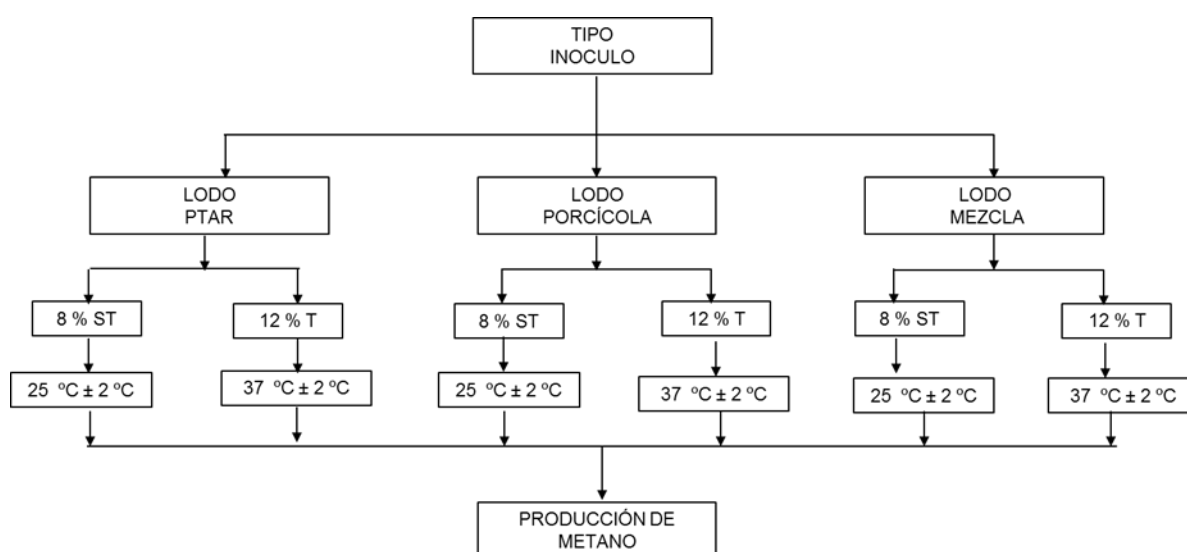
Parámetros	Unidades	Técnica	Norma ASTM
Densidad real	kg/m ³		Standard Methods 2520C
Humedad	%	Gravimétrica	NTC 35
Sólidos Totales (ST)	mg/L %p/p	Gravimétrica	Standard Methods 2540 B
Sólidos Volátiles (SV)	mg/L %p/p	Gravimétrica	Standard Methods 2540 E
Carbono Orgánico Total	%p/p	Combustión Infrarroja	Standard Methods 5310B
Nitrógeno Total	%p/p	Kjeldahl	Standard Methods 4500
Potasio	%p/p	Absorción atómica	Standard Methods 4500K
Fósforo	%p/p	Espectrofotómetro	Standard Methods 4500-P
Celulosa	%p/p	Gravimétrica-Libre de Extraíbles	Klason
Hemicelulosa	%p/p	Gravimétrica-Libre de Extraíbles	Kurschnel y Hoffer
Lignina	%p/p	Gravimétrica-Libre de Extraíbles	Standard Methods 5550B
Cenizas	%p/p		AOAC 7009-84.94205/90

Los ensayos para la producción específica de metano con FO de RSU como sustrato se realizaron en reactores de 0.5 L de volumen, con calentamiento y agitación. La relación inóculo sustrato fue de 3.3:1 y adición de agua destilada hasta alcanzar el volumen de trabajo de los reactores ⁸². Los reactores fueron alimentados diariamente, con medición diaria de pH, con ajuste de pH con bicarbonato de sodio. La cuantificación del metano producido fue realizada por desplazamiento de líquido con botellas Mariotte de 1 L de capacidad. La composición volumétrica del biogás fue determinada con un analizador *in situ* Bacharach GA-94, el cual detecta los gases utilizando una celda electroquímica y una celda infrarroja de longitud de onda

⁸² GRIFFIN, M.E., MCMAHON, K.D., MACKIE, R.I., RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol.; 57. 1988, p. 342–354.

dual. Con el fin de valorar la influencia de la temperatura y el % ST en la producción específica de metano se evaluaron dos temperaturas, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T1) y $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T2), con contenidos de ST del 8 % p/p y 12 % p/p. En la **Figura 4** se muestra la secuencia experimental.

Figura 4. Secuencia experimental para selección del inóculo de acuerdo con la producción específica de metano con FO de RSU como sustrato. Tomado de Castillo et al.; (2006).



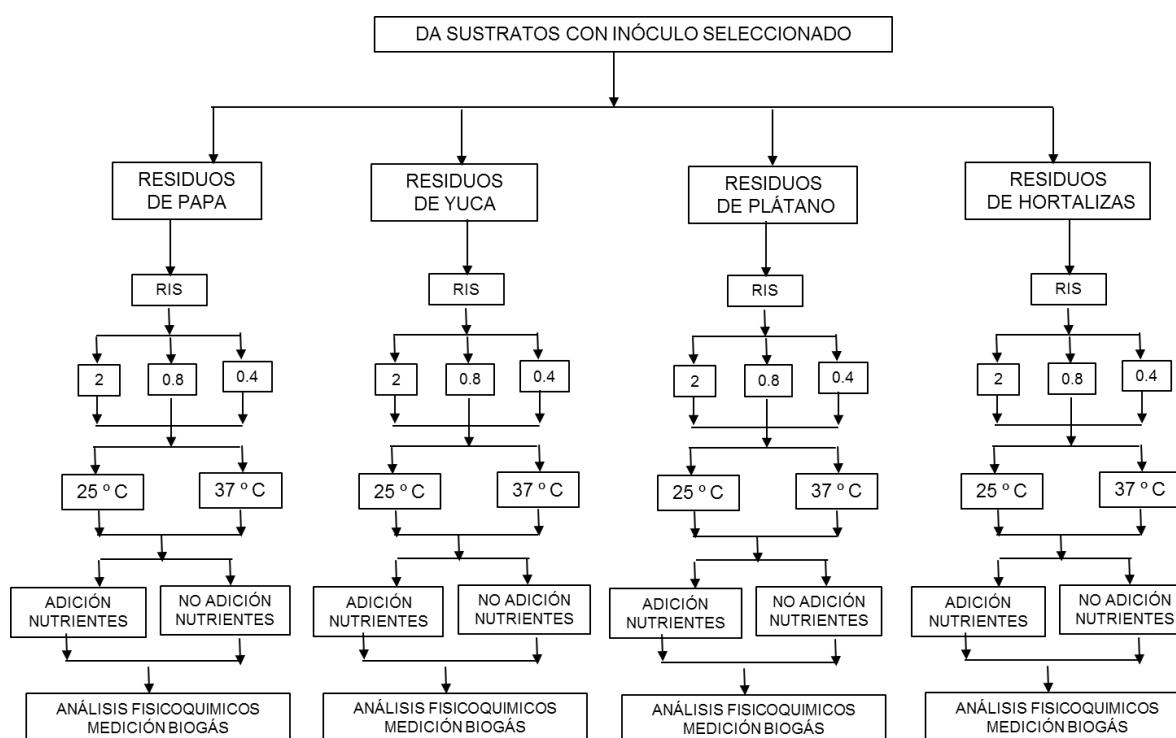
1.2.2 Digestión Anaerobia de residuos orgánicos con inóculo seleccionado.

La mezcla uno a uno de lodo PTAR/lodo PORC fue seleccionado como inóculo. La evaluación de la RIS y la temperatura en la DA fueron evaluados en reactores de 0.5 L sometidos a condiciones de anaerobiosis. A los biorreactores se agregaron los volúmenes de inóculo y sustrato de acuerdo con la RIS establecida, posteriormente fueron tapados con corchos de butilo y sellados con agrafes de aluminio. Se tomó una base fija de inóculo 7.2 g SV y cargas orgánicas de 3.6 g SV, 9 g SV y 18 g SV para valores de RIS de 2, 0.8 y 0.4, respectivamente. Las temperaturas evaluadas fueron $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sustratos fueron inicialmente triturados para reducir el tamaño de partícula. Cada reactor fue

montado por duplicado y con un blanco que contenía la misma cantidad de sustrato, sin inóculo. Con el fin de evaluar la influencia de los nutrientes en los sistemas, se realizó la adición de nutrientes a algunos reactores.

En la **Figura 5** se presenta el desarrollo metodológico seguido para esta etapa experimental.

Figura 5. Diagrama de metodología utilizada en la DA de residuos orgánicos con el inóculo seleccionado.



Los sustratos utilizados fueron residuos de papa, yuca, plátano y hortalizas. Estos residuos son abundantes dentro de la fracción orgánica de los residuos y forman parte de la dieta básica en nuestra región. El volumen teórico de metano de cada uno de los sustratos se calculó teniendo en cuenta el % ST, la DQO de los sólidos, utilizando el factor de corrección de producción de metano a las temperaturas de

trabajo, asumiendo una producción del 90 %. En la **Tabla 4** se presentan los nutrientes adicionados a los reactores.

Tabla 4. *Nutrientes adicionados a los reactores para la DA de residuos orgánicos con el inóculo seleccionado.*

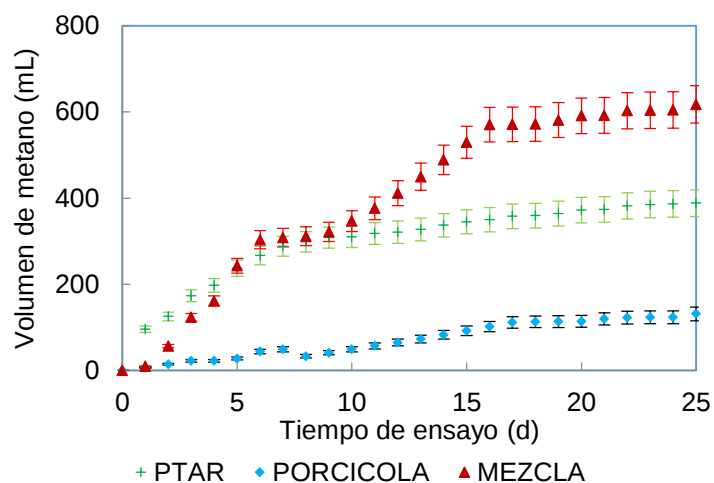
Nutriente	Concentración
Solución macronutrientes	kg/m ³
NH ₄ Cl	85
KH ₂ PO ₄	37
CaCl ₂ .2H ₂ O	8
MgSO ₄ .4H ₂ O	9
Solución elementos trazas	kg/m ³ x 10 ⁻³
FeCl ₃ .4H ₂ O	1
CoCl ₂ .6H ₂ O	1
MnCl.4H ₂ O	0.25
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.015
ZnCl ₂	0.025
H ₃ BO ₃	0.025
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.045
Na ₂ SeO ₃ .H ₂ O	0.050
NiCl ₂ .6H ₂ O	0.025
HCl 36%	0.005
Resarzurina	0.250
Extracto de Levadura	--

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Selección del inóculo

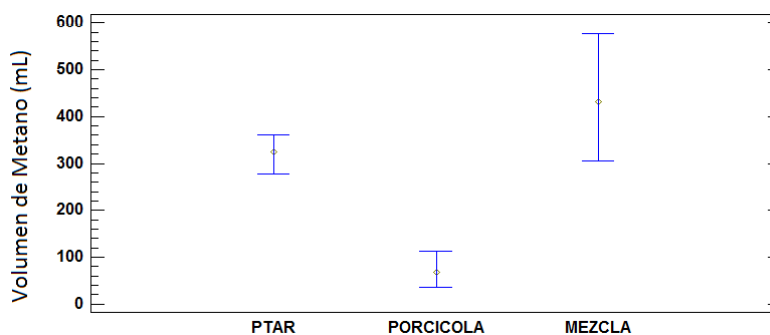
1.3.1.1 Medición de la Actividad Metanogénica Específica. En la **Figura 6** se muestran los resultados de la producción de metano durante 25 días de experimentación para cada uno de los inóculos evaluados utilizando como sustrato la mezcla de ácido acético, propiónico y butírico. El inóculo que contenía la mezcla de lodos mostró la mayor capacidad de conversión del sustrato, alcanzando un volumen de producción de metano de 591 mL, seguido por el lodo PTAR con 367 mL y por último, el lodo porcícola con 167 mL.

Figura 6. Evolución de la producción de metano para los lodos PTAR, porcícola y su mezcla a 37 °C.



En la **Figura 7**, se observa diferencia estadística significativa entre la producción de metano de los tres inóculos evaluados para el cálculo de la AME.

Figura 7. Comparación análisis ANOVA de producción de metano de los inóculos evaluados.



En la Tabla 5 se observa que para el análisis post ANOVA donde se compara por parejas los tres lodos evaluados, el valor de P-value es menor a 0.05, lo que indica una diferencia significativa entre las desviaciones estándar de las parejas de lodos evaluadas.

Tabla 5. Valores de estadístico de Levene para análisis de varianza del volumen de metano de los lodos evaluados.

	Test	P-Value		
Levene's	20.0064	1,0885E-7		
Comparación	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
PTAR / PORCICOLA	100.383	42.8495	5.48815	0.0001
PTAR / MEZCLA	100.383	201.667	0.24777	0.0009
PORCICOLA / MEZCLA	42.8495	201.667	0.0451464	0.0000

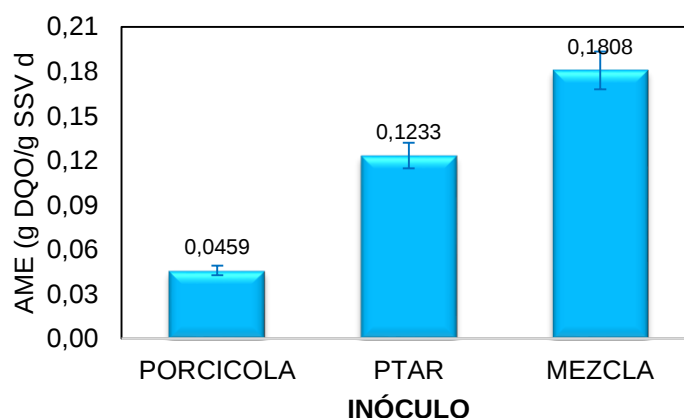
De acuerdo con los resultados de la **Figura 6**, se calculó la AME para cada uno de los inóculos. En la **Figura 8**, el lodo con mayor AME fue el de la mezcla con 0.1808 (g DQO/g SSV·d), que es el resultado de la sinergia entre la población microbiana presente en los dos lodos, seguido por el lodo granular de la PTAR con 0.1233 (g DQO/g SSV· d) y por último lodo porcícola con 0.0454 (g DQO/g SSV). d. Quintero ⁸³ reportó un valor superior de AME (0.146 g DQO/g SSV· d) para lodo porcícola con acetato como sustrato a 39 ° C y un valor inferior de 0.017 (g DQO/g SSV). d para lodo PTAR comparado con este estudio. Kayranli and Ugurlu ⁸⁴, obtuvieron una AME de 0.74 (g DQO/g SSV·d) con un inóculo proveniente de un reactor de tratamiento aguas residuales y ácido acético como sustrato a 25 ° C y observaron que la AME se redujo al disminuir la temperatura de evaluación. Los resultados de la AME dependen del tipo de inóculo utilizado, el tipo de sustrato, la temperatura y el método

⁸³ QUINTERO, M., CASTRO, L., ORTIZ, C., GUZMÁN, C. ESCALANTE, H. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. En: Bioresource Technology. Vol.; 108. 2012, p. 8–13.

⁸⁴ KAYRANLI, B and UGURLU, A. Assessment of methanogenic activity and kinetics of anaerobic granular sludge. En: Fresenius Environmental Bulletin. Vol.; 21(8B). 2012, p. 2394–2398.

de medición utilizado. Por esta razón, se pueden encontrar en la literatura diferencias marcadas en sus valores.

Figura 8. Actividad Metanogénica Específica de los lodos evaluados.



1.3.1.2 Producción específica de Metano con FO de RSU como sustrato. En la **Tabla 6** se muestra la composición de la FO de RSU utilizada como sustrato. La reducción del tamaño de partícula a un intervalo de 2 a 4 mm se realizó debido a que las partículas pequeñas aumentan el área superficial disponible a los microorganismos que amplía la disponibilidad del alimento y por ello incrementa la biodegradabilidad ^{85 86}.

⁸⁵ MSHANDETE, A., BJORNSSON, L., KIVAIISI, A.K., RUBINDAMAYUGI, M.S.T., MATTIASSON, B., Effect of particle size on biogas yield from sisal fiber waste. Renewable. En: Energy. Vol.; 31. 2006; p. 2385-2392.

⁸⁶ IZUMI, K., OKISHIO, Y-K., NAGAO,N., NIWA, CH., YAMAMOTO,Sh., TODA, T. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.; 64. 2010; p. 601-608.

Tabla 6. Composición general del sustrato para la selección del inóculo con carga real de RSU.

COMPONENTE	Composición (% p/p en Sustrato Seco)
Material fácilmente biodegradable	81.20
Celulosa	6.10
Hemicelulosa	2.73
Lignina	4.95
Cenizas	5.02

Fuente: CICELPA-UIS

En la **Tabla 7** se muestran las características fisicoquímicas del sustrato utilizado,

Tabla 7. Caracterización fisicoquímica del sustrato para la selección del inóculo con carga FO de RSU.

Parámetro	Unidades	Valor
Tamaño de partícula	mm	4 - 6
Densidad real	kg/m ³	1052
Densidad aparente	kg/m ³	864
Sólidos totales	%(p/p)	16-18
Sólidos volátiles	%(p/p)	15.1
SV/ST	% (p/p)	94.4
Carbono Orgánico Total	%(p/p)	39
Nitrógeno Total	%(p/p)	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

Fuente: CEIAM-UIS

Las características fisicoquímicas de la Tabla 7 se encontraron dentro de los intervalos recomendados en procesos biológicos, porcentaje de humedad de 74 a

90 %, la relación SV/ST entre 87 – 97 % y la relación C/N de 14.7 a 36.4. Los valores presentados en las Tablas 6 y 7 fueron tomados del trabajo de Castillo ⁸⁷.

En la **Figura 9** se muestra que durante la producción específica de metano con FO de RSU como sustrato. En el caso del proceso a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 8 %ST, la evolución del pH fue similar para los reactores con los diferentes inóculos. Al inicio, los valores del pH estuvieron por debajo de 6, debido a la formación de los AGVs, luego aumentó a un valor cercano a 7 que favoreció el inicio de la etapa metanogénica, para los reactores de lodo MEZ y PORC como inóculo. Posteriormente, se produjo un descenso del pH a valores de 6.5 para estos dos inóculos, favoreciendo aún la etapa metanogénica, ya que se encuentra dentro del intervalo normal de pH (entre 6.5 y 7.5) en el cual se produce una actividad metanogénica normal ⁸⁸ ⁸⁹. El lodo PTAR mostró inestabilidad al presentar valores de pH inferiores a 6 que influyeron en su baja producción de metano. Liu ⁹⁰ encontró que la metanogénesis y la actividad de las bacterias metanogénicas se presenta bajo condiciones de pH entre 6.5 – 7.5, aunque este valor varía con el sustrato y la técnica de digestión. Los valores de pH adecuados para el tratamiento de la FO de RSU se encuentra entre 7 – 7.5 bajo condiciones termofílicas; la actividad metanogénica se reduce al disminuir el pH y llega a inhibirse con pH menores a 6. La temperatura a la que se encontraba el sistema puede haber disminuido la actividad metabólica de los microorganismos, causando acumulación en los AGVs y la disminución en el pH.

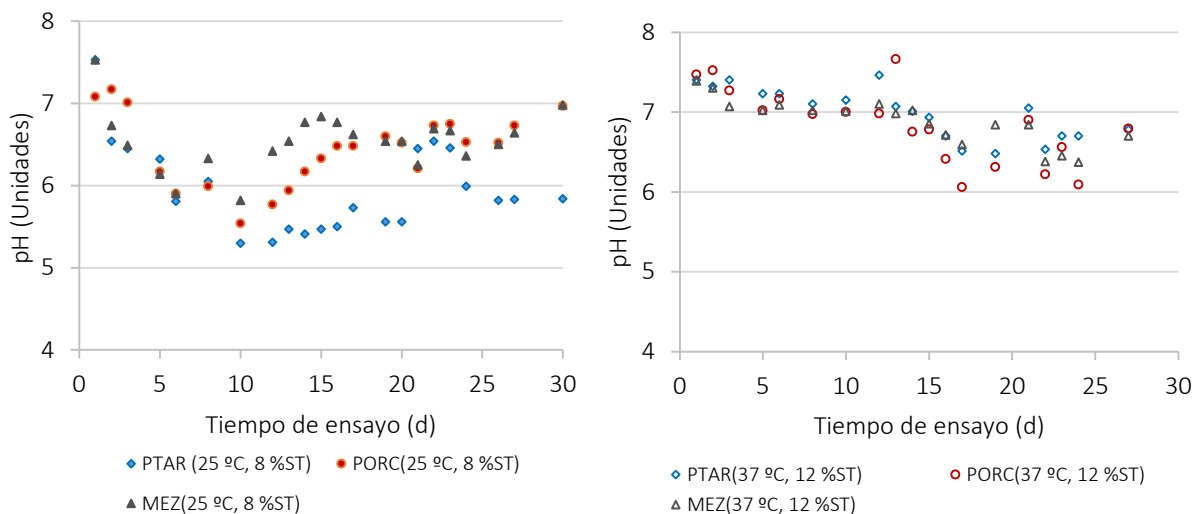
⁸⁷ CASTILLO, E., CRISTANCHO, D., ARELLANO, V. Study of the operational conditions for anaerobic digestion of urban solid wastes. En: Waste Management. Vol.; 26. 2006; p. 546–556.

⁸⁸ PALATS. Op. Cit.

⁸⁹ LEE, D.H., BEHERA, S.K., KIM, J., PARK, H.S. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab scale study. En: Waste Management. Vol.; 29. 2009, p. 876–882.

⁹⁰ LIU, C., YUAN, X., ZENG, G., LI, W., LI, J. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2008; p. 882–888.

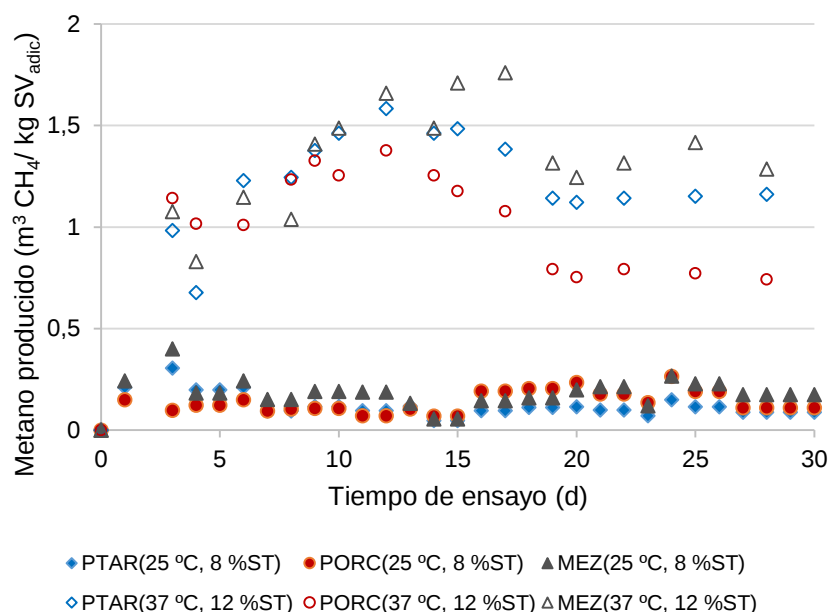
Figura 9. Evolución del pH durante la producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 %ST) y ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 % ST).



En el caso de los reactores a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12 % ST (**Figura 9**), se observa que los tres reactores en general presentaron valores de pH entre 6.5 a 7.5 permitiendo el desarrollo de la actividad metanogénica.

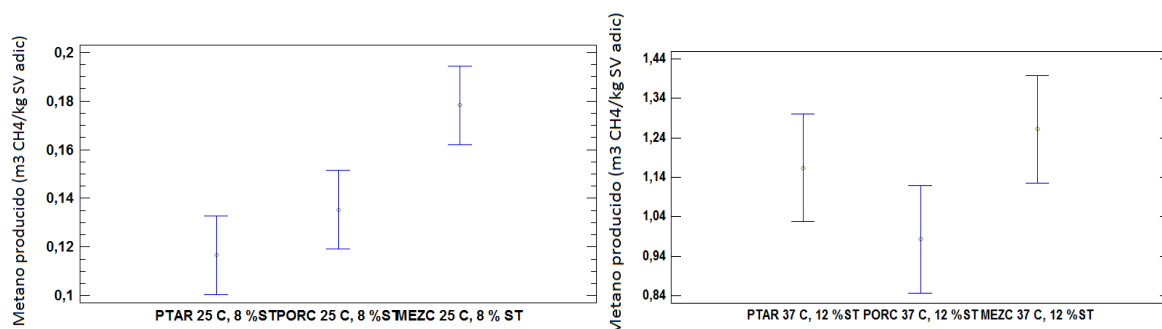
La principal variable de selección del inóculo fue la producción específica de metano en los tres reactores evaluados con cada uno de los inóculos; PTAR, PORC y MEZ. Esta producción específica de metano fue calculada tomando el volumen de metano generado bajo condiciones estándar de presión y temperatura por la cantidad de sustrato adicionado en términos de SV. En la **Figura 10** se observa que cuando los reactores se operaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y 8 % ST, el uso de lodo mezcla mostró una mayor producción de metano en los primeros días, luego disminuyó y aumentó nuevamente hacia el final de la operación (**Figura 10**).

Figura 10. Producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 %ST) y ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 % ST).



Considerando la producción específica de metano en esta etapa de evaluación, el reactor con la mezcla de lodos como inóculo, presentó la mayor producción ($0.45\text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{adicionado}} \cdot \text{d}$), siendo un 40 % mayor comparado con el reactor que usó el lodo PTAR ($0.14\text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{adicionado}} \cdot \text{d}$) y un 17 % al reactor con lodo PORC ($0.19\text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{adicionado}} \cdot \text{d}$) como inóculo. Cuando los sistemas experimentaron aumento de temperatura a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y ST al 12 %, la producción específica de metano llegó a triplicarse en algunos casos, alcanzando en las condiciones de ensayo un valor promedio de $1.33\text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{adicionado}} \cdot \text{d}$ y $1.28\text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{adicionado}} \cdot \text{d}$ para los reactores con MEZ y PTAR, respectivamente; mientras que el reactor con PORC alcanzó un $1.14\text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{adicionado}} \cdot \text{d}$ de producción. Los valores de producción específica de metano se incrementaron al aumentar tanto la temperatura como el % ST. Al incrementar el valor de estas variables, los microorganismos aumentan su actividad metabólica, en el caso de la temperatura y con el % ST, ya que tienen acceso a una mayor proporción de alimento, que en este caso no llegó a causar inhibición.

Figura 11. Comparación análisis ANOVA de la producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 %ST) y ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 % ST).



De acuerdo con los resultados de la producción específica de metano a las dos condiciones de temperatura y porcentaje de sólidos totales, no se presentó diferencia estadística significativa entre los valores obtenidos para las condiciones definidas entre los inóculos evaluados (**Figura 11**).

En la **Tabla 8** se observa que la comparación por parejas de los lodos, el valor de P-value es mayor a 0.05, indicando que no hay diferencia significativa entre las desviaciones estándar de las parejas de lodos evaluadas.

Tabla 8. Valores de estadístico de Levene para análisis de la producción específica de metano para los diferentes inóculos con FO de RSU como sustrato ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 %ST) y ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 % ST).

25 °C, 8 % ST				
	Test	P-Value		
Levene's	0.382154	0.683529		
Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Value
PTAR / PORC	0.0587358	0.0580384	1.02418	0.9491
PTAR / MEZC	0.0587358	0.0710609	0.683196	0.3106
PORC / MEZC	0.0580384	0.0710609	0.667067	0.2814
37 °C, 12 % ST				
	Test	P-Value		
Levene's	0.0442878	0.95672		
Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Value
PTAR / PORC	0.381959	0.342	1.24733	0.6741

PTAR / MEZC	0.381959	0.41941	0.829385	0.7218
PORC / MEZC	0.342	0.41941	0.664928	0.4386

Guo ⁹¹ evaluó reactores continuamente agitado a 55 °C ±1 °C y 35 °C ±1 °C utilizando lodo proveniente de un digestor anaerobio de agua residual porcícola como inóculo. El sustrato utilizado fue residuos de comida de cafetería y obtuvieron una producción específica de metano de 0.557 ± 0.026 (m³/ kg SV _{adicionado} ·d) para el reactor a 55 °C ±1 °C y 0.493 ± 0.044 (m³/ kg SV _{adicionado} ·d) para el reactor a 35 °C ±1 °C, la cual fue inferior a la producción de 1.14 (m³ CH₄/ kg SV _{adicionado} ·d) obtenida en este trabajo para el lodo porcícola evaluado a 37 ± 2 °C. Al aumentar la temperatura se observó un incremento en la producción de metano en ambos estudios. La diferencia al comparar los resultados de los dos estudios es debido principalmente a la naturaleza del sustrato y al pretratamiento realizado por Guo ⁹²; quien sometió el inóculo a un periodo de ausencia de alimento por dos semanas, llevando posiblemente a una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos.

Lin ⁹³ utilizó un reactor continuamente agitado de 4 L, operado a 35 ± 1 °C con lodo granular proveniente de un reactor anaerobio de flujo ascendente como inóculo en contacto con residuos de frutas y verduras como sustrato, obteniendo una producción de metano de 0.42 (m³/kg SV). Al utilizar como sustrato residuos de comida, el proceso de DA falló debido a la acumulación de ácidos, por lo cual decidieron realizar una mezcla uno a uno de ambos residuos, con el mismo inóculo y obtuvieron una producción de metano ligeramente superior de 0.49 (m³ /kg SV). Las producciones obtenidas en ambos casos son inferiores comparadas con 1.28 (m³ CH₄/ kg SV _{adicionado} ·d) del reactor con lodo PTAR como inóculo.

⁹¹ GUO. Op. Cit.

⁹² GUO. Op. Cit.

⁹³ LIN, J., ZUO, J., GAN, L., LI, P., LIU, F., WANG, K., CHEN, L., GAN, H. Effects of mixture ratio on anaerobic co-digestion with fruit and vegetable waste and food waste of China. En: Journal of Environmental Sciences. Vol.; 23(8). 2011; p. 1403–1408.

En la **Figura 12**, el reactor con lodo mezcla como inóculo presentó la mayor producción específica de metano, seguido por el lodo porcícola y por último el lodo PTAR a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 8 %ST . En el caso de reactores operados $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y 12 % ST, la mayor producción de metano se presentó en el reactor con lodo mezcla como inóculo seguido del lodo PTAR y por último, el lodo porcícola. El aumento en la temperatura triplicó la producción específica de metano. La temperatura juega un papel muy importante en el proceso de DA; así por ejemplo, Lianhua ⁹⁴, reportó un aumento en la producción específica de metano al evaluar residuos de paja de arroz con 7.5 %ST a diferentes temperaturas, obteniendo $0.0916\text{ (m}^3\text{ CH}_4\text{/kg SV)}$ a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0.120\text{ (m}^3\text{ CH}_4\text{/kg SV)}$ a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.135\text{ m}^3\text{ (CH}_4\text{/kg SV)}$ a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, Cavinato ⁹⁵ reportó una mayor producción de biogás bajo condición termofílica comparada con la mesofílica, mejorando la producción de biogás entre 45-50 % en la DA de lodo activado y FO de RSU. Otros autores, tales como Kim ⁹⁶ obtuvieron un incremento de $0.2\text{ (m}^3\text{/kg SV)}$ en la producción de biogás cuando operaron a condición termofílica comparada con la mesofílica para la DA de lodo granular con FO de RSU.

Los reactores inoculados con la mezcla de lodos mantuvieron una producción de metano mayor comparada con los otros dos sistemas; este resultado es el producto del sinergismo entre los microorganismos presentes en cada uno de los lodos ⁹⁷. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó el lodo mezcla como inóculo para este trabajo de investigación.

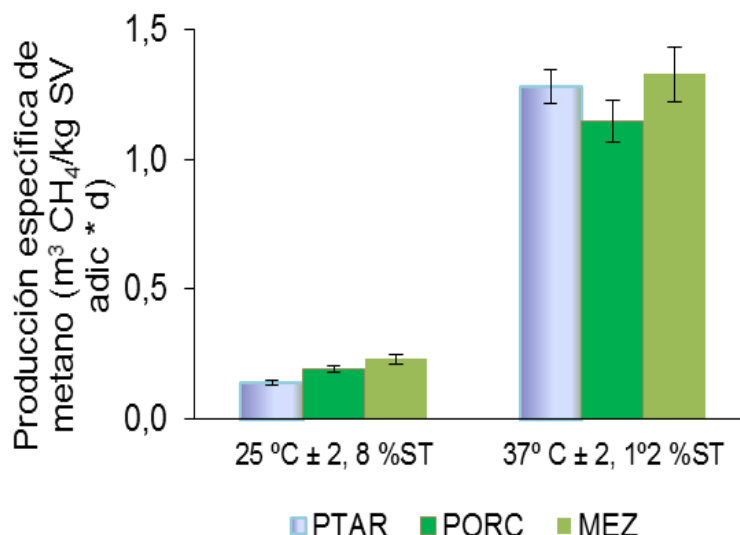
⁹⁴ LIANHUA, L., DONG, L., YONGMING, S., LONGLONG, Ma., ZHENHONG, Y., XIAOYING, K. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. En: International Journal of Hydrogen Energy. Vol.; 35. 2010, p. 7226-7266.

⁹⁵ CAVINATO, C., BOLZONELLA, D., PAVAN, P., FATONE, F., CECCHI, F. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge and source sorted biowaste in pilot-and full-scale reactors. En: Renewable Energy. Vol.; 55. 2013; 260–265.

⁹⁶ KIM, H.W., NAM, J.Y., SHIN, H.S. A comparison study on the high-rate co-digestion of sewage sludge and food waste using a temperature-phased anaerobic sequencing batch reactor system. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 7272–7279.

⁹⁷ YE, J., LI, D.; SUN, Y.; WANG, G.; YUAN, Z.; ZHEN, F.; WANG, Y. Improved biogas production from rice straw by co-digestion with kitchen waste and pig manure. En: Waste Management. Vol.; 33. 2013, p. 2653-2658.

Figura 12. Producción específica de metano en los reactores de biodegradación anaerobia de residuos sólidos utilizando diferentes tipos de inóculo.

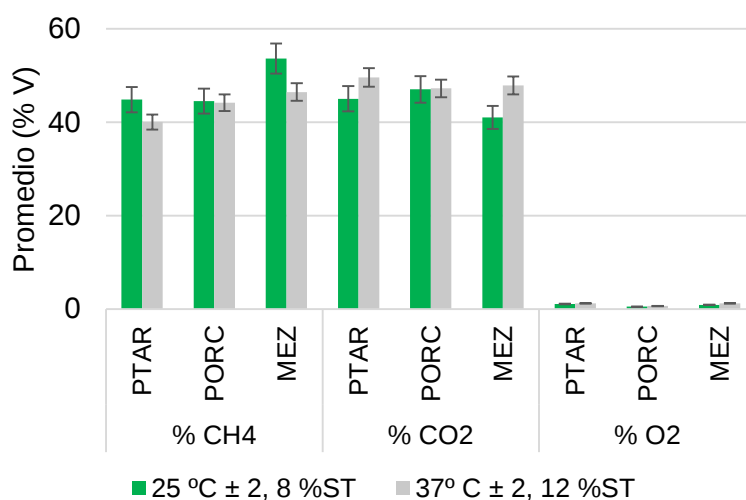


En la **Figura 13**, el porcentaje de metano para los reactores que contenían lodo porcícola y la mezcla uno a uno de lodos alcanzaron valores entre el 40 y 60 % V a la dos temperaturas. A $37 \pm 2^\circ \text{C}$, el reactor con lodo PTAR, no superó el 40 % V de CH_4 , siendo mayor el porcentaje a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Con relación al dióxido de carbono, los valores estuvieron entre el 40 al 50 % V. Estos valores se encuentran en rangos previamente reportados por otros autores. Así por ejemplo, Walker ⁹⁸; observó un porcentaje de metano entre 43 al 72 % en un proceso anaerobio de sustrato sintético representativo de la fracción biodegradable de residuos urbanos y lodo de una planta de aguas residuales como inóculo. García-Peña ⁹⁹, obtuvo un porcentaje de metano entre 45 – 53 % utilizando residuos de frutas y vegetales como sustrato y estiércol de vaca como inóculo.

⁹⁸ WALKER, M., BANKS, C.J., HEAVEN, S. Two-stage anaerobic digestion of biodegradable municipal solid waste using a rotating drum mesh filter bioreactor and anaerobic filter. En: Bioresource Technology. Vol.; 100. 2009, p. 4121–4126.

⁹⁹ GARCÍA-PEÑA. Op. Cit.

Figura 13. Composición porcentual de gases producidos durante la producción específica de metano de FO de RSU utilizando diferentes inóculos. Nota: Los valores expuestos representan el promedio durante toda la operación de los reactores.



1.3.2 Digestión anaerobia de residuos orgánicos con inóculo seleccionado.

Luego de seleccionar la mezcla uno a uno de lodo PTAR/lodo PORC como el inóculo de mejor desempeño, se procedió a la evaluación del potencial de metanización de algunos sustratos normalmente presentes en los residuos de plazas de mercado locales. En la **Tabla 9**, se presenta la caracterización realizada a cada uno de los sustratos empleados. En ella se observa que el sustrato con el menor valor de DQO es el constituido por residuos de plátano y el de mayor DQO el de residuos de yuca. Con relación a los SV, los residuos de hortalizas mostraron la menor concentración de éstos y los residuos de yuca el mayor valor.

Tabla 9. Caracterización de sustratos empleados en la evaluación del potencial de metanización.

Caracterización de sustratos			
Sustrato	DQO (g O ₂ / kg masa seca)	ST (kg/m ³)	SV (kg/m ³)
Residuos de papa	1087.92	2461	440
Residuos de yuca	908.81	2230	480
Residuos de plátano	824.19	2699	440
Residuos de hortalizas	861.46	2846	320

Fuente: CEIAM-UIS

En la **Tabla 10** se presenta una caracterización típica del contenido de proteína, carbohidratos, lípidos y fibra de estos residuos. En ella se observa que los residuos de plátano presentan el mayor contenido de carbohidratos y de lípidos. De igual forma, los residuos de lechuga y zanahoria presentan el menor porcentaje de carbohidratos.

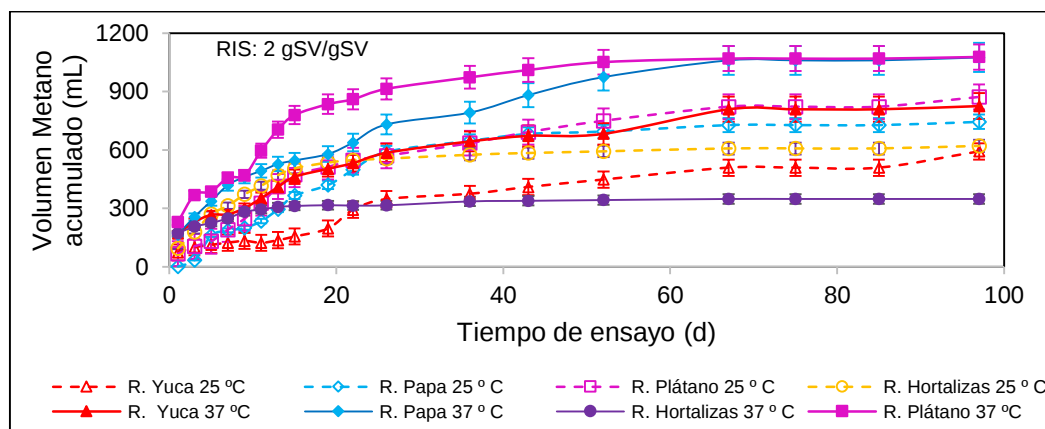
Tabla 10. Porcentaje de proteína, carbohidratos, lípidos y fibra presentes en los sustratos.

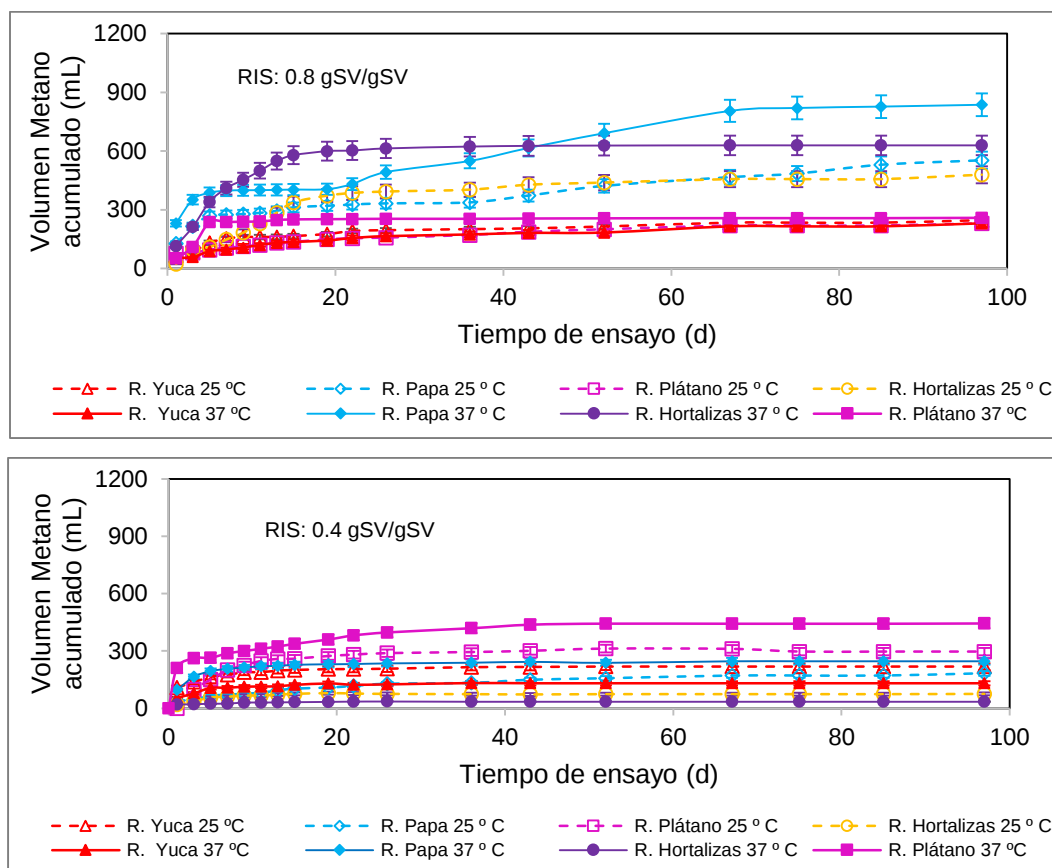
Composición porcentual (%)				
Sustrato	Proteína	Carbohidratos	Lípidos	Fibra
Residuo de Plátano	1.3	70	0.5	0.8
Residuo de Papa	1.5	25	0.3	0.9
Residuo de yuca	1.1	18	0.8	3.2
Residuo de hortalizas	0.8	4	0.2	3.4

Fuente: CEIAM-UIS

En la **Figura 14** se observa que los reactores con los residuos de plátano y papa mostraron los mayores valores de metano con las diferentes RIS. En general, los sustratos alcanzaron una mayor producción de metano a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ de temperatura.

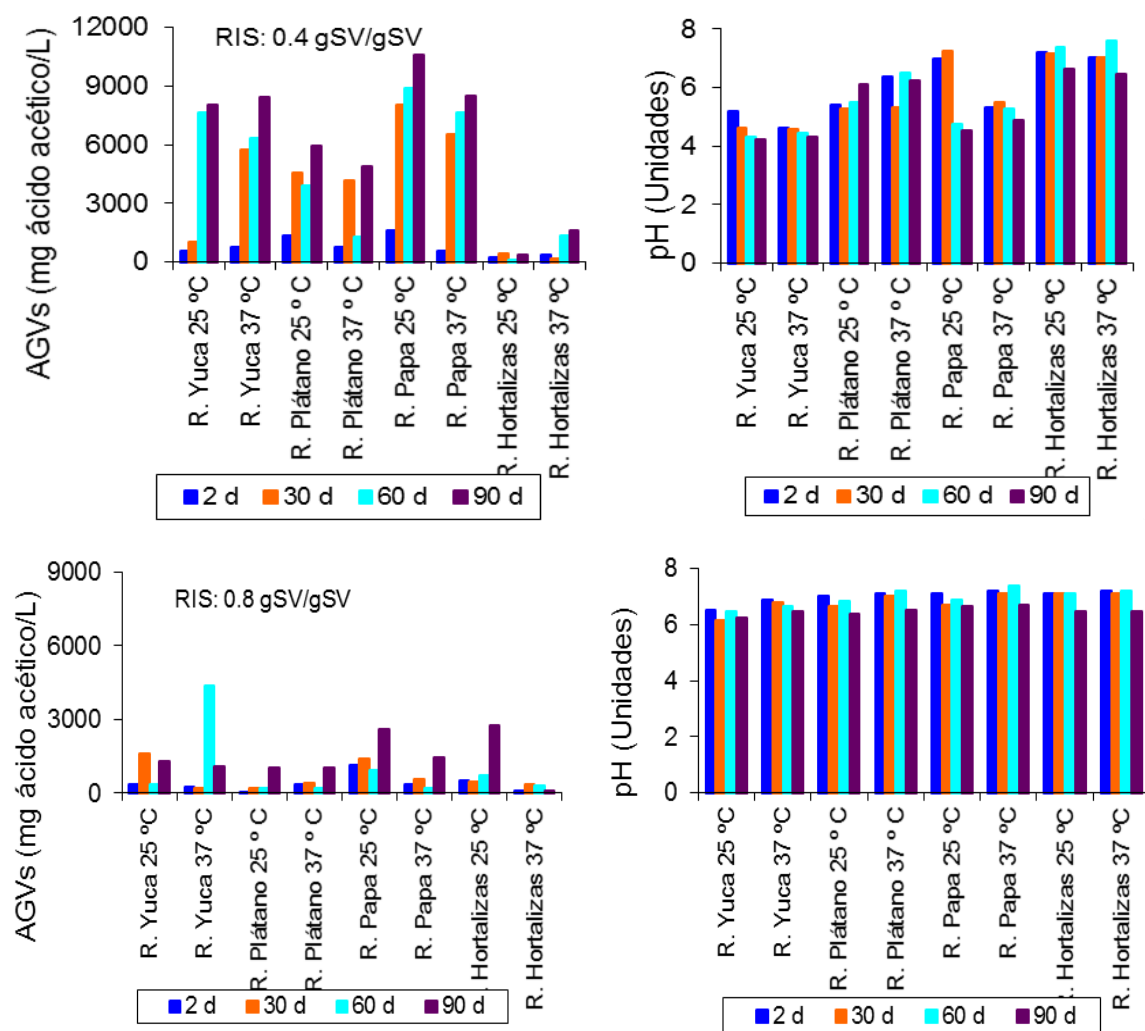
Figura 14. Producción de metano de los diferentes residuos (R) a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ para cada RIS evaluada.

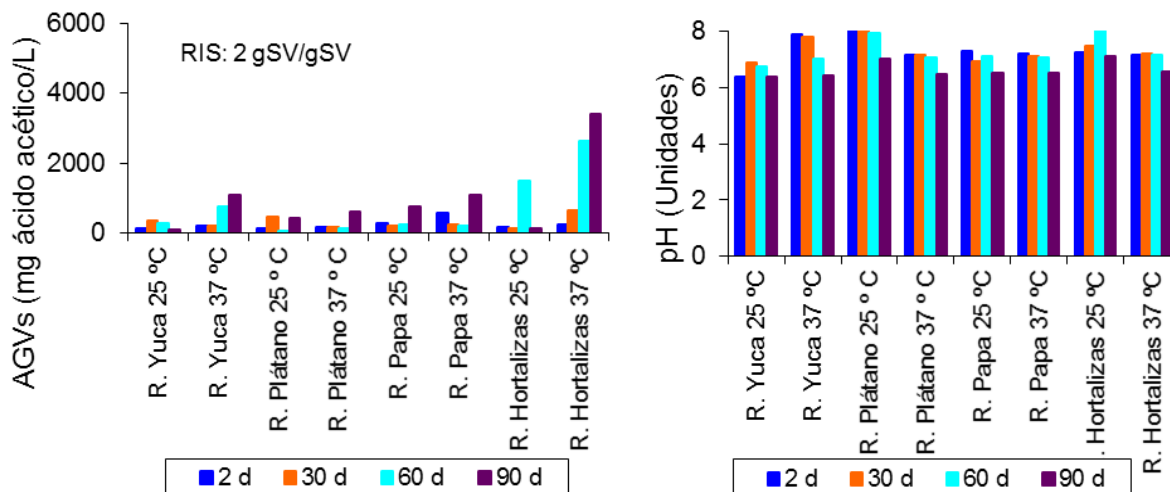




En la **Figura 15** se muestran los valores de AGVs y pH para cuatro muestras tomadas durante el seguimiento de reactores con diferentes RIS. En los reactores con RIS de 2 (gSV/gSV) se observaron valores de AGVs inferiores a 2000 mg/L y pH cercanos a 7.0 que permitieron un desarrollo adecuado del proceso de DA, con excepción del residuo de hortalizas. En los reactores con RIS de 0.8 (gSV inóculo/gSV_{sustrato}) se observaron algunos valores de AGVs superiores a 2000 mg/L causando descenso en el pH e inhibición en el proceso de producción de biogás. En la mayoría de los reactores con RIS de 0.4 (gSV_{inóculo}/gSV_{sustrato}) se observó acumulación de AGVs acompañados de disminución en el pH, causando acidificación en el reactor.

Figura 15. Evolución de AGVs y pH para las diferentes RIS a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ de temperatura.





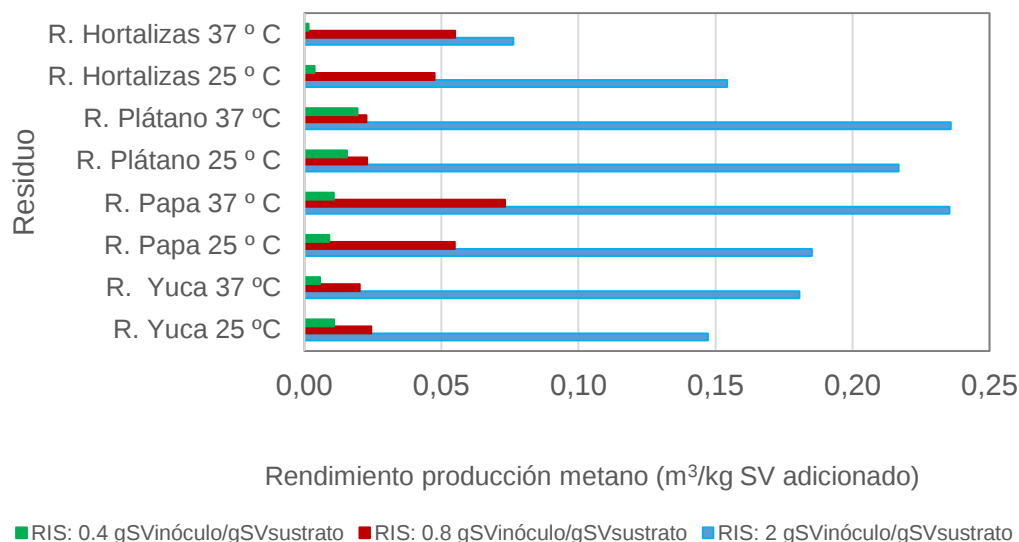
El rendimiento en la producción de metano para cada uno de los residuos fue calculado dividiendo el metano calculado bajo condiciones de operación estándar de presión y temperatura por la cantidad de sustrato adicionado ¹⁰⁰. En la **Figura 16** se observa que los mayores rendimientos fueron para los reactores con residuos de papa y plátano a 37 °C (0.235 m³/kg SV adicionado) y a 25 °C con 0.217 (m³/kg SV adicionado) para el reactor con residuo de plátano y 0.185 (m³/kg SV adicionado) para el residuo de papa. Estos dos residuos presentaron un rendimiento de producción de metano similar a las dos temperaturas con la RIS de 2 (gSV inóculo/gSV sustrato). Cabe destacar que estos dos residuos presentan la mayor concentración de carbohidratos y proteínas que permiten una mayor acción de los microorganismos metanogénicos ¹⁰¹. Los residuos de hortalizas presentaron el menor rendimiento y contrario a los otros residuos su rendimiento fue mayor a 25 °C. Este efecto se debe en parte a que las hortalizas presentan una baja composición en carbohidratos, lo cual no favorece la producción de biogás ¹⁰².

¹⁰⁰ RAPOSO. Op. Cit.

¹⁰¹ NEVES, L., GONSALO, E., OLIVEIRA, R., ALVES, M.M. Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures. En: Waste Management. Vol.; 28. 2008, p. 965–972.

¹⁰² AMON, T., AMON, B., KRYVORUCHKO, V., ZOLLITSCH, W., MAYER, K., GRUBER, L. Biogas production from maize and dairy cattle manure - Influence of biomass composition on the methane yield. En: Agriculture, Ecosystems and Environment. Vol.; 118. 2007; p. 173–182.

Figura 16. Rendimiento en producción de metano para diferentes RIS a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ de temperatura.



Se ha observado que a mayores valores de RIS se obtiene un mayor rendimiento ^{103 104}. El acetato producido durante la DA a elevadas concentraciones de sustrato (RIS bajas) puede inhibir los microorganismos metanogénicos presentes y una mayor dilución del sustrato (RIS elevadas) ayuda a la producción de metano ¹⁰⁵.

Algunos autores como Bouallagui ¹⁰⁶ evaluaron cuatro reactores secuenciales de 2 litros a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entre los sustratos evaluados, trabajaron con residuos de frutas y vegetales que contenían calabacines, manzana, lechuga, tomate, naranja, pera, papa y zanahoria. La producción de metano obtenida para este reactor fue de $0.31\text{ (m}^3\text{ /kg SV)}$. Este resultado es superior al de $0.23\text{ (m}^3\text{ /kg}$

¹⁰³ RAPOSO, F., BORJAA, R., MARTIN, M.A., MARTIN, A., RUBIA, M.A., RINCON, B. Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: process stability and kinetic evaluation. En: Chemical Engineering Journal. Vol.; 149. 2009, p. 70–77.

¹⁰⁴ ALZATE, M.E., MUNOZ, R., ROGALLA, F., FDZ-POLANCO, F., PREZ-ELVIRA, S.I. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. En: Bioresource Technology. Vol.; 123. 2012, p. 488–494.

¹⁰⁵ MAYA-ALTAMIRA, L., BAUN, A., ANGELIDAKI, I., SCHMIDT, J.E. Influence of wastewater characteristics on methane potential in food-processing industry wastewaters. Water Res. Vol.; 42. 2008, p. 2195–2203.

¹⁰⁶ BOUALLAGUI, H., RACHDI, B., GANNOUN, H. y HAMDI, M. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of abattoir wastewater and fruit and vegetable waste in anaerobic sequencing batch reactors. En: Biodegradation. Vol.; 20. 2009; p. 401–409.

SV) obtenido con los residuos de papa y plátano a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$. De otro lado, Ferrer *et al.*; (2014), evaluaron diferentes residuos agrícolas seleccionados debido a su disponibilidad y alto contenido en carbohidratos fácilmente biodegradables (pimienta, tomate y melocotón), utilizando estiércol de cerdo como inóculo a 35°C durante 100 días con una RIS de 0.7 ($\text{gSV}_{\text{inóculo}}/\text{gSV}_{\text{sustrato}}$). El rendimiento en la producción de metano de los residuos agrícolas fueron de 0.279 ± 0.042 ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$) adicionado para pimienta, 0.277 ± 0.038 ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$) adicionado para tomate y 0.2611 ± 0.030 ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg SV}$) para melocotón. Estos resultados son superiores para la RIS de 0.8 ($\text{gSV}_{\text{inóculo}}/\text{gSV}_{\text{sustrato}}$) utilizado con los residuos de yuca, papa, plátano y hortalizas de este trabajo de investigación.

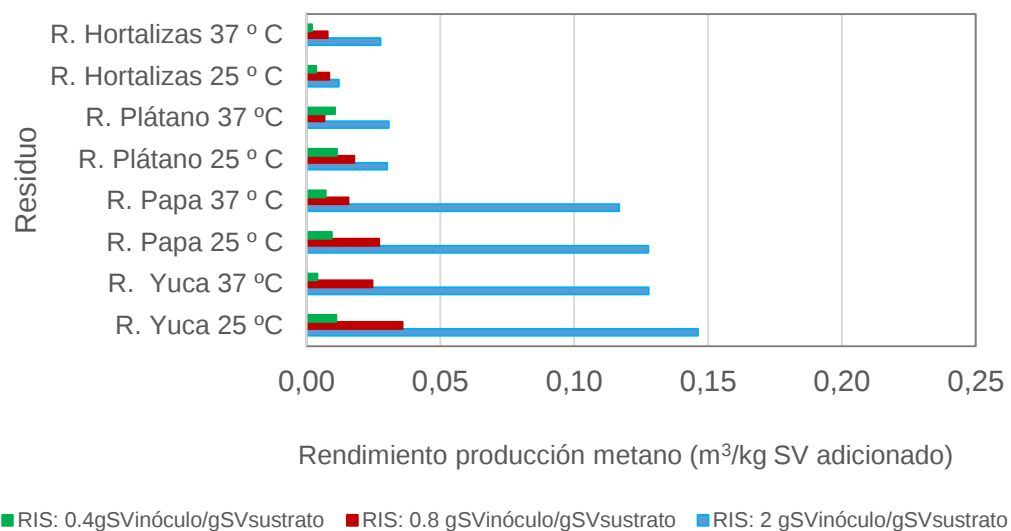
En la **Figura 17** se observa que la mayor producción de metano es para la RIS de 2 ($\text{gSV}_{\text{inóculo}}/\text{gSV}_{\text{sustrato}}$) para los residuos de papa y yuca. Los valores de producción de metano son inferiores a los obtenidos con los reactores sin agregar micronutrientes y elementos trazas. Estos resultados pueden ser el resultado de inhibición causada por la adición de estos micronutrientes. Aunque algunos autores han obtenido un aumento en la producción de metano al adicionar macro y micronutrientes a los sistemas ^{107 108 109}.

¹⁰⁷ UEMURA S. Mineral requirements for mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of organic solid waste. En: International Journal Environment Research. Vol.; 4. 2010, p.33–40.

¹⁰⁸ ZHANG, L., LEE, Y., JAHNG, D. Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: focusing on the role of trace elements. En: BioresourceTechnology. Vol.; 102. 2011, p. 5048–5059.

¹⁰⁹ NGES, I.A AND BJÖRNSSON, L. High methane yields and stable operation during anaerobic digestion of nutrient-supplemented energy crop mixtures. En: Biomass Bioenergy. Vol.; 47. 2012, p. 62–70.

Figura 17. Rendimiento en producción de metano para diferentes RIS a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ de temperatura con adición de micronutrientes en los reactores.



2. SELECCIÓN DEL TIPO DE SOPORTE PARA REACTOR METANOGENICO DE PELÍCULA ADHERIDA

El proceso de DA puede ser clasificado de acuerdo con el número de reactores utilizados, en sistemas de una o varias fases. En el sistema de una fase, las cuatro principales etapas de la DA ocurren en un mismo reactor y están separadas en tiempo; mientras que el proceso en multi etapas, puede utilizar dos o más reactores que separan la etapa hidrolítica/acidogénica de la etapa acetogénica/metanogénica^{110 111}.

La DA de los RSU en reactores de una sola fase presenta algunas limitaciones, tales como; la disminución en el pH que conlleva a una acidificación no controlada, lo cual inhibe la actividad de las arqueas metanogénicas^{112 113}. La optimización de la DA en procesos de una sola fase se dificulta debido a que las arqueas metanogénicas y las no metanogénicas presentan grandes diferencias con relación a la fisiología, requerimientos nutricionales, crecimiento, características metabólicas y sensibilidad al estrés del medio¹¹⁴. Los sistemas de dos fases pueden llegar a ser más eficientes, debido a la separación de las etapas de hidrólisis/acidificación de las de acetogénesis/metanogénesis, ya que los diferentes tipos de microorganismos en estas etapas no comparten las mismas condiciones operacionales para su óptimo desarrollo. De otro lado, el sustrato del reactor metanogénico que proviene del reactor hidrolítico-acidogénico, ya ha sido pre-digestado y solubilizado con la producción de ácidos grasos volátiles y especialmente de ácido acético. Estas

¹¹⁰ ASLANZADEH, S., RAJENDRAN, K., TAHERZADEH, M.J. A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.; 95.2014; p. 181-188.

¹¹¹ VENTURA, J.S, LEE, JAHNG, D. A comparative study on the alternating mesophilic and thermophilic two-stage anaerobic digestion of food waste. Journal of Environmental Sciences. Vol.; 26. 2014; p. 1274–1283.

¹¹² SCHIEVANO, A., D'IMPORZANO, G., MALAGUTTI, L., FRAGALI, E., RUBONI, G., ADANI, F. Evaluating inhibition conditions in high-solids anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. En: Bioresource Technology. Vol.; 101. 2010; p. 5728–5732.

¹¹³ VENTURA. Op. cit.

¹¹⁴ JAGADABHI, P.S., KAPARAJU, P., RINTALA, J. Two-stage anaerobic digestion of tomato, cucumber, common reed and grass silage in leach-bed reactors and upflow anaerobic sludge blanket reactors. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 4726– 4733.

características favorecen la acción directa de los microorganismos metanogénicos ya que el ácido acético es un precursor inmediato del metano.

En un sistema en dos fases, los reactores empleados en la primera de ellas son generalmente reactores agitados que mejoran la transferencia de masa y la hidrólisis de los sólidos ^{115 116 117}. En la segunda fase suelen utilizarse reactores agitados o UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), cuyo efluente puede ser recirculado o no al primer reactor ^{118 119 120}.

De otro lado, en la segunda fase puede utilizarse un reactor de película adherida, este reactor consiste en un recipiente empacado con un medio de soporte inerte de gran área superficial que permite el crecimiento de microorganismos. La corriente a tratar pasa a través del medio de soporte y los microorganismos adheridos al soporte van removiendo el material presente en el sustrato y formando una biopelícula en la superficie del mismo. Los reactores de película adherida utilizan recipientes de menor tamaño, tiempos de retención cortos, mejoran las velocidades de conversión al reducir la sensibilidad ante variaciones de concentración y presencia de sustancias inhibitoras comparados con otros tipos de reactores ^{121 122 123}.

¹¹⁵ CASTILLO. Op. cit

¹¹⁶ CAVINATO, C., BOLZONELLA, D., FATONE, F., GIULIANO, A., PAVAN, P. Two-phase thermophilic anaerobic digestion process for biohythane production treating biowaste: preliminary results. En: Water Science and Technology. Vol.; 64. 2011; p. 715–721.

¹¹⁷ ASLANZADEH, S., RAJENDRAN, K., TAHERZADEH, M.J. A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.; 95.2014; p. 181-188.

¹¹⁸ VENTURA. Op.cit.

¹¹⁹ DONG, X., SHAO, L., WANG, Y., KOU, W., CAO, Y., ZHANG, D. Biogas by two-stage microbial anaerobic and semi-continuous digestion of Chinese cabbage waste. En: Chinese Journal of Chemical Engineering. Vol.; 23. 2015; p. 847–852.

¹²⁰ WU, L.J, KOBAYASHI, T., LIC, Y.Y, XU, K.Q. Comparison of single-stage and temperature-phased two-stage anaerobic digestion of oily food waste. En: Energy Conversion and Management. Vol.; 106. 2015; p. 1174–1182.

¹²¹ BERTIN, L. LAMPIS, S. TODARO, D., SCOMA, A., VALLINI G., MARCHETTI, L., MAJONE, M., FAVA, F. Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. En: Water Research. Vol.; 44. 2010; p. 4537 -4549.

¹²² ADU-GYAMFI, N., RAVELLA, S.R., HOBBS, P.J. Optimizing anaerobic digestion by selection of the immobilizing surface for enhanced methane production. En: Bioresource Technology. Vol.; 120.2012; p. 248–255.

¹²³ MONTALVO, S., GUERRERO, L., BORJA, R., SÁNCHEZ, E., MILÁN, Zh., CORTÉS, I., DE LA RUBIA, M.A. Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. En: Applied Clay Science. Vol.; 58. 2012; p. 125–133.

La evaluación de los soportes se convierte en uno de los aspectos más importantes que debe ser estudiado dentro de la investigación de los reactores anaerobios de película adherida. Las características físico-químicas de la superficie del soporte permiten la adherencia de los microorganismos, lo cual conlleva a la formación de una biopelícula estratificada que puede realizar una remoción eficiente de contaminantes. En el estado del arte se relacionan trabajos en los cuales se han evaluado diferentes tipos de soportes utilizando como sustrato aguas residuales domésticas e industriales, las cuales contienen una carga orgánica menor comparada con el efluente de la primera etapa del sistema evaluado en esta investigación.

Teniendo en cuenta la importancia del medio de soporte sobre el funcionamiento de reactores anaerobios de película adherida, resulta de gran interés evaluar diferentes tipos de soportes, tanto naturales como sintéticos que permitan realizar un seguimiento a los microorganismos que forman la biopelícula y su influencia en el comportamiento del sistema. En este capítulo se presentan en una primera etapa experimental, la selección del soporte. En ella se evaluaron diferentes soportes, tanto de origen natural como sintético con glucosa como sustrato. En la segunda etapa experimental, se evaluaron dos soportes seleccionados de acuerdo con los resultados de la primera etapa.

2.1 CONFIGURACIÓN DE REACTORES

En la búsqueda de una mayor eficiencia en la remoción de carga orgánica y la especialización de la microbiota se ha implementado el desarrollo de la DA en sistemas de varias etapas ^{124 125 126}, esta separación ha permitido el incremento en

¹²⁴ SANDOVAL. Op.cit,

¹²⁵ SHIN, S.G., HAN, G., LIM, J., LEE, C., HWANG, S. A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste recycling wastewater. En: Water Research. Vol.; 44(17). 2010; p. 4838–4849.

¹²⁶ KIM, S., BAE, J., CHOI, O., JU, D., LEE, J., SUNG, H. A pilot scale two-stage anaerobic digester treating food waste leachate (FWL): Performance and microbial structure analysis using pyrosequencing. En: Procedure Biochemical. 49(2). 2013; p.301–308.

la producción de metano ^{127 128 129 130}. Los reactores de película adherida pueden ser utilizados en la segunda etapa de la DA, permitiendo un mejoramiento en la eficiencia del sistema.

En general, la DA en sistemas de dos etapas ha demostrado una mayor eficiencia en la obtención de metano. Ventura ¹³¹ evaluó la DA de residuos de comida en un sistema de dos etapas con reactores agitados, los cuales operaron a diferentes temperaturas. La mayor tasa de producción de metano de 1.23 (L CH₄ L⁻¹d⁻¹) se obtuvo cuando el primer reactor operó a 36 ± 1°C y el segundo a 55 ± 1°C. En la operación en la que ambos reactores estuvieron a 36 ± 1°C, la producción de metano fue de 0.98 (L CH₄ L⁻¹d⁻¹). Meng ¹³², para la DA de tallos de maíz obtuvieron mayor tasa de producción de metano con valores de 0.50 ± 0.01, 0.63 ± 0.11 y 0.67 ± 0.12 (L CH₄ L⁻¹ d⁻¹) a VCO de 2.5, 4.5, and 8.0 (g SV L⁻¹ d⁻¹) en un sistema de dos etapas en el cual el reactor metanogénico era un filtro anaerobio. Por otro lado, Rincón ¹³³, obtuvieron mayor producción de metano (0.268 ± 0.003 m³ CH₄/kg DQO removido) al tratar el residuo sólido del procesamiento de aceite de oliva en un sistema de dos etapas en el cual el reactor metanogénico contenía saponita como soporte a un TRH de 5 d, comparado con 0.20 (m³ CH₄/kg DQO removido) obtenido en una sola etapa.

Los reactores de película adherida (biopelícula) se utilizan cuando los reactores de biomasa suspendida se encuentran limitados debido a la baja concentración de microorganismos y/o el tiempo de residencia hidráulico, tal como ocurre con los reactores de crecimiento lento o cuando las concentraciones de alimentación se

¹²⁷ RINCÓN. Op. cit.

¹²⁸ LIM, J-W., CHEN, C.L., HO, I.J.R., WANG, J.Y Study of microbial community and biodegradation efficiency for single- and two-phase anaerobic co-digestion of brown water and food waste. En: Bioresource Technology. Vol.; 147. 2013; p.193–201.

¹²⁹ NATHAO. Op. cit.

¹³⁰ SHEN, F., YUAN, H., PANG, Y., CHEN, S., ZHU, B., ZOU, D. Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FVW) and food waste (FW): Single-phase vs. two-phase. En: Bioresource Technology. Vol.; 144. 2013; p. 80–85.

¹³¹ VENTURA. Op. cit.

¹³² MENG, Y., JOST, C., MUMME, J., WANG LINKE, B. An analysis of single and two stage, mesophilic and thermophilic high rate systems for anaerobic digestion of corn stalk. En: Chemical Engineering Journal. Vol.; 288. 2016; p. 79–86.

¹³³ RINCÓN. Op. cit,

encuentran diluidas. Los sistemas de biopelícula fija ofrecen varias ventajas cuando se les compara con los procesos de crecimiento suspendido, tales como; posibilidad de manipulación, aumento en la estabilidad del proceso, baja cantidad de lodo residual, fácil uso en el tratamiento a pequeña escala y capacidad para manejar cargas de choque^{134 135}.

El desarrollo de los reactores de biopelícula ha sido posible en gran medida al mayor conocimiento de los procesos biológicos, cinéticos y de transferencia de masa que ocurren en el exterior y en el interior de la biopelícula y la caracterización de la estructura, la composición y la dinámica poblacional^{136 137 138}.

2.2 SOPORTES PARA REACTORES DE PELÍCULA ADHERIDA

La evaluación de las características de los soportes hace parte del diseño y operación de reactores de película adherida^{139 140 141 142 143}. La utilización de soportes corrugados ha mostrado ventajas relacionadas con la fijación de los microorganismos y la obtención de elevadas eficiencias de remoción de materia

¹³⁴ MUSTAFA, N.; ELBESHBISHY, E., NAKHLA, G.; ZHU, J. Anaerobic digestion of municipal wastewater sludges using anaerobic fluidized bed bioreactor. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 172. 2014; p. 461–466.

¹³⁵ KARADAG, D., KOROGU, E.O., OZKAYA, B., CAKMAKCI, M., A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. En: *Process Biochemistry*. Vol.; 50 (2). 2015, p. 262-271.

¹³⁶ ESCUDIÉ. Op. cit.

¹³⁷ LANGER, S., SCHROPP, D., BENGLSDORF, F.R., OTHMAN, M., KAZDA, M. Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste. En: *Anaerobe*. Vol.; 29. 2014; p. 44-51.

¹³⁸ HEEG. Op. cit.

¹³⁹ WEI-JIA, G.; HENG, L.; WEN-ZHE, L.; ZHEN-ZHEN, W. Selection and evaluation of biofilm carrier in anaerobic digestion treatment of cattle manure. En: *Energy*. Vol., 36. 2011; p. 3572–3578.

¹⁴⁰ MOLOBELLA, I.P., LLUNGA. Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. En: *Annals of microbiology*. Vol.; 62 (2). 2012; p.461-467.

¹⁴¹ THURY, P., BARTHA, L., GULYÁS, L., PITÁS, V., FAZEKAS, B., KÁRPÁTI, A. Improvement of biofilm carriers for the treatment of automotive industry wastewater. En: *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*. Vol.; 40(1). 2012; p. 1–4.

¹⁴² HAN, W.; YUE,Q.; WU, S.; ZHAO,Y.; GAO, B.; LI,Q.; WANG,Y. Application and advantages of novel clay ceramic particles (CCPs) in an up-flow anaerobic bio-filter (UAF) for wastewater treatment. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 137. 2013; p. 171–178.

¹⁴³ JURECSKA, L.; BARKÁCS, K.; KISS, E.; GYULAI, G.; FELFÖLDI, T.; TÖRÖB.; KOVÁCS,R.; ZÁRAY, G. Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. En: *Microchemical Journal*. Vol.; 107. 2013; p. 108–114.

orgánica^{144 145}. La biopelícula inmovilizada sobre los soportes tiene la capacidad de recuperación de la actividad luego de una inhibición temporal^{146 147}

La colonización y posterior inmovilización microbiana sobre soportes macroporosos de elevada área superficial, evita el riesgo de desprendimiento de la biomasa, al mismo tiempo que aumenta la cantidad de biomasa que puede ser acumulada por volumen de reactor^{148 149 150 151}.

La espuma de poliuretano fue muy utilizado como soporte de inmovilización en la década de los ochenta^{152 153 154} y se ha retomado nuevamente en la actualidad^{155 156 157 158}. Otros materiales utilizados como soportes en investigaciones recientes

¹⁴⁴ UMAÑA, O., NIKOLAEVA, S., SANCHEZ, E., BORJA, R., RAPOSO, F. Treatment of screened dairy manure by upflow anaerobic fixed bed reactors packed with waste tyre rubber and a combination of waste tyre rubber and zeolite: effect of the hydraulic retention time. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 99. 2009; p. 7412–7417

¹⁴⁵ HABOUZIT, F.; GÉVAUDAN, G.; HAMELIN, J.; STEYER, J.P.; BERNET, N. Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011; p. 4054–4060.

¹⁴⁶ BARBOSA, A.K.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads. En: *Journal of Environmental Management*. Vol.; 76. 2005; p. 319–325.

¹⁴⁷ ZUO. Op. cit.

¹⁴⁸ CHAE, K.J., KIM, S.M., PARK, H.D., YIM, S.H., KIM, I.S. Development of pseudoamphoteric sponge media using polyalkylene oxide-modified ZAFIRI polydimethylsiloxane (PDMS) for rapid start-up of wastewater treatment plant. En: *Chemosphere*. Vol.; 71. 2008; p. 961–968.

¹⁴⁹ GARCIA, M.L.; LAPA, K.R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage. En: *Journal of Environmental Management*. Vol.; 88. 2008; p. 1471–1477.

¹⁵⁰ CHU, L.; WANG, J. Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio. En: *Chemosphere*. Vol.; 83. 2011; p. 63–68.

¹⁵¹ DONG. Op. cit.

¹⁵² FYNN, G.H., WITHMORE, T.N. Retention of methanogens in colonized reticulated polyurethane foam biomass support particle. En: *Biotechnology Letters*. Vol.; 6. 1984; p. 81–86.

¹⁵³ POELS, J., VANASSCHE, P., WERSTRAETE, W. High-rate anaerobic digestion of piggery manure with polyurethane sponges as support material. En: *Biotechnology Letters*. Vol.; 6. 1984; p. 747–752.

¹⁵⁴ BOSSIER, P., POELS, J., VANASSCHE, P., VERSTRAETE, W. Influence of the dimensional characteristics of polyurethane foam on high-rate anaerobic digestion of piggery manure. En: *Biotechnology Letters*. Vol.; 8. 198; p. 901–906.

¹⁵⁵ PINHO, S.C., FORESTI, E., ZAIAT, M. Degradation of partially soluble wastewater in an anaerobic sequencing batch biofilm reactor role of impeller type. En: *Environmental Engineering Science*. Vol.; 23. 2006; p. 803–813.

¹⁵⁶ FAZOLO, A., FORESTI, E., ZAIAT, M. Removal of nitrogen and organic matter in a radial flow anaerobic-anoxic immobilized biomass reactor used in the posttreatment of anaerobically treated effluent. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol.; 142. 2007; p. 44–51.

¹⁵⁷ CHU. Op. cit.

¹⁵⁸ LIM, J-W.; SENG, C-E.; LIM, P-E.; NG, S-L; SUJARI, A-N. Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011; p. 9876–9883.

incluyen; polietileno, polipropileno, zeolitas, acero inoxidable, fibras poliméricas, carbón activado, piedras porosas, y vidrio sinterizado ^{159 160 161 162 163}.

En la búsqueda de los soportes para los reactores de película adherida, además de sus características físicas se debe tener en cuenta la disponibilidad y el costo de los mismos. El uso de residuos agroindustriales como soportes es una alternativa que permite aprovechar estos residuos, que en algunos casos se dejan al medio ambiente para su descomposición causando la presencia de vectores contaminantes. Otros residuos provenientes de industrias como la de la construcción, pueden llegar a tener un buen desempeño en reactores de película adherida logrando una disminución en su disposición al medio ambiente y aprovechamiento de los mismos.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

En la selección del soporte a utilizar en el reactor de película adherida se realizaron dos etapas experimentales. En la etapa inicial se evaluaron cuatro soportes en reactores de 500 mL con sustrato modelo y en la segunda etapa se evaluó un reactor de 2000 mL con el soporte seleccionado utilizando carga real proveniente de un reactor hidrolítico/acidogénico con FO de RSU como sustrato.

2.3.1. Primera etapa experimental con sustrato modelo. En esta primera etapa se evaluaron cuatro soportes para la inmovilización de biomasa celular; tusa de

¹⁵⁹ MIJAYLOVA-NACHEVA, P., PENA-LOERA, B., CUEVAS-VELASCO, S. Anaerobic treatment of organic chemical wastewater using packed bed reactors. En: Water Science and Technology. Vol.; 54. 2006; p. 67-77.

¹⁶⁰ ZHANG, L.; YANG, J.; MA, Y.; LI, Z.; FUJII, T., ZHANG, W.; TAKASHI, N., Y FURUKAWA, K. Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol.; 110 (1). 2010; p. 72–78.

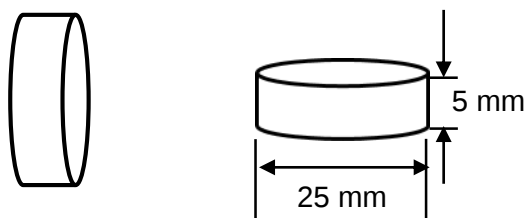
¹⁶¹ HABOUZIT. Op. cit.

¹⁶² WEIB, S., ZANKEL, A., LEBUHN, M., PETRAK, S., SOMITSCH, W., GUEBITZ, G.M. Investigation of microorganisms colonizing activated zeolites during anaerobic biogas production from grass silage. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 4353–4359.

¹⁶³ JURECSKA. Op. cit.

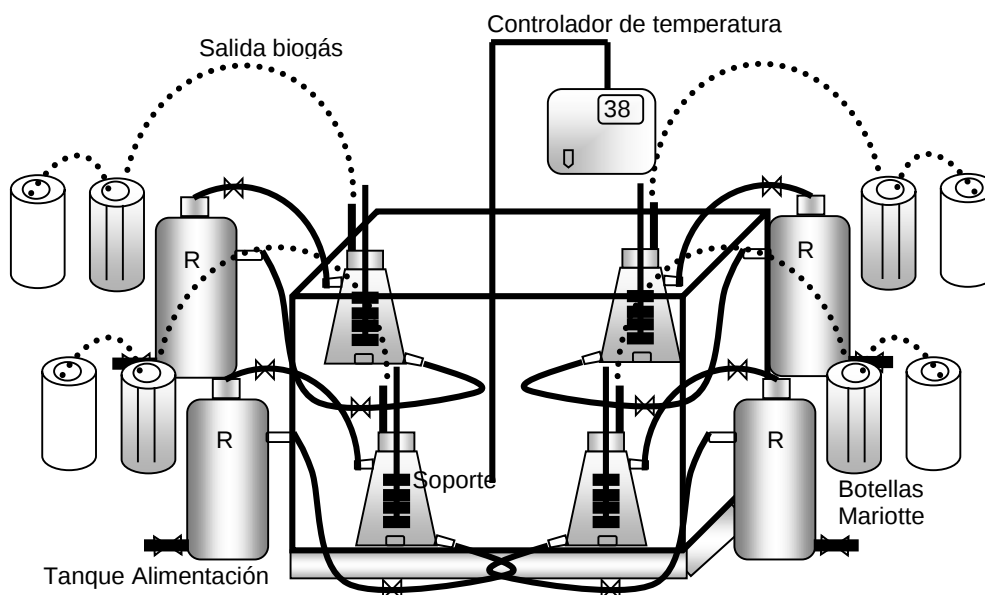
mazorca (R1), espuma de poliuretano (R2), *luffa cilíndrica* (estropajo) (R3) y ladrillo cerámico (R4). El montaje de los reactores fue por duplicado. La forma de los soportes fue cilíndrica con dimensiones aproximadas de 25 mm de diámetro y 5 mm de espesor (**Figura 18**). Para los experimentos de biodegradación, se realizó un montaje con reactores de 500 mL con un sistema de agitación y calentamiento a una temperatura de 38 ± 2 °C (**Figura 19**).

Figura 18. Forma de soporte utilizado en la batería de experimentación para la selección del soporte.



Los biorreactores con los diferentes soportes fueron inicialmente inoculados con la mezcla seleccionada en el primer capítulo, mezcla 1:1 de lodo PTAR y lodo porcícola. La inoculación se realizó agregando un volumen de 200 mL del inóculo a los reactores con los soportes, manteniendo una atmósfera anaerobia. El tiempo de inoculación fue de 30 días a una temperatura de $38 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Posteriormente, los reactores fueron alimentados lentamente con una solución al 1% (p/v) de glucosa como sustrato y mantenidos en recirculación durante la operación del sistema. Los diferentes biorreactores fueron alimentados con una carga orgánica de 10 (kg DQO/m³·d) con un tiempo de retención hidráulico de 10 días.

Figura 19. Montaje de la batería de experimentación para la evaluación de los cuatros soportes para inmovilización de células durante el proceso de biodegradación en reactores anaerobios de película adherida.



Durante el proceso de biodegradación se realizó seguimiento diario del pH, los AGV's, la alcalinidad, la DQO, la producción de biogás, los sólidos suspendidos volátiles (SSV). La DQO fue evaluada de acuerdo con el Standard Methods (5220 C) ¹⁶⁴. La medición de pH fue llevada a cabo por potenciometría utilizando un electrodo de pH (Hanna Instruments HI 8314). El flujo de biogás producido fue cuantificado utilizando el método desplazamiento en botella de Mariotte ¹⁶⁵, el metano producido en el proceso fue lavado burbujeando la mezcla de gases a través de una solución 2 M de hidróxido de sodio, el volumen de líquido desplazado es equivalente al volumen de metano producido. Los AGV's y la alcalinidad se midieron de acuerdo con el procedimiento de titulación descrito por Arenas ¹⁶⁶.

¹⁶⁴ APHA, AWWA y WEF. Op. cit.

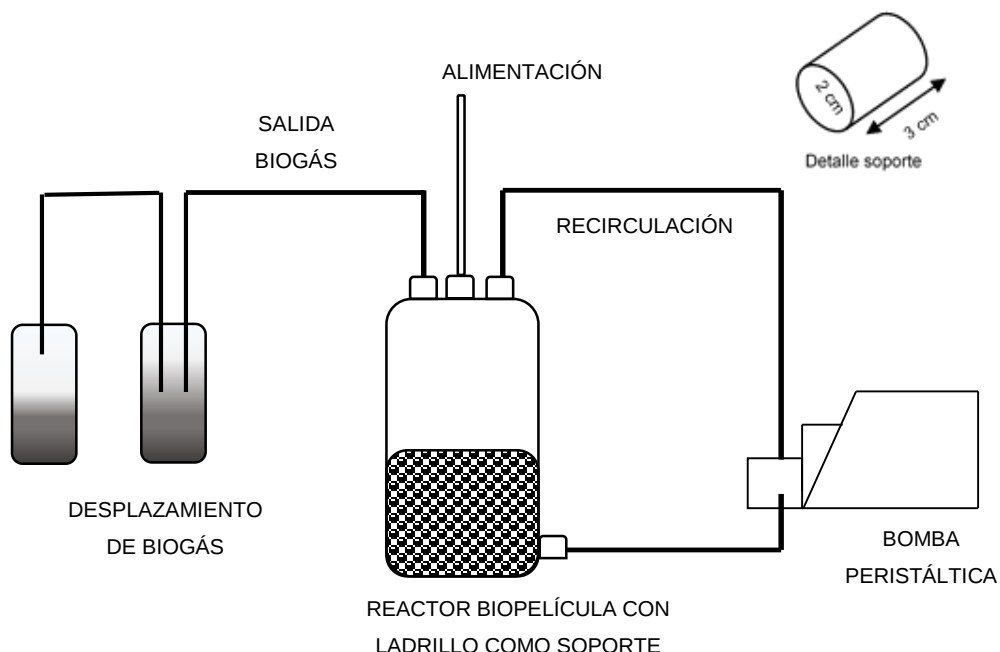
¹⁶⁵ BARBANTI, L., DI GIROLAMO, G., GRIGATTI, M., BERTIN, L., CIAVATTA, C. Anaerobic digestion of annual and multi-annual biomass crops. En: Industrial Crops and Products. Vol.; 56. 2014; p. 137–144

¹⁶⁶ ARENAS, L., ESCALANTE, H., COMBARIZA, M. Estudio comparativo de la etapa metanogénica de la digestión anaerobia para el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos municipales de frutas y verduras. En: Revista ION. Vol.; 25(1).2012; p.89-96.

2.3.2. Segunda etapa experimental con sustrato real. En esta segunda etapa experimental (**Figura 20**) y de acuerdo con los resultados de la primera etapa, se evaluó el ladrillo cerámico (LAD). Aunque en la primera etapa experimental, los dos mejores soportes fueron ladrillo cerámico y tusa de mazorca, no se evaluó este segundo soporte debido a la descomposición mostrada al final de su evaluación inicial.

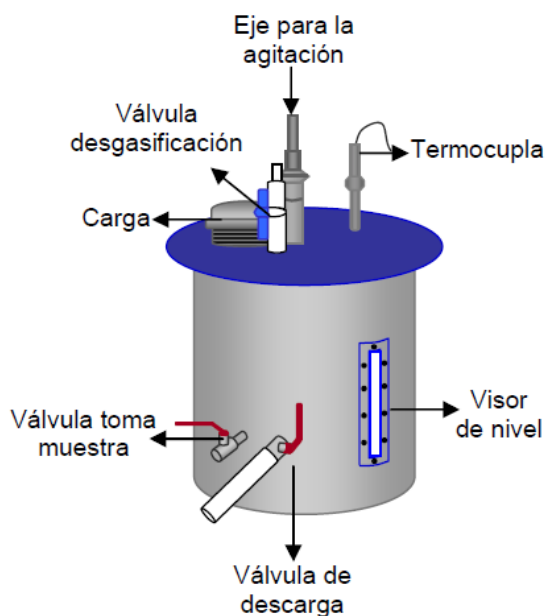
Inicialmente al reactor con ladrillo cerámico como soporte se agregaron 500 mL del inóculo seleccionado y se mantuvo durante 30 días a 25 ± 2 °C de temperatura bajo condiciones anaerobias. Posteriormente, se inició la alimentación del reactor. El alimento para el reactor de película adherida estuvo constituido por el efluente de un reactor hidrolítico/acidogénico cuyo sustrato era la FO de los RSU. Este efluente fue sometido inicialmente a una filtración antes de ingresar al reactor de película adherida, cuya temperatura fue mantenida a de 25 ± 2 °C. El reactor de película adherida operó a un TRH de 15 días que corresponde al mismo valor del reactor Hidrolítico/acidogénico fuente del sustrato alimento y velocidad de carga orgánica de 4 (kg DQO/m³ · d). A este reactor se le realizó el mismo seguimiento del montaje de la primera etapa en los parámetros de pH, AGVs, ST, SSV, DQO, cantidad y calidad de biogás. La calidad del biogás fue medido diariamente con el analizador Bacharach GA-94 compuesto con una celda electroquímica y otra infrarroja. El soporte utilizado en este reactor presentó forma cilíndrica con dimensiones de 2 cm de diámetro por 3 cm de longitud.

Figura 20. Montaje de reactor de dos litros para la evaluación del soporte seleccionado para la inmovilización de células durante el proceso de biodegradación en reactor anaerobio de película adherida.



El reactor hidrolítico/acidogénico del cual se tomó el efluente como alimento para el reactor metanogénico de película adherida fue un reactor CSTR de lecho suspendido en acero inoxidable de 30 centímetros de diámetro interno y 38.5 centímetros de altura (**Figura 21**). El reactor contaba con sistema de agitación helicoidal de tornillo sinfín, resistencia eléctrica para el calentamiento, control y registro de temperatura y válvulas para la alimentación, toma de muestras y salida de gases. El reactor fue alimentado con FO de RSU compuesta principalmente por residuos de plaza de mercado, de estos residuos de plaza se seleccionaron residuos de papa, yuca, plátano y hortalizas como alimentos representativos de la alimentación colombiana, con porcentajes máxicos en el alimento del reactor para cada uno de los residuos de 24.1 % p/p la papa, 16.36 % p/p para la yuca, 29.51 % p/p para el plátano y 30.01 % p/p para las hortalizas. Este reactor operaba con un TRH de 15 días a 35 °C.

Figura 21. Reactor CSTR Hidrolítico/Acidogénico con FO de RSU como sustrato. Fuente: CEIAM.



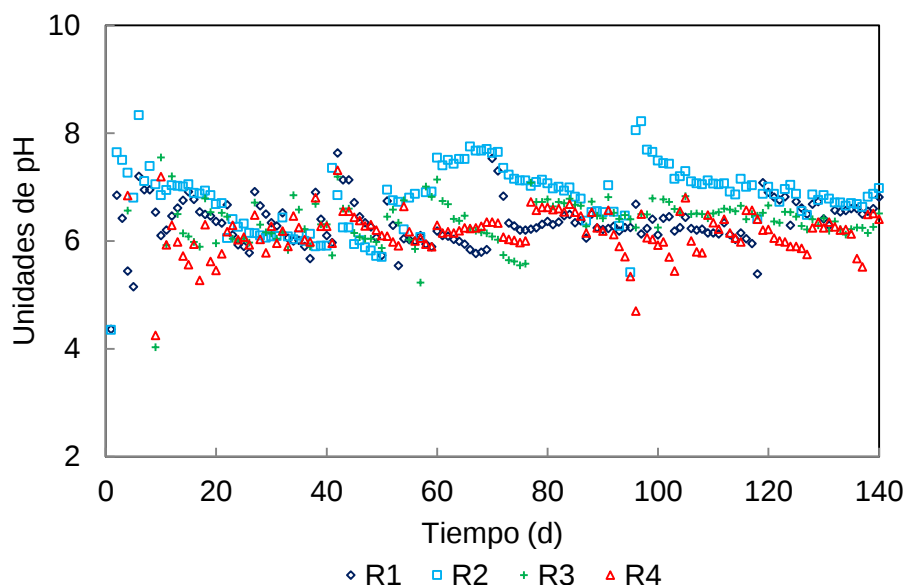
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Primera etapa experimental con sustrato modelo. En la **Figura 22**, la variación del pH durante el proceso de biodegradación en esta etapa de selección del soporte se observa que los valores oscilaron en un intervalo de 5.5 a 7.5. El biorreactor con espuma de poliuretano como soporte de inmovilización alcanzó los mayores valores de pH durante el proceso de biodegradación, siendo el reactor con pH entre 6.5 a 7.8 favoreciendo el medio para la presencia de microorganismos metanogénicos ¹⁶⁷ ¹⁶⁸. La diversidad microbiana de la biopelícula se afecta con la variación en el pH, resultando en un aumento de población acidogénica al disminuir el pH con la consecuencia de la reducción de la población metanogénica, sensible a los cambios de pH.

¹⁶⁷ DONG. Op. cit.

¹⁶⁸ GARCÍA-PEÑA. Op. cit.

Figura 22. Variación del pH durante el proceso de biodegradación en reactores anaerobios de película adherida usando diferentes tipos de soporte para inmovilización de células. Tipo de soporte: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4-Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2$ °C, carga orgánica =10 kg DQO/m³·d, TRH = 10 días.

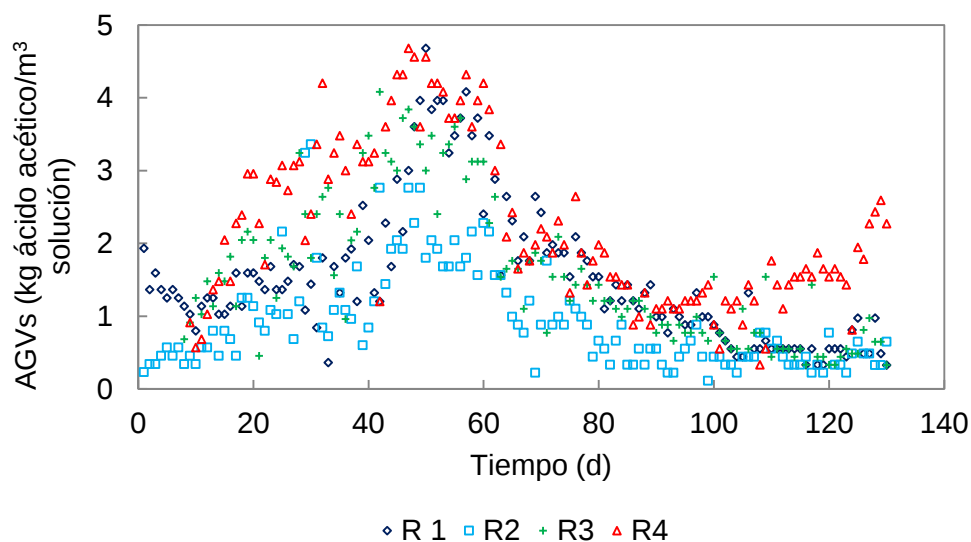


Los valores de AGV's (**Figura 23**) aumentaron hasta alcanzar valores de 5 (kg ácido acético/m³) en los dos primeros meses de operación que refleja una mayor velocidad de producción que de consumo de AGVs ¹⁶⁹. Este comportamiento estaría indicando la presencia de una gran población de microorganismos fermentadores en las primeras semanas de biodegradación. Este aumento en la producción de AGVs no se vio reflejado drásticamente en los valores de pH que se mantuvieron por encima de 5.5. A partir del día 4, los AGV's empezaron a ser consumidos hasta llegar a valores de 0.5 kg ácido acético/m³ solución. Esta disminución pudo ser el resultado del consumo de los AGV's por los microorganismos metanogénicos observados en los conteos microbiológicos. El reactor con tusa de mazorca presentó las menores concentraciones de AGVs que

¹⁶⁹ ASLANZADEH, S., RAJENDRAN, K., TAHERZADEH, M.J. A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.; 95.2014; p. 181-188.

permitieron el desempeño de microorganismos metanogénicos y evitaron su inhibición por exceso de éstos. En el transcurso de la operación de los reactores se observaron valores de AGVs por fuera del intervalo de 0.5 mg/L – 1800 mg/L tomado como adecuado por algunos autores para la obtención de una DA balanceada ^{170 171}. El reactor con espuma de poliuretano como soporte mantuvo los menores valores de AGVs. En el intervalo del día 25 hacia el 70, los reactores presentaron acidificación con valores elevados de alrededor de 5000 mg/L, y posteriormente se estabilizaron con valores de AGVs en valores que permitieron desarrollar un mejor proceso de digestión. En este sentido, Siegert y Banks ¹⁷², reportaron inhibición en la fermentación de glucosa en reactores con una concentración de AGVs por encima de valores de 4000 mg/L.

Figura 23. Producción de AGV's durante el proceso de biodegradación de glucosa en cuatro (4) reactores anaerobios de película utilizando diferentes tipos soportes para la formación de película adherida e inmovilización celular. Tipo de soporte: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2$ °C, carga orgánica = 10 kg DQO/m³-d, TRH = 10 días.



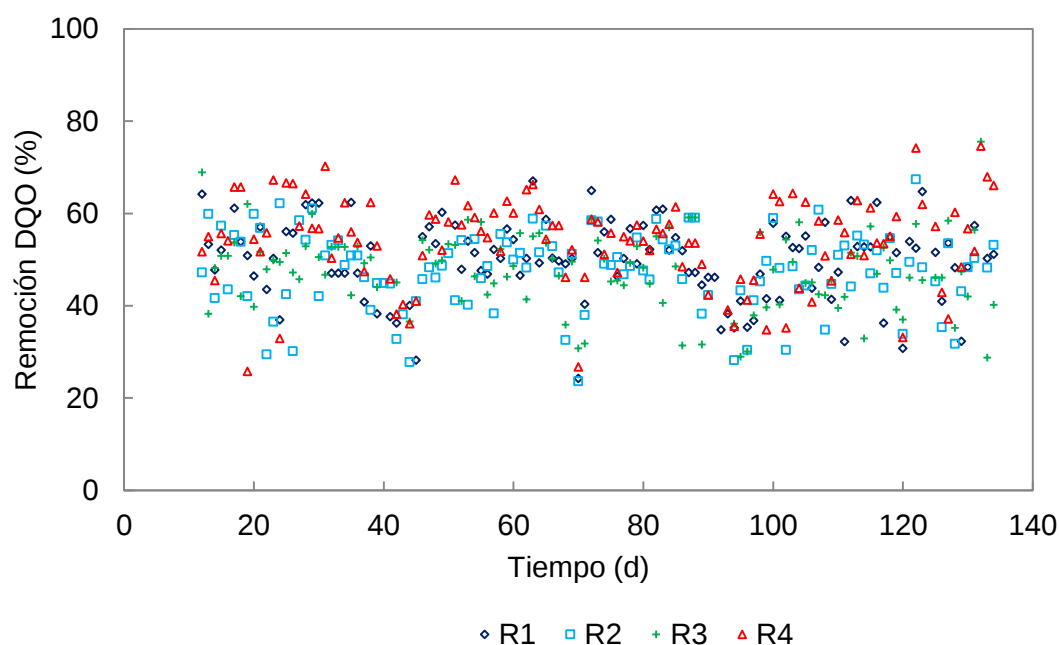
¹⁷⁰ BOUALLAGUI. Op. cit.

¹⁷¹ GARCÍA-PENÁ. Op. cit.

¹⁷² SIEGERT, I y BANKS, CH. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. En: Process Biochemistry. Vol.; 40(11). 2005; p. 3412-3418.

En la **Figura 24** se muestra la eficiencia de remoción de DQO de los biorreactores anaerobios de biopelícula y el efecto de los soportes de inmovilización sobre la biodegradación. En ella se observa una remoción variable de la carga orgánica en los biorreactores. No obstante, se presentaron períodos de estabilidad del sistema de biodegradación con duraciones 20 días aproximadamente (días 15-35, 45-65 y 70-90). La eficiencia en la remoción de DQO puede llegar a ser un indicativo del desempeño de la biopelícula formada sobre los diferentes soportes.

Figura 24. Efecto del tipo de soporte de inmovilización celular sobre el proceso de remoción de carga orgánica (DQO) en los cuatro reactores anaerobios de biopelícula. Tipo de soporte: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2$ °C, carga orgánica = 10 kg DQO/m³·d, TRH = 10 días.



Los porcentajes globales de remoción de DQO fueron de $54 \pm 6\%$ para el ladrillo cerámico, $50 \pm 5\%$ para la espuma de poliuretano y $48\% \pm 5$ para los reactores con tusa de mazorca y *luffa cilíndrica*. Estos porcentajes de remoción no presentan una diferencia significativa. La eficiencia de remoción de $50 \pm 5\%$ en el reactor con

espuma de poliuretano como soporte con una carga de 10 (kg glucosa/m³/d) fue menor comparada con un estudio realizado por Ribeiro ¹⁷³ en el cual se utilizó extracto de carne, almidón, lípidos y 0.5 kg de (glucosa /m³/d) como sustrato en un reactor de lecho fijo y usando espuma de poliuretano como soporte, logrando remoción del 80 % de DQO. De igual forma, Ribeiro observó que la naturaleza de la fuente de carbono influyó en la dinámica de adhesión sobre el soporte de espuma de poliuretano. Asimismo, observaron la influencia de la fuente de carbono en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), especialmente en la etapa inicial de colonización, la excesiva formación de SPE produjo remanentes en el interior del soporte y en los intersticios del lecho causando problemas operacionales en la hidrodinámica del sistema. En general, los porcentajes de remoción obtenidos por los cuatro soportes fueron inferiores a los reportados por Silva ¹⁷⁴ utilizando espuma de poliuretano y carbón vegetal como soporte, obtuvieron remociones del 86 y 90 % con un sustrato de agua residual sintética con alto contenido de sulfato. Bertin ¹⁷⁵ alcanzaron remociones del 86 % en reactores con cerámica y carbón activado como soportes para la DA de agua residual del procesamiento de aceitunas.

En la **Figura 25**, la mayor producción de biogás fue presentada por el reactor en el que se utilizó ladrillo cerámico como soporte con 0.232 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}), seguido por la tusa de mazorca con 0.211 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}) y la espuma de poliuretano 0.154 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}), por último la *luffa cilíndrica* con 0.111 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}). Estos valores son menores comparados con el valor teórico de 0.35 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}) teórico en el que se asume que toda la DQO se transforma en metano ¹⁷⁶. A pesar de la acidificación presentada por los reactores

¹⁷³ RIBEIRO, R., VARESCHE, M.D.A, FORESTI, F., ZAIAT, M. Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices. En: Journal of Environmental Management. Vol.; 74. 2005; p. 187-198.

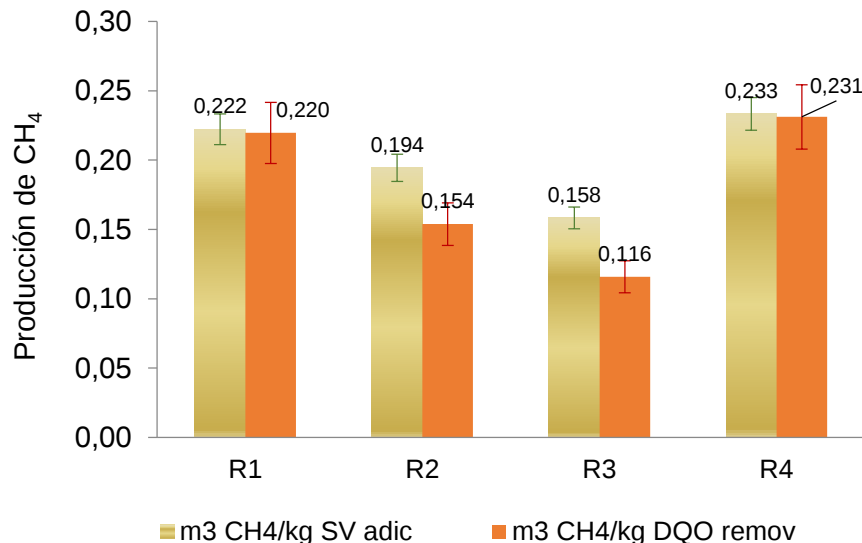
¹⁷⁴ SILVA, A.J, HIRASAWA, J.S, VARESCHE, M.B., FORESTI, E., ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. En: Anaerobe. Vol.; 12. 2006; p. 93–98.

¹⁷⁵ BERTIN. Op. cit.

¹⁷⁶ HEIDRICH, E.S., CURTIS, T.P., DOLFING, J. Determination of the internal chemical energy of wastewater. En: Environmental Science Technology. Vol.; 45 (2). 2011; p. 827–832.

con los soporte de ladrillo y tusa de mazorca, estos mostraron una mayor producción de metano comparada con la espuma de poliuretano que mantuvo valores de AGVs adecuados para la DA. Estos resultados pueden estar relacionados con las características de la biopelícula formada sobre cada soporte que permitieron un buen desempeño de los microorganismos metanogénicos presentes en cada una de ellas. Algunos valores experimentales de producción de metano obtenidos en el tratamiento de aguas residuales de destilerías han oscilado entre 0.225 – 0.335 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$) para reactores con soportes de PVC, polipropileno y polietileno bajo diferentes condiciones operacionales; 0.285 y 0.36 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$)^{177 178}.

Figura 25. Producción de metano de cada uno de los biorreactores anaerobios de biopelícula utilizando diferentes tipos de soportes: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2$ °C, carga orgánica = $10 \text{ kg DQO}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, TRH = 10 días.



¹⁷⁷ BALAGUER, M. D., VICENT, M. T., PARIS, J. M. A. Comparison of different support materials in anaerobic fluidized bed reactors for the treatment of vinasses. En: Environmental Technology. Vol.; 18. 1997; p. 539–544.

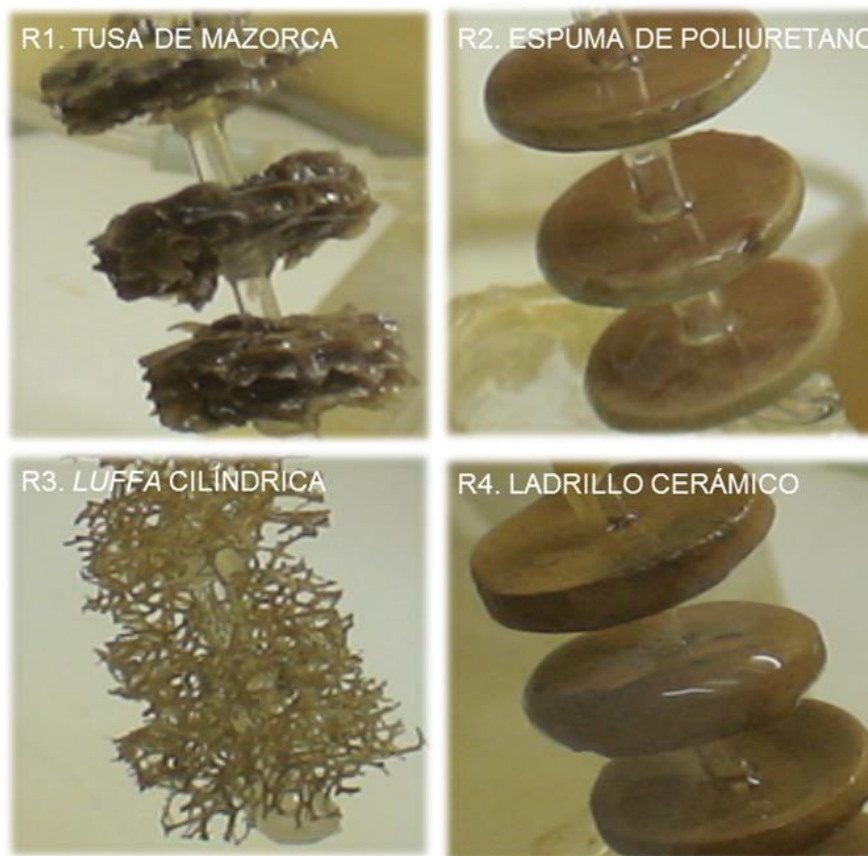
¹⁷⁸ HABOUZIT, F.; HAMELIN, J., CATALINA, G.S, STEYER, J.P.; BERNET, N. Biofilm development during the start-up period of anaerobic biofilm reactors: the biofilm *Archaea* community is highly dependent on the support material. En: Microbial Biotechnology. Vol.; 7 (3). 2014; p. 257–264.

Estudios realizados por Yang ¹⁷⁹ alcanzaron valores globales de remoción del 98% de DQO luego de 15 días de operación, con ácido acético como sustrato con carbón, fibra de lana, esponja vegetal y espuma de poliuretano, como soportes. El orden en la producción de metano fue de espuma vegetal > espuma de poliuretano > Carbón > fibra de lana. Los reactores con esponja vegetal y espuma de poliuretano mostraron una producción de 0.62 (m³ CH₄/ kg DQO_{adicionado}) y 0.31 (m³ CH₄/ kg DQO_{adicionado}), respectivamente. Esta producción es mayor comparada con los valores de 0.077 (m³ CH₄/ kg DQO_{adicionado}) y 0.056 (m³ CH₄/ kg DQO_{adicionado}) en los reactores de espuma de poliuretano y *luffa cilíndrica* de esta investigación. Con relación al reactor con espuma vegetal como soporte, ésta podría ser utilizada como sustrato y de allí su producción de metano. Este comportamiento es similar al presentado en el caso de tusa de mazorca, que de igual forma presenta buena producción de metano. En ambos casos, estos soportes presentaron la desventaja de no ser resistentes y ser degradados como sustrato.

En el registro fotográfico de la formación de la biopelícula sobre los cuatro soportes evaluados (**Figura 26**) se observa en la tusa de mazorca y el ladrillo cerámico una mayor adhesión comparados con los otros soportes. La espuma de poliuretano mostró buena adhesión de biopelícula, pero solo en la parte superior del soporte. La *luffa cilíndrica* mostró muy poca adhesión debido principalmente a su configuración cavernosa que no permite la adhesión de los microorganismos.

¹⁷⁹ YANG, Y., TADA, CH., SHOHIDULLAH, M., TSUKAHARA, K., YAGISHITA, T., SAWAYANA, Sh. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. En: Materials Science and Engineering, Vol.; C24. 2004; p. 423-419.

Figura 26. Registro fotográfico de la biopelícula formada sobre cada uno de los soportes utilizados al finalizar la etapa de experimentación. Tipos de soportes: R1-Tusa de mazorca, R2-Espuma de poliuretano, R3-Luffa cilíndrica, R4- Ladrillo cerámico. Condiciones de operación: $T = 38 \pm 2$ °C, carga orgánica = 10 kg DQO/m³·d, TRH = 10 días.

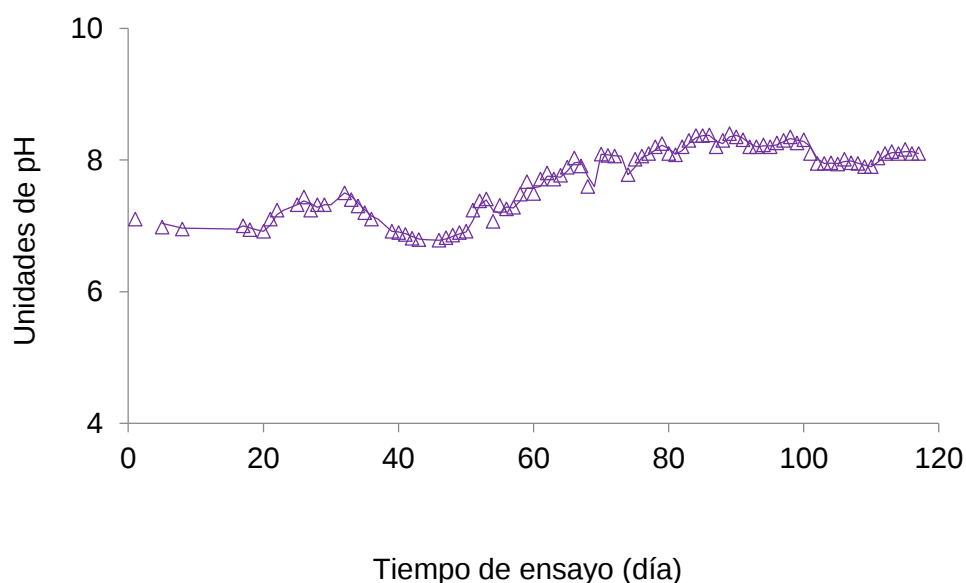


2.4.2. Segunda etapa experimental con sustrato real. En la segunda fase de esta etapa experimental se realizó el seguimiento a los parámetros de pH, AGVs, DQO, ST, SSV y producción de biogás en el reactor de película adherida de 2 litros de volumen. De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera etapa, el ladrillo cerámico y la tusa de mazorca presentaron la mayor producción de metano. La tusa de mazorca presentó degradación por lo que no se seleccionó para esta segunda etapa. Finalmente, el soporte seleccionado fue el de ladrillo cerámico.

Los resultados para el pH estuvieron dentro de un intervalo de 6.8 a 8.5. El reactor mantuvo valores en el intervalo 6.8 a 7.8 los primeros 65 días de operación que

permitió el desarrollo de microorganismos metanogénicos (**Figura 27**). Posterior a los 65 días hasta el final de operación, los valores de pH estuvieron ligeramente por encima de 8. Estos últimos valores indican posible acumulación de amoníaco en los sistemas ¹⁸⁰.

Figura 27. Variación del pH durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en reactor anaerobio de película adherida usando ladrillo cerámico como soporte para la inmovilización de células. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $TRH = 15 \text{ días}$, Velocidad de carga orgánica = $4 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$.



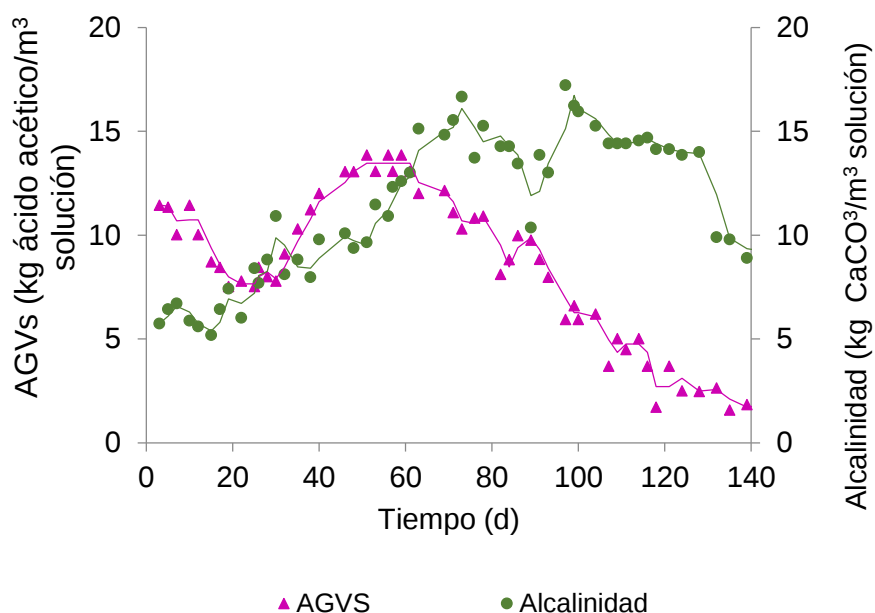
La producción de AGVs para el reactor de biopelícula adherida (**Figura 28**) alcanzó valores entre 7 y 14 (kg ácido acético/m³) los primeros 60 días de operación, indicando inestabilidad en el sistema por la elevada concentración de éstos. Posteriormente, la concentración de los AGVs disminuyó hasta alcanzar valores cercanos a los 0.5 (kg ácido acético/m³). La producción de AGVs en los primeros 60 días es un indicativo de la presencia de microorganismos fermentadores en esta etapa de biodegradación. A su vez, la disminución de los AGVs se debe al consumo

¹⁸⁰ VENTURA. Op. cit.

de los mismos por parte de los microorganismos metanogénicos presentes en el sistema.

La alcalinidad (Ver **Figura 28**) para el reactor mostró valores entre 6 y 13 ($\text{kg CaCO}_3/\text{m}^3$). Al inicio de la experimentación, se presentaron los valores más bajos de alcalinidad como consecuencia de la elevada producción de AGVs.

Figura 28. Producción de AGV's y evolución de alcalinidad durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en el reactor con ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = $4 \text{ kg DQO}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$.

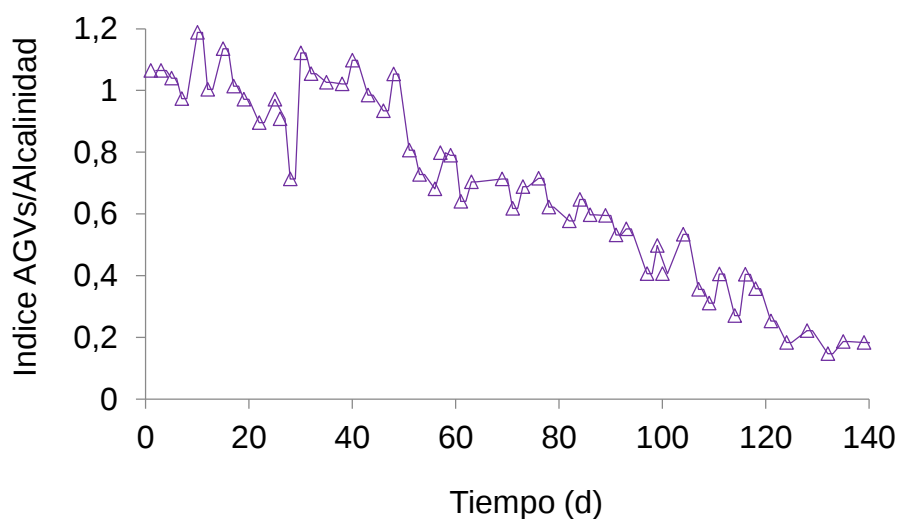


Las concentraciones de AGVs en el reactor son elevadas para un proceso de digestión anaerobia eficiente. La acumulación de AGVs es debido a la baja actividad de los microorganismos metanogénicos presentes en el reactor que están formando la biopelícula sobre el soporte. En el caso de reactores en suspensión, se ha

encontrado que concentraciones de AGVs superiores a 2 kg/L causan inhibición en la población metanogénica y disminuyen la capacidad tampón del sistema ^{181 182}.

La relación de AGV/Alcalinidad (**Figura 29**) en el proceso de biodegradación en el reactor presentó valores mayores a 1, mostrando gran inestabilidad debido a la elevada concentración de AGVs los primeros sesenta días de experimentación. A partir del día 60 de experimentación, la relación empezó a presentar valores entre 0.8 y 0.4 que mostraron menos inestabilidad, hasta alcanzar valores inferiores a 0.4 en el que se considera un proceso totalmente estable ^{183 184}.

Figura 29. Relación AGV/Alcalinidad durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en reactor de película adherida. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2$ °C, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m³·d.



¹⁸¹ DONG. Op. cit.

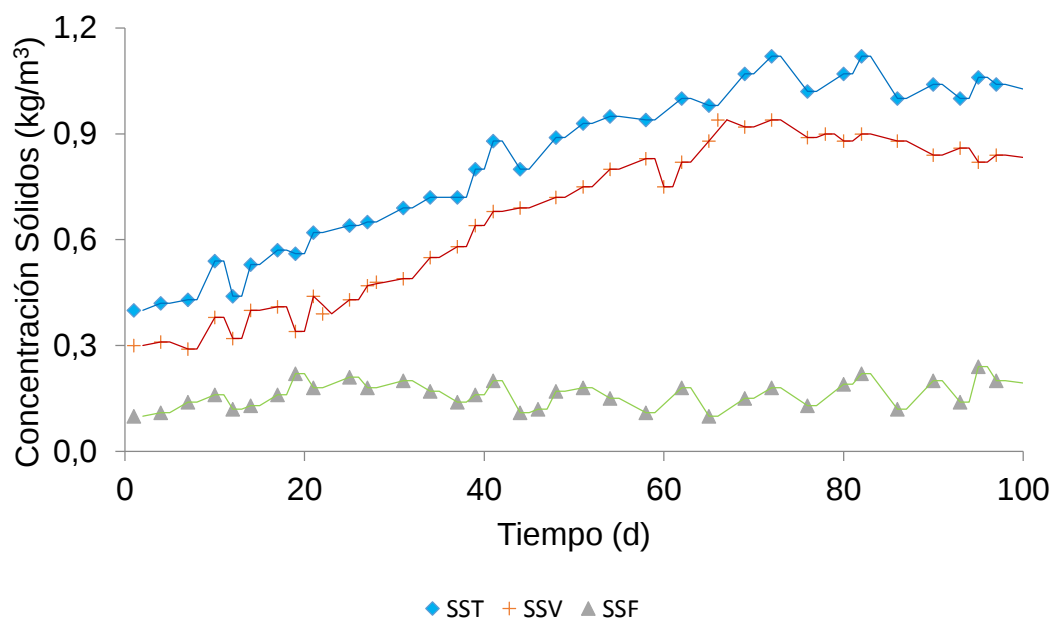
¹⁸² ABU-DAHRIEH, J., OROZCO, A.; GROOM, E., ROONEY, D. Batch and continuous biogas production from grass silage liquor. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 10922–10928.

¹⁸³ AYMERICH, E., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M., SANCHO, L. Analysis of the stability of high-solids anaerobic digestion of agro-industrial waste and sewage sludge. En: Bioresource Technology. Vol.; 144. 2013; p. 107–114

¹⁸⁴ MARTÍN-GONZÁLEZ, L., FONT, X., VICENT, T. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. En: Biochemical Engineering Journal. Vol.; 76. 2013; p. 1–5.

En la variación de la concentración de sólidos (ver **Figura 30**) se observa que el valor máximo para los SST fue de 1.12 (kg/m³) alcanzando valores estables de 1.04 (kg/m³). Para los SSV el valor máximo fue de 0.92 (kg/m³) y valores en equilibrio de 0.86 (kg/m³). Los SSF alcanzaron valores alrededor de 0.18 (kg/m³). Los valores de biomasa suspendida representada por los SSV son mayores comparados con los mostrados por Lin and Hsien para la degradación de aguas residuales con fenol ¹⁸⁵. El aumento en la concentración de SSV es el resultado de la utilización del sustrato para el crecimiento de la biomasa suspendida que alcanzó posteriormente su estabilización ¹⁸⁶.

Figura 30. Variación de los sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos fijos (SSF) del reactor con ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2$ °C, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m³ · d.

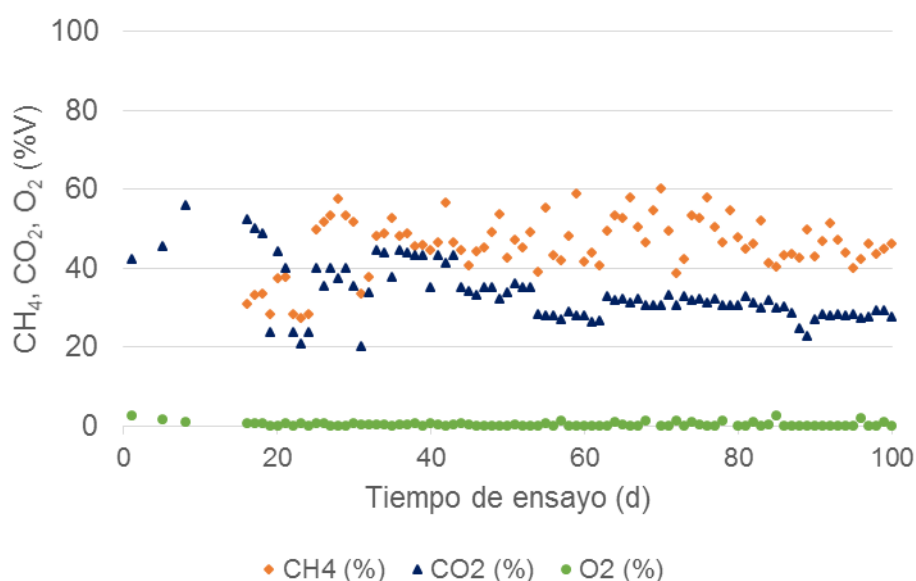


¹⁸⁵ LIN, Y-H and HSIEN, T-Y. Kinetics of Biodegradation of phenolic wastewater in a biofilm reactor. En: Water science and technology. Vol.; 59 (9). 2009, p. 1703-1711.

¹⁸⁶ HSIEN, T-Z., LIN, Y-H. Biodegradation of phenolic wastewater in a fixed biofilm reactor. En: Biochemical Engineering Journal. Vol.; 27. 2005; p. 95-103.

El porcentaje de metano (**Figura 31**) estuvo entre el 40 al 60 %V, valores que concuerdan con datos reportados ¹⁸⁷ ¹⁸⁸. Al inicio de la experimentación se obtuvieron pocas lecturas, las cuales contenían principalmente CO₂, ya que los microorganismos no producían aun metano.

Figura 31. Concentración de biogás del reactor con ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2$ °C, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = 4 kg DQO/m³·d.



El seguimiento de la producción de metano puede relacionarse con la formación de biopelícula sobre el soporte ¹⁸⁹. El proceso de colonización del soporte ocurre en tres etapas consecutivas: una fase inicial de fijación celular, una segunda fase de producción de la biopelícula (acumulación bacteriana con producción de

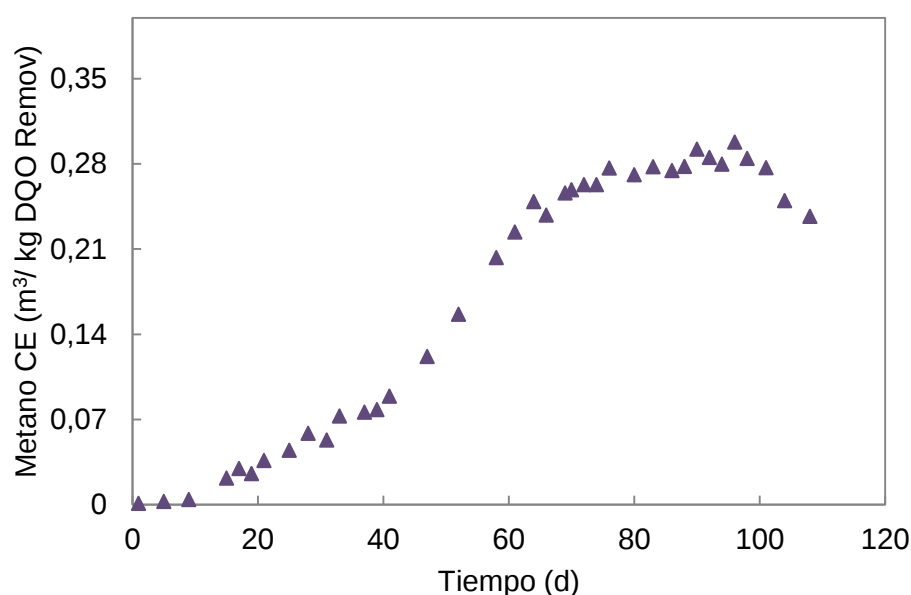
¹⁸⁷ ZAKARYA, I.A.; ABUSTAN, I.; ISMAIL, N.; YUSOFF, M.S. Production of methane gas from organic fraction municipal solid waste (OFMSW) via anaerobic process: application methodology for the Malaysian condition. En: International Journal Environment and Waste Management. Vol.; 12 (2). 2013; p. 121-129.

¹⁸⁸ KADER, F., BAKY, A.H., KHAN, M.N., CHOWDHURY, H.A. Production of Biogas by Anaerobic Digestion of Food Waste and Process Simulation. En: American Journal of Mechanical Engineering. Vol.; 3 (3). 2015; p. 79-83.

¹⁸⁹ MICHAUD, S., BERNET, N., BUFFIÈRE, P., y DELGENÈS, J.-P. Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. En: Process Biochemical. Vol.; 40. 2005; p. 2751–2755.

biopolímeros) y una tercera fase de establecimiento de la biopelícula (fase en estado estacionario). Con base en estas etapas, la **Figura 32** muestra el establecimiento de la biopelícula en el soporte de acuerdo con la producción de metano.

Figura 32. Producción de metano durante el proceso de biodegradación del efluente proveniente de la etapa hidrolítica/acidogénica del tratamiento de la FO de RSU en reactor de ladrillo cerámico como soporte para la formación de película adherida e inmovilización celular. Condiciones de operación: $T = 25 \pm 2$ °C, TRH = 15 días, Velocidad de carga orgánica = $4 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$.



El reactor mostró una etapa inicial de fijación hasta el día 40 de operación aproximadamente, durante este periodo la producción de metano fue baja y el sistema mostró concentraciones de AGVs elevadas. Se produjo en este caso una cantidad de metano entre $0,019 - 0,08 \text{ (m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d)}$. La segunda fase se encuentra entre los días 40 al 65 de operación, con valores de producción de metano entre $0,08 - 0,25 \text{ (m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d)}$. Estos resultados se deben a que en los reactores con soportes de biopelícula adherida, la diferencia en los primeros días de operación entre la velocidad de remoción de la materia orgánica y la producción de biogás proviene de la producción polimérica celular utilizada en el

anclaje de la biomasa al soporte ¹⁹⁰. De igual forma, la formación de la biopelícula requiere de un consumo elevado de materia orgánica para la síntesis (o anabolismo), lo cual disminuye la cantidad de sustrato convertido a metano ¹⁹¹. La tercera fase a partir del día 50 hasta el día 100 se generó una producción promedio de metano de 0.27 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}/d). Posterior al período de arranque y bajo condiciones estacionarias, aun cuando ocurra la producción de exopolímeros que permiten compensar la pérdida de biopelícula, como resultado del desprendimiento de la misma, el carbono es convertido a biogás y la producción de metano se acerca al valor teórico de 0.35 (m³ CH₄/kg DQO_{removido}/d) ^{192 193}.

Zuo ¹⁹⁴ obtuvo mayor producción de metano comparada con el reactor de ladrillo cerámico como soporte en este trabajo de investigación. Los autores evaluaron el funcionamiento de un sistema de dos etapas para el tratamiento anaerobio de residuos vegetales. La etapa acidogénica fue realizada en un reactor completamente agitado y la etapa metanogénica en un reactor de lecho fijo con fibras de carbón activado como soporte, la temperatura de operación fue de 37 ± 2 °C, TRH de 14 días y volumen efectivo del reactor de 4 L. Cuando la velocidad de carga orgánica en el reactor acidogénico fue incrementada de 1.3 (g SV/L/d) a 1.7 (g SV/L/d), la producción en el reactor metanogénico aumentó de 0.3 (m³/m³_{reactor}·d) a 1.1 (m³/m³_{reactor}·d) acompañada de un incremento en el contenido de metano de 27.4 ± 2.4% a 60.5 ± 2.6%. La producción de biogás fue menor con la velocidad de carga orgánica más baja, este resultado se atribuye al descenso en la velocidad de crecimiento de la población metanogénica debido a la baja concentración del sustrato que ingresaba al reactor. En el reactor con ladrillo cerámico como soporte, la velocidad de carga utilizada pudo causar una tasa baja de desarrollo de los microorganismos metanogénicos debido a la falta de concentración de sustrato en los sistemas y por tanto una baja producción de metano.

¹⁹⁰ MICHAUD, S., BERNET, N., BUFFIÈRE, P., ROUSTAN, M. MOLETTA, R. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. En: Water Research. Vol.; 36. 2002; p. 1385–1391.

¹⁹¹ CRESSON, R., DABERT, P., BERNET, N. Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. En: Journal of Applied Microbiology, Wiley. Vol.; 106 (3). 2009; p. 863 - 876.

¹⁹² ESCUDIÉ. Op. cit.

¹⁹³ MICHAUD. Op. cit.

¹⁹⁴ ZUO. Op.cit.

La producción diaria de metano para el reactor con Ladrillo ($0.17 \pm 0.11 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ día}^{-1}$), fue inferior al valor de $0.58 \pm 0.05 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1}$ obtenido por Arenas ¹⁹⁵ en un reactor metanogénico de película adherida con ladrillo como soporte operado a 27 °C en un sistema de dos etapas y TRH de 7 d.

¹⁹⁵ ARENAS. Op. cit.

3. BIOQUIMICA DE DIGESTIÓN ANAEROBIA EN REACTOR DE PELÍCULA ADHERIDA

3.1 MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA (DA)

El proceso de DA es realizado por cuatro grupos principales de microorganismos; bacterias hidrolíticas, bacterias fermentativas, bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas ¹⁹⁶ ¹⁹⁷. Estos microorganismos tienen diferentes requerimientos fisiológicos, de nutrientes, cinéticas de crecimiento y niveles de sensibilidad al medio ambiente. En la **Figura 33** se presenta un esquema general de las enzimas y bacterias involucradas en la DA.

Las bacterias hidrolíticas transforman los compuestos complejos en sustratos solubles. En general, la mayor parte de la materia orgánica soluble se convierte en ácidos grasos volátiles a través de la fermentación y luego se transforma en biogás a través de la metanogénesis. La reacción de hidrólisis juega un papel crucial en el control de la velocidad de reacción que puede llegar a determinar la potencialidad de conversión del sustrato ¹⁹⁸.

Las bacterias fermentativas son las responsables del consumo de los compuestos solubles formados en la hidrólisis y originar productos intermedios como AGVs, dióxido de carbono, hidrógeno y alcoholes. Entre los productos de fermentación, el ácido acético y el dióxido de carbono son los principales contribuyentes a la producción de metano ¹⁹⁹.

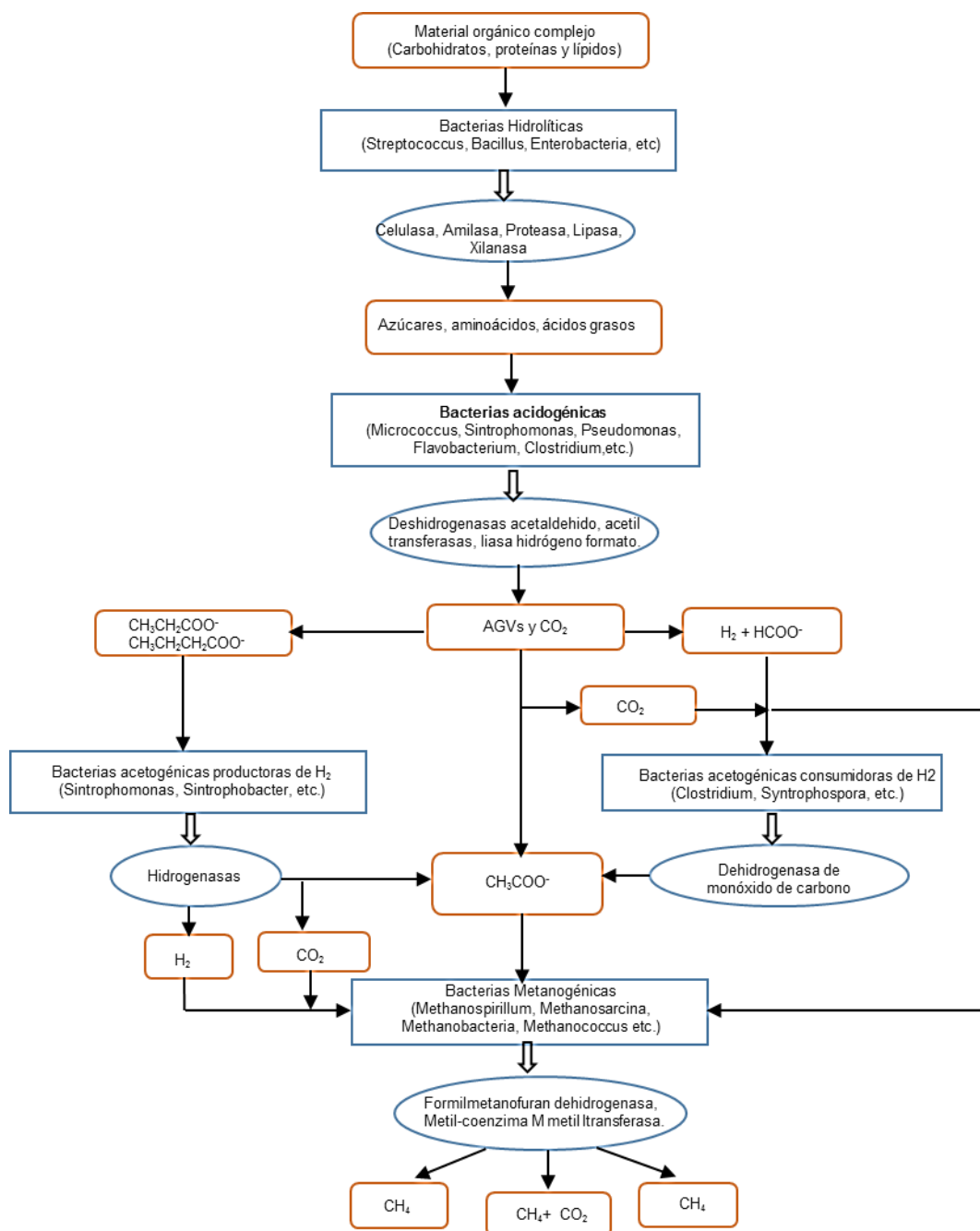
¹⁹⁶ KALLISTOVA, A. Y., GOELB, G. Y NOZHEVNIKOVA, A. N. Microbial Diversity of Methanogenic Communities in the Systems for Anaerobic Treatment of Organic Waste. En: Microbiology. Vol.; 83(5). 2014; p. 462–483.

¹⁹⁷ ZHANG, W., WEIQ, W., QID, L., ZUOZ, E. Batch anaerobic co-digestion of pig manure with dewatered sewage sludge under mesophilic conditions. En: Applied Energy. Vol.; 128. 2014; p. 175–83.

¹⁹⁸ JHA, A.K., LI, J., NIES, L. and ZHANG, L. Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes. En: Afr. Journal Biotechnology. 10. 2011; p. 14242–14253.

¹⁹⁹ AMANI. Op. cit.

Figura 33. Esquema general de las enzimas microbianas y bacterias involucradas en la DA. Tomado de Divya et al.; (2015).



Las bacterias acetogénicas son las responsables de la producción de acetato. Hay géneros de microorganismos que son estrictamente acetogénicos, tales como;

Acetobacterium y *Sporomusa*. De igual forma, hay otros géneros que contienen acetogénicos o no acetogénicos, por ejemplo; *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Eubacterium*. Los acetogénicos son productores obligados de hidrógeno que no pueden sobrevivir en presiones parciales elevadas de hidrógeno, así que existe una relación simbiótica entre los acetogénicos que producen el acetato y los metanógenos que lo consumen ²⁰⁰.

El grupo de bacterias metanogénicas está formado por microorganismos anaerobios estrictos y son muy sensibles a los cambios ambientales y condiciones operacionales. Convierten los productos finales de la fermentación ácida y acidogénica en metano y dióxido de carbono. En la etapa de metanogénesis se presenta un crecimiento lento de los microorganismos y es considerada generalmente como la reacción limitante en el proceso de DA ²⁰¹. Con el objetivo de lograr un desarrollo adecuado de los microorganismos es necesario mantener algunas condiciones, tales como; un potencial redox de -330 mv, anaerobiosis estricta y un pH cercano a la neutralidad (6.8 a 7.2), cantidades adecuadas de sulfatos y nitratos; entre otras ^{202 203}. De acuerdo con los sustratos que degradan se pueden establecer dos grupos metanógenos:

➤ Arqueas Metanogénicas Acetoclásticas (AMA)

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, *Metanosarcina sp.* y *Metanotrix sp.* (Anteriormente *Metanosaeta*), los cuales difieren con respecto a su afinidad por el sustrato, su tasa de crecimiento

²⁰⁰ HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M., IGARASHI, Y. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 72. 2006; p. 1623–30.

²⁰¹ MICHAUD. Op. cit.

²⁰² SUTARYO S, WARD AJ, MØLLER HB. Thermophilic anaerobic co-digestion of separated solids from acidified dairy cow manure. En: Bioresource Technology. Vol. 114. 2012; p.195–200.

²⁰³ WANG. Op. cit.

y sustratos específicos. *Metanosarcina sp.*, es el metanógeno más versátil, capaz de utilizar varios sustratos incluyendo hidrógeno y acetato, mientras *Metanotrix sp.*, se caracteriza porque solo degrada acetato ^{204 205 206}.

➤ Arqueas Metanogénicas Hidrogenofílicas (AMH₂)

Las AMH₂ 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. ²⁰⁷. Las arqueas metanogénicas hidrogenofílicas pueden ser sustituidas por las bacterias sulfatorreductoras en ambientes con una elevada concentración de sulfatos, compitiendo entonces por el hidrógeno disponible cuando existen limitaciones de dicho sustrato ²⁰⁸.

La población microbiana en sistemas anaerobios se encuentra relacionada con el tipo de sustrato e inóculo utilizado. García-Peña ²⁰⁹ determinó la población microbiana en la digestión anaerobia de residuos de frutas y vegetales utilizando estiércol de vaca como inóculo, los investigadores encontraron el dominio de los metanógenos hidrogenotróficos en la comunidad metanogénica a pesar que el inóculo utilizado, normalmente contiene metanógenos acetoclásticos. Estos resultados concuerdan

²⁰⁴ ROZZI, A. and REMIGI, E. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. En: Reviews in Environmental Science and Biotechnology. Vol.; 3(93). 2004; p.115.

²⁰⁵ DEMIREL, B. y SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a Review. En: Environmental Science Biotechnology. Vol.; 7. 2008; p. 173–190.

²⁰⁶ ZIGANSHIN, AM., LIEBETRAU, J., PRÖTER, J., KLEINSTEUBER, S. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. En: Applied Microbiology Biotechnology. Vol.; 97.2013; p. 5161–74.

²⁰⁷ GARCÍA, J-L., PATEL, B. K. C. y OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. En: Anaerobe. Vol.; 6. 2000; p. 205-226.

²⁰⁸ KOTSYURBENKO, O.R. Trophic interaction in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. En: FEMS Microbiology Ecology. Vol.; 53. 2005, p. 3–13.

²⁰⁹ GARCÍA-PEÑA. Op. cit.

con Ike ²¹⁰ quien estableció el dominio de metanógenos utilizadores del acetato, *Metanosaeta sp.* en este tipo de inóculo. Tabatabaei ²¹¹ en la digestión anaerobia de residuos de palma de aceite observó que la mayoría de los metanógenos pertenecían al género *Metanosaeta sp.* (>99%) y muy baja presencia de *Metanosarcina sp.* (<1%).

Ziganshin ²¹² vinculó el aumento en el número de *Metanosarcina sp.* con el incremento en la concentración de AGVs en condiciones termofílicas. Este resultado concuerda con hallazgos previos en los que los géneros *Metanosaeta sp.* y *Metanosarcina sp.* predominaron en función de la concentración de AGVs y amoníaco. De acuerdo con Karakashev ²¹³, el género *Metanosaeta sp.* predominó en un medio con niveles bajos de AGVs y amoníaco, mientras que el género *Metanosarcina sp.* prevaleció a concentraciones moderadas de AGVs y amoníaco. Niveles elevados de amoníaco y/o AGVs pueden ocasionar inhibición en los metanógenos acetoclásticos y cambiar además la ruta metabólica del acetato. En algunos casos el acetato puede ser oxidado a H₂ y CO₂ por bacterias sintróficas del acetato; por lo tanto, es necesario la presencia de metanógenos hidrogenotróficos para completar la metanogénesis ^{214 215}.

La biopelícula formada en la superficie de los soportes está formada por diferentes microorganismos que forman parte de una sinergia que permite la degradación del sustrato para la formación de metano. En este aparte del trabajo de investigación,

²¹⁰ IKE, M., INOUE, D., MIYANO, T., LIU, T.T., SEI, K., SODA, S. Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project. En: Bioresource Technology Vol.; 101. 2010; p. 3952–3957.

²¹¹ TABATABAEI, M., ZAKARIA, M.R., RAHIM, R.A., WRIGHT, A.D.G., SHIRAI, Y., ABDULLAH, N. PCR based DGGE and FISH analysis of methanogens in anaerobic closed digester tank treating palm oil mill effluent (POME). En: Electronic Journal of Biotechnology. Vol.; 12(3). 2009.

²¹² ZIGASHIN. Op. cit.

²¹³ KARAKASHEV, D., BATSTONE, D.J., TRABLY, E., ANGELIDAKI, I. Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 72. 2006; p. 5138–41.

²¹⁴ KARAKASHEV D., BATSTONE, DJ, ANGELIDAKI, I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 71. 2005; p.331–8.

²¹⁵ KRAKAT, N., WESTPHAL, A., SCHMIDT, S., SCHERER, P. Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 76. 2010; p. 1842–50.

se realizaron análisis de los microorganismos presentes en el reactor de película adherida para correlacionar el desempeño del reactor con la microbiota presente en ellos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica del Número Más Probable (NMP) fue utilizada para el conteo de microorganismos sensibles al oxígeno, así como los grupos metabólicos presentes, en los diferentes reactores. También se realizó aislamiento e identificación de bacterias metanogénicas a las muestras tomadas del reactor de película adherida de 2000 mL de volumen con sustrato real.

3.2.1 Conteo por grupos metabólicos. En la primera fase experimental de la selección de los soportes presentada en el capítulo anterior, en el cual se evaluaron cuatro reactores de película adherida con glucosa como sustrato. El análisis de los microorganismos presentes en los reactores fueron realizados a los 2 y 4 meses de operación, tiempos en los cuales se extrajeron muestras de los reactores y se realizaron recuentos por grupos metabólicos estimados la técnica del número más probable (NMP) para los grupos:

- Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG) y el lactato (BFL)
- Bacterias Acetogénicas del Propionato y Formato (BAP; BAF)
- Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA) y Lactato (BSRL)
- Arqueas Metanogénicas del Acetato y Formato (AMA, AMF).

Para la segunda fase experimental de selección del soporte del capítulo anterior, en la cual se evaluó un reactor de 2000 mL de volumen alimentado con sustrato real. El análisis de los microorganismos se realizó tomando muestras del reactor a los 30 y 60 días de operación. La muestra de biopelícula fue tomada directamente de cada

uno de los soportes realizando un raspado con ayuda de un hisopo de algodón estéril, bajo atmósfera de anaerobiosis N_2 y CO_2 (80-20%). Cada soporte fue sumergido en 100 mL de solución salina estéril para remover la mayor cantidad de microorganismos. Posteriormente, se llevó a un agitador tipo shaker orbital a 80 rpm durante 20 min con el fin de incrementar el número de microorganismos presentes en la biopelícula. Finalmente, se procedió a realizar diluciones seriadas para posteriormente sembrarlas en los medios requeridos de acuerdo con el tipo de microorganismo a analizar.

El medio utilizado para el crecimiento de las BFG y BFL contenía 50 mL de solución mineral libre de sulfato, 10 mL de oligoelementos, 0.3 g de K_2HPO_4 , 1 mL de $Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0.2% p/v), 1 mL de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.5 g L^{-1}), 1 mL azul de bromotimol (1% p/v), 2 g extracto de levadura, 2 g de tripticasa, 1 mL de selenito de sodio (1.75 g L^{-1}), 2.5 g de $NaHCO_3$ (10% p/v), 0.25 g de cisteína-HCl, 10 g de $C_6H_{12}O_6$ y 7.2 mL de lactato (60% p/v). Posterior a la esterilización se agregaron 0.05 mL de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (2% v/v) y 0.05 mL de vitaminas. El pH del medio fue de 7.1–7.3.

El medio preparado para las BAP y BAF contenía 50 mL de solución mineral libre de sulfato, 10 mL de oligoelementos, 0.3 g de K_2HPO_4 , 1 mL de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2% p/v), 1 mL de selenito de sodio, 0.5 mL L^{-1} de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g L^{-1} extracto de levadura, 0.1 g de tripticasa y 1 mL resazurina (0.1% p/v), 5 g de $NaHCO_3$ y 0.5 g de cisteína-HCl. Posterior a la esterilización, se adicionaron 0.9 mL de $Na_2S \cdot 9H_2O$ y 0.9 mL de vitaminas.

El medio por litro de agua destilada utilizado para las BSRA y BSRL contenía: 0.2 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de NH_4Cl , 3 g de Na_2SO_4 , 1.2 g de $NaCl$, 0.36 g de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.4 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.15 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 g de extracto de levadura, 1 mL de solución de oligoelementos de Peening y Widdel libre de sulfato, 1 mL de resazurina, 2.5 g of $NaHCO_3$, 3 g de acetato de sodio y 8.5 mL de lactato usados como sustrato. Después de la esterilización se adicionaron 0.1 mL de cisteína-HCl y 0.05 mL de vitamina de Peening y Widdel. El pH del medio fue de 6.7.

El medio para las AMA y AMF contenía 50 mL de solución mineral libre de sulfato, 10 mL de solución de oligoelementos libre de sulfato, 0.3 g de K_2HPO_4 , 1 mL de $Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$, 1 mL de selenito de sodio, 0.5 g de extracto de levadura, 0.1 g de tripticasa, 1 mL de resazurina, 5 g de $NaHCO_3$ y 0.5 g de cisteína-HCl. Para las AMA se utilizaron 8 g L^{-1} de acetato. Para las AMF se adicionaron al medio 0.5 mL de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mL de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.2%) y 8 g de formato. Después de la esterilización se agregaron 0.9 mL de $NaS \cdot 9H_2O$ y 0.9 mL de vitaminas. El pH del medio fue de 7.1 – 7.4.

Para el recuento de los grupos metabólicos se inocularon tres viales de 10 mL o botellas de 500 mL por dilución y tres diluciones por muestra, selladas herméticamente. Se incubaron a $35^\circ \pm 1^\circ C$ durante el tiempo necesario dependiendo del grupo metabólico. El periodo de incubación para las bacterias fermentativas fue de 5 - 8 días y los viales positivos se detectaron por la acidificación del medio (cambio de color azul a amarillo, del indicador azul de bromotimol). Las bacterias acetogénicas y metanogénicas se incubaron de 30 a 60 días y el crecimiento se reportó como el número de tubos positivos por detección de metano a través de un analizador de gases, Bacharach. Para las bacterias sulfatorreductoras el tiempo de incubación fue de 7 - 15 días y los ensayos se consideraron positivos por la formación de un precipitado negro (FeS) ²¹⁶. Después de la incubación el número de tubos positivos en las diferentes diluciones se usó para obtener el NMP, según la tabla de probabilidades reportada en el Standard Methods. Los datos se reportan en NMP mL^{-1} (APHA, 1995). Todos los procedimientos descritos se realizaron bajo atmósfera controlada de N_2 y CO_2 (80-20%) de acuerdo con Díaz en una cámara de anaerobiosis ²¹⁷.

3.2.2 Conteo por sensibilidad al oxígeno. El conteo microbiológico por sensibilidad al oxígeno se realizó por medio de la técnica de recuento estándar en

²¹⁶ DIAZ, M., ESPITIA, V. Y MOLINA, P. Digestión Anaerobia. Una aproximación a la Tecnología. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Primera edición. 2002.

²¹⁷ Ibid.

placa por siembra profunda para los siguientes grupos, en la segunda fase de experimentación:

- Las Bacterias Aerobias y Anaerobias Facultativas (BAAF)
- Las Bacterias Anaerobias (BA)
- Los Mohos y Levaduras (ML)

Para las BAAF se utilizó Agar Nutritivo (MERCK), para las BA Agar Tioglicolato (OXOID) y para los ML Agar OGYE con suplemento de Gentamicina (MERCK). Se sembraron dos cajas por dilución y dos diluciones por muestra. Se incubaron a 35 ± 1 °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 ²¹⁸. 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.

3.2.3 Aislamiento e identificación de bacterias metanogénicas. El aislamiento de los microorganismos se realizó empleando los medios de cultivo descritos por Díaz ²¹⁹, para las bacterias metanogénicas del acetato, el formato y el metanol. La siembra se realizó por duplicado en la cámara de anaerobiosis con una atmósfera de N₂ y CO₂ (80% - 20%) a partir de las muestras tomadas del reactor con ladrillo como soporte.

La siembra se realizó en medio selectivo para cada microorganismo de acuerdo con la base de datos de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ²²⁰. En el caso de *Methanobacterium* sp. (Medio 119),

²¹⁸ DÍAZ. Op. cit.

²¹⁹ DÍAZ. Op. cit.

²²⁰ 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>

Methanosarcina sp., (Medio 120), *Methanococcus sp.* (Medio 141a) y *Methanotrix sp.* (Medio 334). Estos medios incluyen diversos sustratos que son utilizados por estos microorganismos como fuente de carbono y energía para su crecimiento y metabolismo. Todos los medios líquidos fueron pre-reducidos mediante calentamiento en la cámara de anaerobiosis con el fin de desplazar el O₂. Se incubaron a 35°C durante 60 días en condiciones de anaerobiosis y se realizó coloración de Gram para verificar por microscopia la presencia de las bacterias. Posteriormente, se realizó la identificación de la población microbiana mediante observaciones microscópicas y macroscópicas de las colonias diferenciándolas según su morfología, características tintoriales y bioquímicas de acuerdo con el manual de Bergey's ²²¹.

3.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

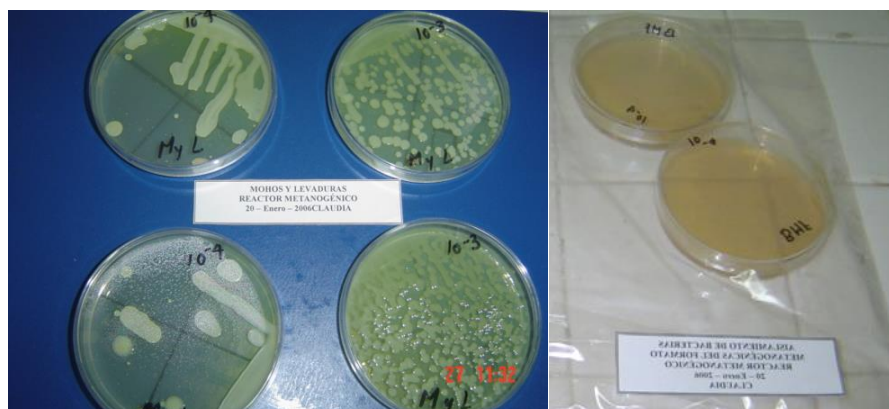
En este aparte se presentan los resultados y análisis microbiológicos para el inóculo, la primera fase de experimentación correspondiente a los cuatro reactores con glucosa como sustrato y la segunda fase del reactor de película adherida con sustrato real.

3.3.1 Microbiología del Inóculo

3.3.1.1 Recuentos por sensibilidad al oxígeno. En la **Figura 34** se presenta el registro fotográfico de las siembras para el recuento de mohos y levaduras y bacterias anaerobias. Estos recuentos se realizaron para tener una idea general de los grupos microbianos presentes tanto en el inóculo, como en los reactores.

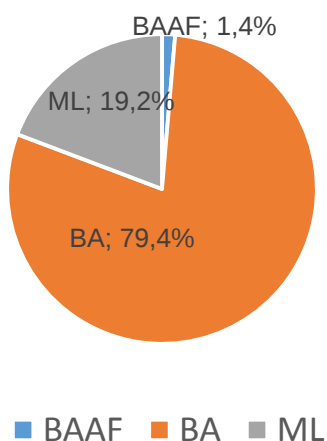
²²¹ STALEY, J., BRIANT, M., PFENNIG, N. y HOIT, J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkims. Vol.; 3. 2000.

Figura 34. Siembras para el recuento de sensibilidad al oxígeno para mohos y levaduras y bacterias anaerobias.



Los recuentos relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el inóculo en la **Figura 35** mostraron una densidad elevada de bacterias anaerobias, lo cual fue favorable para el arranque de los reactores de película adherida.

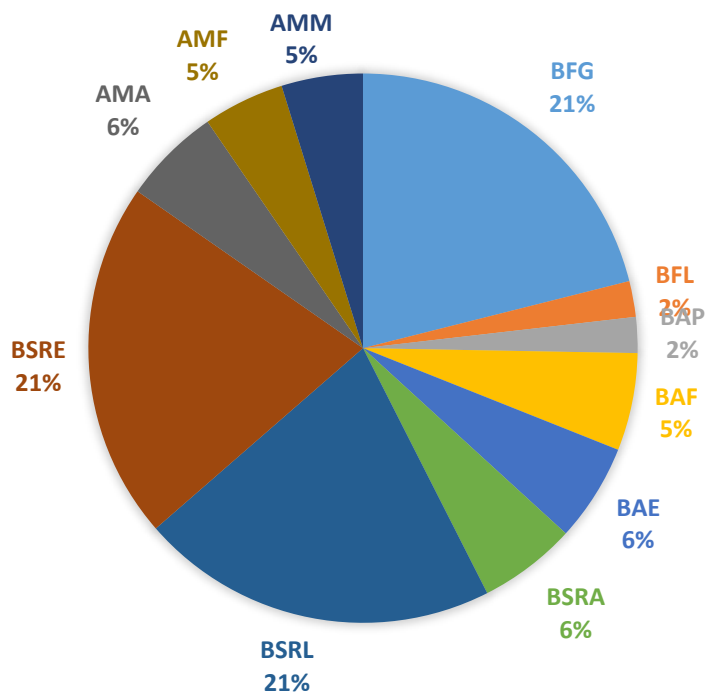
Figura 35. Recuentos de sensibilidad al oxígeno para el inóculo de mezcla lodo PTAR+ lodo porcícola.



3.3.1.2 Conteo grupos metabólicos. En la **Figura 36**, las bacterias con mayor presencia en el inóculo son las pertenecientes al grupo de las sulfatorreductoras

(BSRL y BSRE), seguidas por las fermentadoras de glucosa (BFG) y las arqueas metanogénicas (del acetato, formato y metanol).

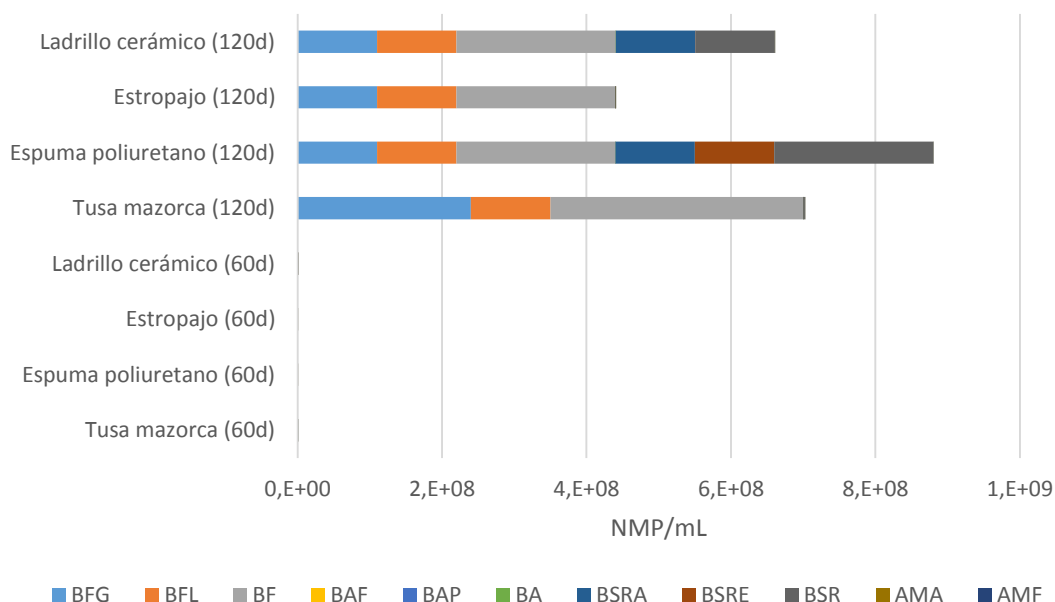
Figura 36. Recuento de grupos tróficos del inóculo mezcla lodo PTAR + lodo Porcícola.



3.3.2 Microbiología de la primera fase experimental (cuatro reactores con glucosa como sustrato). En la **Figura 37** se observa que las bacterias fermentadoras tanto de glucosa, como de lactato aumentaron de 3 a 4 órdenes de magnitud (10^3 a 10^7 y 10^4 a 10^7) para todos los soportes en el conteo realizado a los 120 días de operación. Las bacterias acetogénicas mantuvieron el mismo orden de 10^2 . Las BSRA presentaron aumento en el segundo conteo para la espuma de poliuretano y ladrillo cerámico de 10^3 a 10^7 . Las BSRE se mantuvieron constantes en el conteo para el ladrillo cerámico (10^2) y para los otros soportes se presentó un incremento de 2 órdenes de magnitud para tusa de mazorca y estropajo (10^2 a 10^4) y 5 órdenes de magnitud para la espuma de poliuretano (10^2 a 10^7). Con relación a las arqueas metanogénicas, tanto para AMA, como para AMF los soportes de tusa

de mazorca y ladrillo cerámico presentaron un aumento de dos órdenes de magnitud para el segundo conteo (10^2 a 10^4). Estos dos reactores presentaron la mayor producción de metano.

Figura 37. Grupos microbianos relacionados con el metabolismo bacteriano para los cuatro reactores de la primera fase experimental, expresado en NMP mL⁻¹.



De acuerdo con el conteo de microorganismos, las BFL y las BSRA fueron las de mayor presencia en los reactores para la muestra de 60 días. En la muestra de 120 días predominaron las BFG, las BFL y las BSR, la presencia de las arqueas metanogénicas fue baja comparada con los otros grupos, aunque en el conteo fue mayor en la muestra de 120 días que en la de 60 días.

3.3.3 Microbiología de la segunda fase experimental (reactor de película adherida con sustrato real).

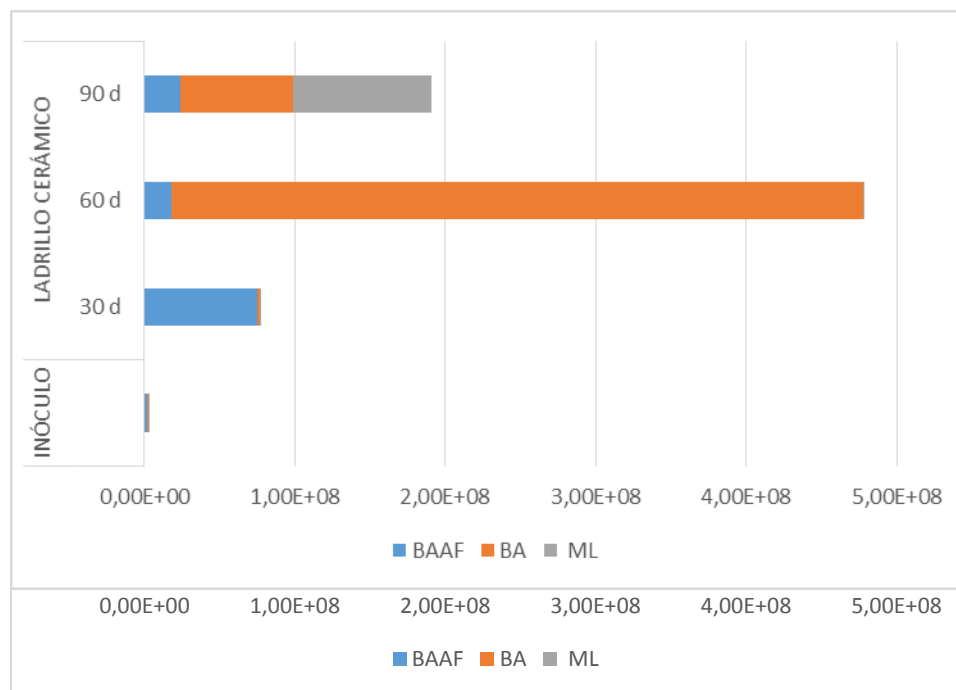
3.3.3.1 Recuentos por sensibilidad al oxígeno. En la **Figura 38**, Los recuentos relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el reactor de biopelícula mostraron a los 30 días mayor concentración de BAAF comparadas con las BA debido a que las bacterias anaerobias obligadas tienen un crecimiento más lento que las BAAF²²². Posteriormente, las BA presentaron mayor crecimiento que las BAAF. Las mayores concentraciones de ML se observaron a los 90 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 resultados por sensibilidad al oxígeno mostraron un incremento de la población anaerobia con un orden de magnitud de 10^7 a los 90 días de operación, evidenciado la presencia de un metabolismo de tipo fermentativo, en el cual las sustancias orgánicas son los aceptores finales de electrones junto con la energía obtenida a partir de la respiración anaerobia. Los valores de los conteos son superiores a los mostrados por Ogbonna para la DA de residuo de gramínea con rumen de vaca como inóculo²²³, reportaron en el caso de las BAAF, 2.21×10^6 UCF mL⁻¹ a los 28 días, 4.74×10^6 UCF mL⁻¹ a los 56 y 84 días. Para las BA, 1.14×10^6 UCF mL⁻¹ a los 28 días, 3.92×10^6 UCF mL⁻¹ a los 56 días y 4.53×10^6 UCF mL⁻¹ a los 86 días.

²²² SCHNURER, A. and JARVIS, A. Microbiological handbook for biogas plants. Swedish Gas Centre Report 207. 2010, p. 13-138.

²²³ OGBONNA, C. B., IBIENE A. A., STANLEY H. O. Microbial Population Dynamics during Anaerobic Digestion of Guinea Grass (*Panicum maximum*). En: Journal of Applied & Environmental Microbiology. Vol.; 2 (6). 2014, p. 294-302.

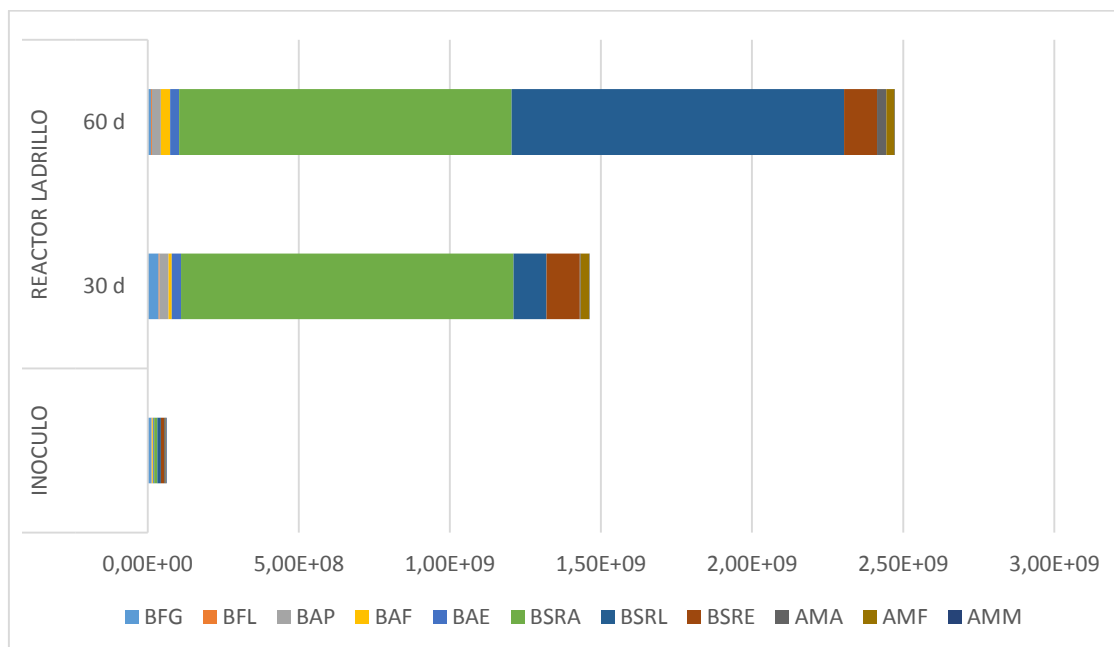
Figura 38. Grupos microbianos relacionados con la sensibilidad al oxígeno para el inóculo y reactor de biopelícula expresados en UFC. mL⁻¹.



3.3.3.2 Recuento por grupos metabólicos. En la **Figura 39** se presentan los conteos por grupos metabólicos. De acuerdo con los resultados obtenidos las (BFG) presentaron un orden de magnitud (10^6) y las BFL de (10^5). Los valores de BFG son mayores al orden de 10^5 y las BFL presentaron el mismo orden reportado por Ogbonna ²²⁴. Con relación a las bacterias acetogénicas, se observó un aumento de un orden de magnitud con relación al inóculo, pero mantuvieron valores de 30×10^6 en todos los conteos. Las sulfatorreductoras, mostraron un aumento de uno y dos órdenes de magnitud respecto al conteo del inóculo. En el caso de las arqueas metanogénicas, presentaron aumento en las AMA y AMF. El orden de las arqueas metanogénicas se encontró entre 10^4 y 10^7 .

²²⁴ OGBONNA. Op. cit.

Figura 39. Grupos microbianos relacionados con el metabolismo bacteriano para el inóculo y el reactor de biopelícula, expresado en NMP mL⁻¹



En general, la población de metanógenos aumentó para el conteo de 60 días, este incremento coincidió con el consumo de los AGV's. De igual forma se observó en los conteos que las poblaciones sulfatorreductoras presentaron en general un orden de magnitud mayor a las metanogénicas, sin que exista una aparente competencia por los sustratos entre estos grupos metabólicos. Esto sugiere que los recuentos de BSR encontrados no afectaron la actividad metanogénica del reactor ²²⁵.

La concentración típica de microorganismos en el interior de un reactor metanogénico es superior a 10^{16} células mL⁻¹, de las cuales 10^8 células mL⁻¹ corresponden a arqueas metanogénicas ²²⁶. Langer ²²⁷ cuantificó la cantidad de células en reactores con soportes de polipropileno y encontraron una mayor concentración de células en el interior de la película del orden 10^{11} células mL⁻¹,

²²⁵ FUKUI, M., SUH, J. y URUSHIGAWA, Y. In situ substrates for sulfidogens and methanogens in municipal anaerobic sewage digesters with different levels of sulfate. En: Water Research. Vol.; 34(5). 2000; p. 1515-1524.

²²⁶ AMANI. Op. cit.

²²⁷ LANGER, S., SCHROPP, D., BENGELSDORF, F.R., OTHMAN, M., KAZDA, M. Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste. En: Anaerobe. Vol.; 29. 2014; p. 44-51.

comparada con 10^{10} células mL^{-1} en el fluido del reactor. Dong ²²⁸ reportó una máxima concentración de población metanogénica de $9.6 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ en un segundo reactor de un sistema de dos etapas para la DA de residuos de repollo. Estas magnitudes difieren en tres y cuatro órdenes con relación a los conteos en el reactor de Ladrillo como soporte, teniendo en cuenta la presencia de todos los microorganismos metanogénicos, se observa que la población metanogénica no alcanzó la concentración adecuada que permitiera una mayor producción de metano.

En reactores anaerobios en los que la concentración de sulfatos es baja, la población sulfatorreductora puede 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. Al relacionar este hecho con los valores obtenidos para la población acetogénica ($30 \times 10^6 \text{ NMP mL}^{-1}$) se puede inferir que la disminución en la concentración de AGV's podría ser el resultado de las interacciones sintróficas encontradas en el sistema, donde las bacterias acetogénicas producen hidrógeno y las AMF o BSR lo consumen ^{229 230}.

3.3.3.3 Aislamiento e identificación de bacterias metanogénicas. Como resultado de los procedimientos de aislamiento llevados a cabo para las muestras en la segunda etapa de experimentación con el reactor con ladrillo cerámico como soporte, se observó la presencia de bacilos filamentosos, utilizadores del acetato, cuyas características morfológicas y bioquímicas correspondían al género *Methanotrix sp.* (**Figura 40**). También se observó la presencia de cocos irregulares

²²⁸ DONG, Op. cit.

²²⁹ NIELSEN, H. B., MLADENOVSKA, Z., WESTERMANN, P. y AHRING, B. K. Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering* Vol.; 86(3). 2004, p. 291-300.

²³⁰ VALDEZ-VAZQUEZ, I., RIOS-LEAL, E., ESPARZA-GARCÍA, F., CECCHI, F. PAVAN, P. and POGGI-VARALDO, H. A review on hydrogen production with anaerobic mixed cultures. En: *Proceedings of the H₂-age Conference: When, Where, Why*. Pierucci S. (ed) AIDIC Publ. 2004; 16-19.

capaces de utilizar varios sustratos, incluyendo el acetato y el formato pertenecientes al género *Methanosarcina* sp. (**Figura 41**). Por otro lado, la producción de CH₄ a partir del formato sería el resultado de la presencia de la población metanogénica hidrogenofílica de los géneros *Methanococcus* sp. y *Methanobacterium* sp. que utilizan este tipo de sustrato.

Figura 40. Morfología microscópica de *Methanotrix* sp. encontrada en el reactor de biopelícula.

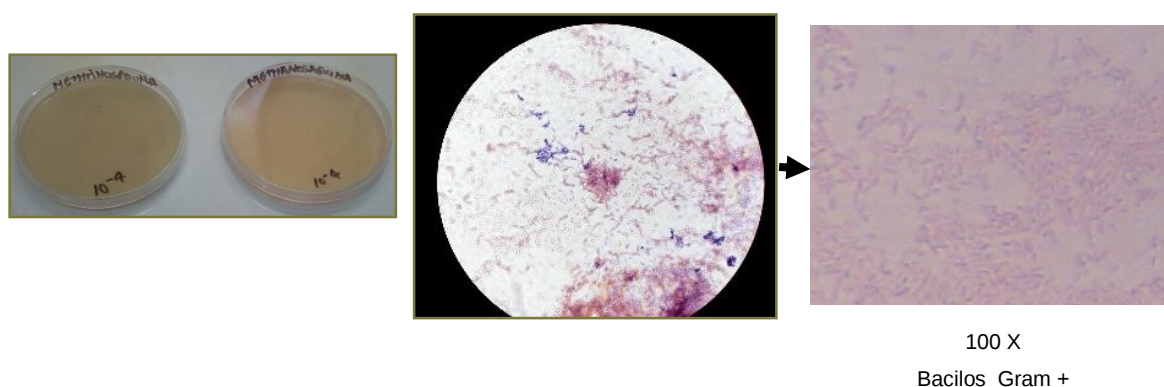
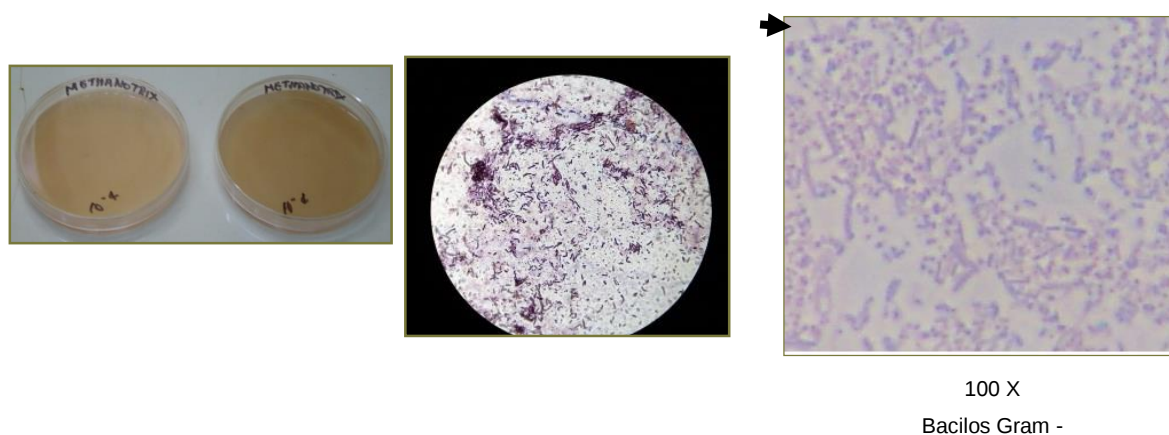


Figura 41. Morfología microscópica de *Methanosarcina* sp. encontrada en el reactor de biopelícula.



La presencia de metanógenos acetoclásticos pertenecientes al género *Methanotrix* sp. y *Methanosarcina* sp. en el reactor, se debe posiblemente 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 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 ^{231 232}. 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 ^{233 234 235}.

En reactores de lecho fluidizado con materiales de soporte como; carbón, lana de vidrio, esponja vegetal y espuma de poliuretano se encontró presencia de *Metanosarcina* sp., *Metanobacterium* sp. y *Metanobrevibacter* sp. ^{236 237}. En algunas zeolitas se ha encontrado que la población inmovilizada sobre este soporte

²³¹ SASAKI, D., HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M. y IGARASHI, Y. Methanogenic pathway and community structure in a thermophilic anaerobic digestion process of organic solid waste. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol.; 111(1). 2011; p. 41–46.

²³² NETTMANN, E., BERGMANN, I., PRAMSCHÜFER, S., MUNDT, K., PLOGSTIES, V., HERRMANN, C. and KLOCKE, M. Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plant. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 76 (8). 2010; p. 2540-2548.

²³³ CONKLIN, A., STENSEL, H.D., FERGUSON, J. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. En: Water Environmental Research. Vol.; 78 (5). 2006, p. 486–496.

²³⁴ McMAHON, K. D., STROOT, P. G., MACKIE, R. I. y RASKIN, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions II: microbial population dynamics. En: Water. Research. Vol.; 35(7). 2001; p. 1817–1827.

²³⁵ SANDOVAL. Op. cit.

²³⁶ YANG, Y., TADA, CH., SHOHIDULLAH, M., TSUKAHARA, K., YAGISHITA, T., SAWAYANA, Sh. Influence of bed material on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. En: Materials Science and Engineering, Vol.; C24. 2004; p. 423-419.

²³⁷ YANG, Y.N.; TSUKAHARA, K., SAWAYANA, S. Performance and methanogenic community of rotating disk reactor packed with polyurethane during thermophilic anaerobic digestion. En: Materials Science and Engineering C – Biomimetic and Supramolecular Systems. Vol.; 27. 2007; p. 767 – 772.

con lodos granulares y floculentos de diferentes fuentes puede ser del orden de *Metanococcacae sp.* > *Metanosarcina sp.* > *Metanosaeta sp.* ²³⁸.

²³⁸ WEIß. Op. cit.

4. MODELO MATEMÁTICO REACTOR BIOPELÍCULA

4.1 INTRODUCCIÓN

Los reactores de biopelícula anaerobia son atractivos debido a su capacidad en el manejo de elevadas cargas orgánicas, alta concentración de biomasa, resistencia a sobrecargas orgánicas y que no requieren mezclado mecánico ^{239 240 241}. Este tipo de reactor comparado con los sistemas convencionales reduce el tiempo de arranque e incrementa las velocidades de carga orgánica hasta cinco (5) veces.

Las biopelículas son ensamblajes de microorganismos que se sujetan a una superficie y se encapsulan en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), que funciona como un consorcio de cooperación ²⁴². La estructura de las comunidades microbianas varía desde monocapas de células individuales dispersas hasta estructuras gruesas de dimensiones macroscópicas ²⁴³.

El ciclo de vida de la biopelícula puede dividirse en tres etapas: la fijación de células individuales a la superficie, la maduración de la biopelícula en microcolonias complejas y la dispersión de las células planctónicas altamente móviles. Las biopelículas contribuyen a una mayor degradación de sustratos orgánicos y producción de biogás o metano debido a la fijación de los microorganismos en la

²³⁹ GHANIYARI-BENIS, S., BORJA, R., ALI MONEMIAN, S., GOODARZI, V. Anaerobic treatment of synthetic medium-strength wastewater using a multistage biofilm reactor. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 100. 2009, p. 1740-1745.

²⁴⁰ BORKAR, R.P, GULHANE, M.L, KOTANGALE, A.J. Moving Bed Biofilm Reactor – A New Perspective in Wastewater Treatment. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. Vol.; 6 (6). 2013, p. 15-21.

²⁴¹ TAKRIFF, M.S, JAAFAR, N.L., ABDULLAH, S.R.S. A review of biofilm treatment systems in treating downstream palm oil mill effluent (POME). En: *Journal of applied Sciences*. Vol.; 14 (12). 2014, p. 1334-1338.

²⁴² McDOUGALG, D., RICE, S.A., BARRAUD, N, STEINBERG, P.D, KJELLEBERG, S. Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal (Review). En: *Nature Reviews Microbiology*. Vol.; 10 (1). 2012, p. 39-50.

²⁴³ FERNÁNDEZ, N., DÍAZ, E.E., AMILS, R. SANZ, J.L. Analysis of Microbial Community during Biofilm Development in an Anaerobic Wastewater Treatment Reactor. En: *Microbial Ecology*. Vol.; 56 (1). 2008, p. 121-132.

superficie y la formación de agregados complejos ²⁴⁴. Además, aumentan la presencia de biomasa debido a la elevada densidad de células en el interior de la biopelícula ²⁴⁵.

La formación de la biopelícula es un proceso que depende de las características del inóculo, de la composición del sustrato, de la fisiología de las bacterias y de las características hidrodinámicas del reactor, así como de las características propias del reactor. Si el sistema se opera bajo condiciones adecuadas de crecimiento celular se puede asegurar una rápida formación de la biopelícula.

En este capítulo se presenta el modelo matemático del reactor de biopelícula alimentados en forma continua usando ladrillo cerámico como soporte de inmovilización celular para llevar a cabo la digestión anaerobia del efluente de un reactor hidrolítico de residuos sólidos urbanos. Las principales variables evaluadas en este modelo son la evolución de la concentración del sustrato, la evolución de la biomasa, el espesor de la biopelícula y la formación de biogás. Inicialmente, se necesitaron algunos parámetros cinéticos los cuales fueron calculados a partir de los resultados de experimentos en reactores batch. El modelo fue resuelto utilizando el software POLYMATH 5.1 de acuerdo con las expresiones matemáticas establecidas.

4.2 REACTORES DE BIOPELÍCULA

Los reactores de biopelícula más utilizados son los filtros anaerobios de flujo ascendente o descendente, los reactores de lecho fluidizado y los reactores de lecho móvil. Cada uno de estos reactores presenta ciertas ventajas sobre los otros.

²⁴⁴ ZIZI, O.B, AMAR, H A. Treatment of dairy wastewater by fixed-film system in continuous flow. En: Desalination Water Treatment. Vol.; 51. 2013, p. 2214-2224.

²⁴⁵ LANGER, S., SCHROPP, D., BENIGLSDORF F. R., OTHMAN, M., KAZDA, M. Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste. En: Anaerobe. Vol.; 29. 2014, p. 44-51.

Se han evaluado con éxito diferentes tipos de reactores de biopelícula para el tratamiento de efluentes de diferentes industrias ^{246 247}.

El filtro anaerobio (FA) es un reactor de biopelícula muy popular y su tiempo de retención hidráulico (TRH) es efectivo para el tratamiento de aguas residuales, la velocidad de carga orgánica es una limitante para este tipo de reactores cuando maneja aguas residuales complejas. El FA puede operar con una o varias alimentaciones, flujo ascendente o descendente o en forma horizontal ²⁴⁸. Los reactores de biopelícula de lecho móvil contienen materiales que proveen una elevada superficie para el crecimiento de los microorganismos adheridos, un mezclado eficiente en el interior del reactor favorece la dispersión de los ácidos volátiles en el seno de la solución y la liberación del biogás ²⁴⁹. Los reactores de lecho fluidizado presentan mejores características de transferencia cuando se comparan con los reactores de lecho fijo. Estos reactores tienen una elevada cantidad de biomasa adherida la cual es rica en diversidad microbiana y se recupera rápidamente después de condiciones de inestabilidad en la carga ^{250 251}.

4.3 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

La formación de la biopelícula puede dividirse en tres fases (**Figura 42**). En la primera fase, una capa orgánica cubre la superficie que será colonizada. La superficie húmeda es recubierta por una película delgada que contiene nutrientes,

²⁴⁶ WANG, SH., RAO, N.C., QIU, R., MOLETT, R. Treatability and kinetic analysis of anaerobic moving bed biofilm reactor treating high strength milk permeate. En: Desalination Water Treatment. Vol.; 4. 2009, p. 1-3.

²⁴⁷ RAJAGOPAL, R., SAADY, N.M.C., TORRIJOS, M., THANIKA, L J.V., HUNG, Y.T. Sustainable agro-food industrial wastewater treatment using high rate anaerobic process. En: Water. Vol.; 5. 2013, p. 292-311.

²⁴⁸ RAJINIKANTH, R., GANESH, R., ESCUDIE, R., MEHROTRA, I., KUMAN, P., THANIKAL, J.V.,TORRIJOS, M. High rate anaerobic filter with floating supports for the treatment of effluents from small-scale agro-food industries. En: Desalination Water Treatment. Vol.; 4. 2009, p. 183-190.

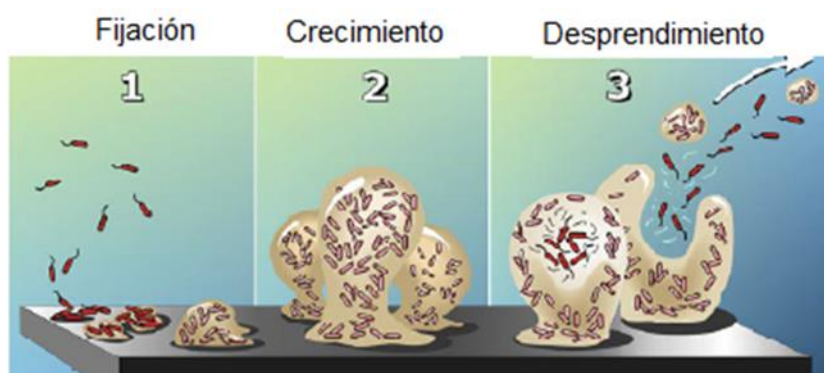
²⁴⁹ RODGERS, M., ZHAN, X.M, DOLAN, B. Mixing characteristics and whey wastewater treatment of a 8 novel moving anaerobic biofilm reactor. En: Journal Environmental Science Health. Vol.; 39. 2004, p. 2183-2193.

²⁵⁰ WANG. Op. cit.

²⁵¹ DE AMORIN, E., SADER, L.; SILVA, E. Effects of the organic loading rate on the performance of an anaerobic fluidized-bed reactor treating synthetic wastewater containing phenol. En: Journal of Environmental Engineering. Vol.; 141(10). 2015, p. 1-9.

proteínas y otras moléculas que los microorganismos adsorben. La producción inicial de SPE atrapa los nutrientes y productos microbianos que permiten la fijación irreversible y el inicio de la segregación de los microorganismos.

Figura 42. Etapas del desarrollo de una biopelícula. Tomado de P. Dirckx²⁵².



En la segunda fase las bacterias entran en contacto con la superficie por el movimiento browniano, por su propia movilidad o el transporte turbulento. La adsorción a la superficie del medio es reversible de modo que las células pueden separarse después. Durante esta fase la adsorción es controlada por las fuerzas de Van der Waal's y enlaces químicos. En esta etapa, la biopelícula desarrolla sus rasgos heterogéneos, así como su diversidad estructural y distribución poblacional

En la etapa final, la biopelícula presenta desprendimiento de células al medio. Este desprendimiento puede ser dividido en activo y pasivo²⁵³. La forma pasiva involucra fuerzas externas, tales como; esfuerzos de corte y depredación por otros organismos, los cuales causan una pérdida de biomasa. Las células pueden abandonar la estructura de la biopelícula en forma individual o en grupos. El

²⁵², Center for Biofilm Engineering, Montana State University. Disponible en: <http://www.biofilm.montana.edu/>

²⁵³ KAPLAN; J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. En: Journal Dent. Research. Vol.; 89. 2010, p. 205–218.

desprendimiento activo es iniciado por la bacteria internamente, permitiendo una dispersión de células. Las células desprendidas quedan disponibles para fijarse y formar nuevas colonias.

En las fases iniciales de formación de la biopelícula, las bacterias forman una capa fina e irregular que no provee los beneficios para su crecimiento y evitar, por ejemplo, el lavado de células. La escala de longitud de una bacteria es del orden de micrómetros, por esta razón, la película inicial es de solo un par de micrómetros de espesor. Sin embargo, a medida que la biopelícula madura, este espesor va aumentando y puede llegar a escalas de milímetros, y en algunos casos, hasta centímetros.

4.3.1 Fijación de microorganismos. Entre los factores involucrados en la fijación de microorganismos sobre una superficie se encuentran; transporte de masa, acondicionamiento de la superficie, hidrofobicidad, carga en la superficie y rugosidad ^{254 255}. Las moléculas orgánicas e inorgánicas, junto con las bacterias son transportadas a la superficie y acumuladas en la interfase sólido-líquido. La película contiene una elevada concentración de nutrientes comparada con el seno del líquido, con propiedades fisicoquímicas que difieren de la superficie original. La adhesión bacteriana puede ser dividida en dos pasos: fijación reversible e irreversible. La primera transporta a la bacteria lo suficientemente cerca a la superficie para permitir una interacción inicial. En este paso, las bacterias son capaces de salir de la biopelícula y pueden ser fácilmente removidas. El segundo paso de adhesión involucra la producción de sustancias poliméricas extracelulares que se unen firmemente a la superficie en forma irreversible. En esta etapa, la bacteria no puede ser removida sin intervención ya sea física o química.

²⁵⁴ LANGER. Op. cit.

²⁵⁵ PERNI, S., PREEDY, E.C., PROKOPOVICH, P. Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces. En: *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol.; 206. 2014, p. 265–274.

4.3.2 Desprendimiento de microorganismos. El desprendimiento es un fenómeno complejo representado por diferentes mecanismos y factores que causan pérdida de biomasa. Este es un proceso de gran importancia que regula la acumulación de biomasa, producción de sólidos suspendidos y estrategias de supervivencia biológica ²⁵⁶. El desprendimiento se divide en cinco categorías ²⁵⁷: abrasión, atrapamiento, erosión, maduración y dispersión (**Figura 43**). La abrasión y el atrapamiento son procesos pasivos, la erosión y maduración pueden ser procesos activos o pasivos, mientras que la dispersión es siempre una remoción activa de células que involucra mecanismos iniciados por las mismas bacterias. Estos procesos no son exclusivos y pueden ocurrir varios de ellos en la misma biopelícula. En la abrasión y la erosión se liberan células o pequeñas porciones de biopelícula, pero con diferentes mecanismos ²⁵⁸. La abrasión es causada por la colisión con partículas presentes en el seno del líquido. La erosión es causada por esfuerzo del fluido en el sistema con la consecuencia de pérdida de biomasa cuando las fuerzas de corte son superiores a la cohesividad en la biopelícula. En el atrapamiento, microorganismos superiores causan la remoción de biomasa a través de la depredación de bacterias en la biopelícula. Este proceso es poco conocido, pero se cree que es un factor importante en el control de la dinámica de la biopelícula ²⁵⁹.

La maduración involucra el desprendimiento de grandes porciones de biopelícula intacta. Las condiciones hidrodinámicas locales se relacionan con el desprendimiento de la biopelícula, un aumento en la velocidad de flujo causa un incremento en el desprendimiento de biopelícula afectada por las fuerzas de corte

²⁵⁶ GOODE, C. Understanding biosolids dynamics in a moving bed biofilm reactor. En: PhD thesis, University of Toronto, Canada. 2010.

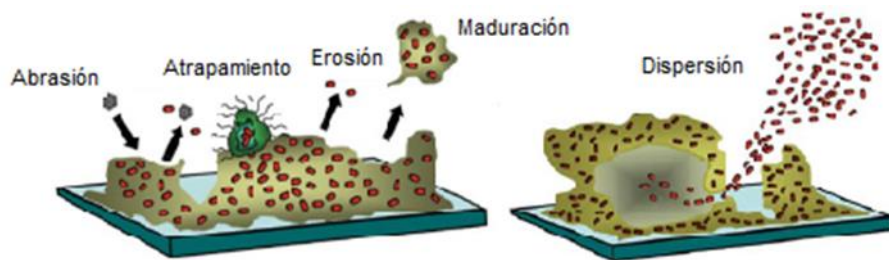
²⁵⁷ KAPLAN. Op. cit.

²⁵⁸ DAVIES, D.G. Biofilm dispersion. In H.-C. Flemming, J. Wingender, and U. Szewzyk, editors, Biofilm highlights, volume 5 of Springer series on biofilms. Springer, Berlin, 2011, p. 1–28.

²⁵⁹ RYCHERT, K and NEU, T. Protozoan impact on bacterial biofilm formation. En: Biological Letters. Vol.; 47 (1). 2010, p. 3-10.

²⁶⁰. El ángulo en el cual actúa el esfuerzo de corte determina si el desprendimiento es por erosión o por maduración.

Figura 43. Cinco modos de desprendimiento de Biopelícula: abrasión, atrapamiento, erosión, maduración y dispersión. Tomado de Davies ²⁶¹.



La dispersión es la liberación de células no unidas desde un espacio vacío en el interior de la biopelícula, requiere una participación activa de la bacteria. Contrario a la erosión y la maduración, la dispersión no depende de fuerzas en el fluido y puede ocurrir en ausencia de flujo ²⁶². Se ha propuesto que la dispersión es un mecanismo de escape de las bacterias debido a las malas condiciones en su entorno. Además, la dispersión permite el transporte de bacterias a nuevos sitios de colonización.

La comprensión de los mecanismos de desprendimiento de biopelícula es útil en la implementación de aplicaciones. En el caso de tratamiento de efluentes, la erosión y maduración debido a las fuerzas de corte del fluido impacta en la formación y funcionamiento de la biopelícula.

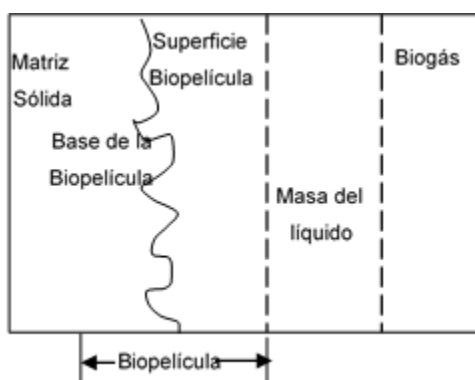
²⁶⁰ WAGNER, M., MANZ, B., VOLKE, F., NEU, T.R., HORN, H. Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. En: *Biotechnology Bioengineering*. 107(1):Vol.; 107(1). 2010, p. 172–181.

²⁶¹ DAVIES. Op. cit

²⁶² Ibid.

4.3.3 Diagrama conceptual. Existen diferentes diagramas conceptuales en la formación de la biopelícula. En la **Figura 44** se muestra un diagrama reportado con frecuencia. La matriz sólida a la cual está adherida la película microbiana, es generalmente impermeable al sustrato y puede ser de material natural o sintético. La biocapa puede ser dividida en dos zonas: la base y la superficie de la película. Ambas contienen ensambles complejos de microorganismos y otras partículas, unidas por fuerzas electrostáticas y SPE. La base de la biopelícula está formada por la acumulación estructurada de biomasa y tiene límites bien definidos. Normalmente, se ha asumido que el transporte de materia en esta sección es controlado por movimiento molecular (difusión), mientras que, la superficie de la biopelícula es una zona de transición entre la base y el líquido, en donde la transferencia es dominada por la convección del sustrato. El espesor de ambas fases es controlado fundamentalmente por la hidrodinámica del sistema y la naturaleza microbiana.

Figura 44. Diagrama conceptual de un sistema de Biopelícula. Tomado de: *Evaluación y modelado de la cinética de depuración anaerobia de vinazas de la industria alcoholera.* Jorge Del Real Olvera.²⁶³



²⁶³ DEL REAL, J. Evaluación y modelado de la cinética de depuración anaerobia de vinazas de la industria alcoholera. Tesis Doctorado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. 2007, p. 41.

Asumiendo que todas las poblaciones microbianas de un consorcio tienen la misma capacidad de adhesión, su distribución final en la biopelícula será controlada por la competición del espacio disponible y los nutrientes presentes. Por esta razón, se intuye que las bacterias de la superficie crecen más rápidamente que las del interior; sin embargo, las bacterias internas, debido a su crecimiento, originan que las bacterias de la superficie se alejen del sólido. El espesor final de la biopelícula es regulado por el balance entre la migración de las bacterias internas hacia el exterior y por las fuerzas tangenciales producto del movimiento del fluido. Al aumentar el espesor, una parte de la biomasa se inactiva debido a la insuficiencia de sustrato y puede desprenderse al seno del líquido.

4.4 MODELOS MATEMÁTICOS

Los modelos matemáticos pueden ir desde correlaciones empíricas sencillas hasta algoritmos que describen la morfología tridimensional de la biopelícula. Los modelos analíticos emplean suposiciones simplificadas, tal como que el flujo del sustrato en el interior de la biopelícula puede ser calculado sin técnicas numéricas ²⁶⁴. En estos modelos los efectos de cada término, variable o parámetro se puede analizar directamente. Los modelos pseudoanalíticos son una alternativa cuando se eliminan simplificaciones que logran una representación más real del sistema. Las soluciones pseudoanalíticas comprenden un set de ecuaciones que puede ser resuelto por medio de programación sencilla ²⁶⁵. Los modelos numéricos en una dimensión representan la biopelícula en una dimensión perpendicular al sustrato. Las ecuaciones pueden resolverse numéricamente y las simulaciones con cierto grado de complejidad por medio de software ²⁶⁶. En los modelos numéricos multidimensionales, la biopelícula es modelada como una estructura bi o

²⁶⁴ BOLTZ, J.P., JOHNSON, B.R., DAIGGER, G.T., SANDINO, J. Modeling Integrated Fixed-Film Activated Sludge and Moving-Bed Biofilm Reactor Systems I: Mathematical Treatment and Model Development. En: Water Environment Research. Vol.; 81(6). 2009; p. 555-575.

²⁶⁵ SARKAR, S and MAZUMDER, D. Development of a simplified biofilm model. En: Applied Water Science. Vol.; 72(9). 2015, p.1601-1610.

²⁶⁶ BOLTZ, J.P., MORGENROTH, E., SEN, D. Mathematical modelling of biofilms and biofilm reactors for engineering design. En: Water Science Technology. Vol.; 62 (8). 2010, p.1821–1836.

tridimensional. Todos los componentes pueden variar en el espacio multidimensional, así como en el tiempo. La premisa de estos modelos es que capturando la heterogeneidad espacial y temporal química, física y biológica es posible obtener una evaluación de la biopelícula y las interacciones a un nivel micro

267 268

La forma como se ve la estructura de la biopelícula ha cambiado drásticamente en los últimos años. Por varios años, prevaleció el concepto de representar la estructura de la biopelícula en modelos de una sola dimensión ^{269 270}. En la biopelícula en una sola dimensión, ésta es visualizada como una capa sobre el soporte. La capa es considerada uniforme en dirección paralela al soporte, aunque es permeable al transporte de moléculas de soluto en dirección perpendicular al soporte.

El uso de nuevas tecnologías ha permitido revelar una morfología más compleja en la estructura de la biopelícula. Se ha observado que algunas biopelículas crecen en grupos microbianos en forma de hongo (**Figura 45**), con canales a través de los cuales se presenta transporte convectivo. La variabilidad espacial de la densidad, porosidad y permeabilidad entre los grupos microbianos, así como en el interior de éstos, pueden ser representados por modelos de dos o tres dimensiones. El descubrimiento de la heterogeneidad creó la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y mediciones para cuantificar la estructura de la biopelícula.

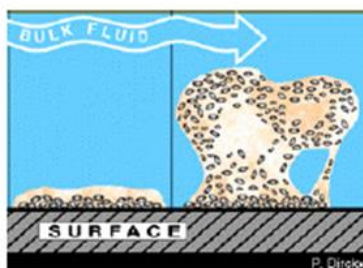
²⁶⁷ GRAF VON DER SCHULENBURG, D.A., PINTELON, T.R., PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., JOHNS, M.L. Three-dimensional simulations of biofilm growth in porous media. En: *AIChE Journal*. Vol.; 55, 2009; p. 494–504.

²⁶⁸ TAHERZADEH, D., PICIOREANU, D., HORN, H. Mass Transfer Enhancement in Moving Biofilm Structures .En: *Biophysical Journal*. Vol.; 102 (7). 2012; p. 1483–1492.

²⁶⁹ RITTMANN, B.E., SCHWARZ, A. O., EBERL, H.J., MORGENROTH, E., PEREZ, J., VAN LOOSDRECHT, M., WANNER. W. Results from the multi-species Benchmark Problem (BM3) using one-dimensional models. En: *Water Science and Technology*. Vol.; 49 (11-12). 2004; p. 163-168.

²⁷⁰ MORGENROTH, E., EBERL, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., NOGUERA, D.R., PIZARRO, G.E., PICIOREANU, C., RITTMANN, R.E., SCHWARZ, A.O., WANNER, O. Comparing biofilm models for a single species biofilm system. En: *Water Science and Technology*. Vol.; 49 (11–12). 2004, p. 145-154.

Figura 45. Esquema de estructura de biopelícula tipo hongo. Tomado de P. Dirckx ²⁷¹



En el caso de medición experimental de un proceso de biocatálisis heterogénea, como es el caso de reactores de biopelícula, esta medición se realiza en el seno del líquido y no en la película microbiana, donde se realiza la transformación, por ello es necesario establecer una relación entre los factores extra e intracelulares y la velocidad de remoción del contaminante. Este procedimiento debe interpretar los cambios generados por el consorcio microbiano a partir de mediciones realizadas en la masa del fluido.

Actualmente, se utilizan varias técnicas para lograr esta relación. Entre estas técnicas se pueden mencionar; la técnica directa en la cual las ecuaciones diferenciales que describen el proceso de difusión reacción en el interior de la biopelícula, son combinadas con las ecuaciones de diseño del reactor para ser resueltas mediante algún método numérico ²⁷² ²⁷³. Esta técnica se basa en la resolución de sistemas que involucran múltiples poblaciones microbianas en la degradación de sustratos complejos.

La técnica del factor de efectividad en la cual la velocidad de reacción en cualquier parte del biocatalizador es definida como en un sistema homogéneo (en términos

²⁷¹ P. DIRCKY. Op. cit.

²⁷² BOLTZ, J.P., JOHNSON, B.R., DAIGGER, G.T., SANDINO, J., EENTER, D. Modeling Integrated Fixed-Film Activated Sludge and Moving-Bed Biofilm Reactor Systems II: Evaluation. En: Water Environment Research. Vol.; 81(6). 2009a; p. 576-586.

²⁷³ KHASSEHKHAN, H., HILLEN, T., EBERL, H.J. A Nonlinear Master Equation for a Degenerate Diffusion Model of Biofilm Growth. En: Lecture Notes in Computer Science. 2009, p. 735-744.

de la concentración y temperatura del sustrato), esta velocidad debe ser multiplicada por un factor cuando se emplean partículas catalíticas. El factor de efectividad corrige las desviaciones generadas por los problemas difusivos en la transferencia de masa y calor hacia el interior del sólido catalítico ²⁷⁴. Al combinar las ecuaciones resultantes de este proceso con las del diseño del reactor, se puede estimar el desempeño global del sistema.

Un aspecto importante en el modelamiento de estos sistemas es la determinación de los parámetros cinéticos. Algunos investigadores han determinado parámetros cinéticos experimentalmente ^{275 276 277}. Una alternativa para la determinación de los parámetros cinéticos es la evaluación numérica en la que los parámetros son determinados como resultado de la validación del modelo de biopelícula con la ayuda de datos medidos ²⁷⁸. Esta alternativa es conocida también como modelamiento inverso, en el cual los parámetros del modelo son determinados de tal forma que el comportamiento del modelo se aproxime por el mostrado experimentalmente. Otro método es conocido como evolución diferencial, en el cual los parámetros cinéticos son evaluados con datos reportados en literatura usando bajas velocidades de carga orgánica. El modelo puede no ser válido para procesos que involucren elevadas concentraciones de sustrato ^{279 280}.

El grupo de modelamiento de digestión anaerobia (ADM por su sigla en inglés) de la asociación internacional del agua (IWA por su sigla en inglés) desarrolló un

²⁷⁴ ZEYNALIA, M.E and HAKIM, S. Diffusion Processes Affecting the Performance of Heterogeneous Catalysts: Part 1. En: Defect and Diffusion Forum. Vol.; 319. 2011, p 107-115.

²⁷⁵ CHAKRABORTY, C., CHOWDURY, R., BHATTACHARYA, P. Experimental studies and mathematical modeling of an up-flow biofilm reactor treating mustard oil rich wastewater. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (10). 2011, p. 5596–5601.

²⁷⁶ YUAN, Y., ZHAO, B., ZHOU, S., ZHONG, S., ZHUANG, L. Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells. En: Bioresource. Technology. Vol.; 102 (13). 2011, p. 6887–6891.

²⁷⁷ YANG, Y., SUN, G., GUO, J., XU, M., 2011. Differential biofilms characteristics of shewanella decoloration is microbial fuel cells under open and closed circuit conditions. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (14). 2011, p. 7093–7098.

²⁷⁸ AGARWAL, G.K and GHOSHAL, A.K. Packed bed dynamics during microbial treatment of wastewater: Modelling and simulation. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2008, p. 3765–3773.

²⁷⁹ SATYA, E.J and VENKATESWARLU, Ch. Evaluation of anaerobic biofilm reactor kinetic parameters using ant colony optimization. En: Environmental engineering Science. Vol.; 30 (9). 2013, p. 527-535.

²⁸⁰ SHIVA KUMAR, B and VENKATESWARLU, Ch. Inverse Modeling Approach for Evaluation of Kinetic Parameters of a Biofilm Reactor Using Tabu Search. En: Water Environment Research. Vol., 86 (8). 2014, p. 675-686.

modelo generalizado para la digestión anaerobia, el ADM1 ²⁸¹. En el modelo se incluyen los procesos bioquímicos y físico-químicos. Este modelo maneja alrededor de treinta (30) variables de estado; sin embargo, su complejidad dificulta el análisis cualitativo. El ADM1 fue desarrollado para sistemas en suspensión, en los cuales no se presenta limitación en la transferencia de masa por el movimiento del sustrato desde el seno del líquido a la población microbiana, controlada por la difusión del sustrato dentro de la biopelícula. Por lo tanto, para extender el ADM1 a sistemas de biopelícula, la cinética de utilización de sustrato del sistema celular debe ser reemplazada por un modelo de biopelícula. En el 2004, IWA decidió crear el grupo de modelamiento de biopelícula con el propósito de revisar y analizar los modelos disponibles en la literatura para tratar de proveer a los investigadores una guía que permitiera seleccionar el modelo adecuado para solucionar sus problemas específicos ²⁸². Este grupo estableció tres situaciones problema de referencia para el modelamiento de biopelículas que han sido evaluados por varios autores. La primera situación problema describe monoespecies en la biopelícula en un reactor completamente agitado. En la segunda situación, el transporte de masa del sustrato está influenciado por las condiciones hidrodinámicas del líquido en contacto con la biopelícula. La tercera situación compara la capacidad de los modelos para simular multisustratos y biopelículas con multiespecies ^{283 284 285}.

4.5 ESTRUCTURA DEL MODELO

Los resultados obtenidos en el reactor de película adherida fueron empleados para la validación del modelo estructurado en este capítulo. El reactor se mantuvo a 25

²⁸¹ BATSTONE, D.J.; KELLER, J.; ANGELIDAKI, I.; KALYUZHNYI, S., PAVLOSTATHIS, S.G; ROZZI, A.; SANDERS, W.; SIEGRIST, H.; VAVILIN, V. IWA Task Group on Modeling of Anaerobic Digestion Processes. IWA Publishing, London. 2002.

²⁸² NOGUERA, D.R and MORGENROTH, E. Introduction to the IWA Task Group on Biofilm Modeling. En: Water Science and Technology. Vol.; 49 (11–12). 2004; p.131–136.

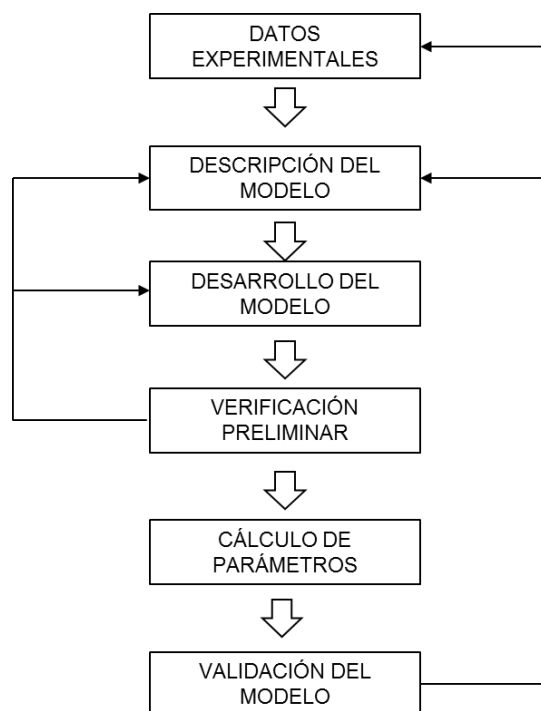
²⁸³ WANNER, O., EBERL, H.J, MORGENROTH, E., NOGUERA, D.R, PICIOREANU, C., RITTMANN, B.E, VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Mathematical modeling of biofilms. 2008. IWA Publishing.

²⁸⁴ BOLTZ. Op. cit.

²⁸⁵ BROCKMANN, D., CAYLET, A., ESCUDIÉ, R., STEYER, J-P, BERNET, N. Biofilm model calibration and microbial diversity study using Monte Carlo simulations. En: Biotechnology Bioengineering. Vol.; 110. 2013, p.1323–1332.

± 2 °C de temperatura, alimentado con efluente del reactor hidrolítico/acidogénico cuyo sustrato era la FO de los RSU, con un TRH de 15 días y velocidad de carga orgánica de 4 kg (DQO/m³·d). A este reactor se le realizó seguimiento al pH, los AGVs, los ST, los SSV, los SV, la DQO, la cantidad y calidad de biogás. La **Figura 46** muestra la metodología utilizada para el desarrollo del modelo matemático.

Figura 46. Metodología de desarrollo del modelo.

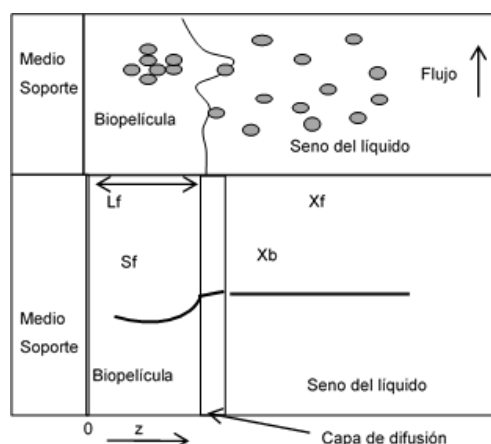


Las variables a validar en el modelo fueron la evolución de la concentración de sustrato (S_b), la evolución de la concentración de biomasa (X_b), el espesor de la biopelícula (L_f), la velocidad de formación del biogás (R_{CH_4}) y el flujo del sustrato en la biopelícula. Los parámetros biocinéticos fueron calculados con base en los resultados al seguimiento del reactor durante la fase de crecimiento de biomasa. La **Figura 47** muestra los perfiles hipotéticos de concentración en el interior de la biopelícula y en el seno de la fase líquida.

4.5.1 Suposiciones del modelo. El reactor de biopelícula fue modelado como un reactor totalmente agitado. Para el desarrollo del modelo matemático se asumieron las siguientes suposiciones de acuerdo con las planteadas por ²⁸⁶ ²⁸⁷ ²⁸⁸ ²⁸⁹ :

- La biopelícula sobre el soporte es homogénea.
- La concentración de sustrato dentro de la biopelícula varía solo en la dirección normal de la superficie de la misma.
- El sustrato es transportado del seno del líquido a la biopelícula por difusión molecular.
- El crecimiento de la biopelícula no afecta el patrón de flujo de líquido en el reactor.
- Las resistencias a la transferencia de masa interna y externa son despreciables.

Figura 47. Estructura y perfiles de concentración hipotéticos en la biopelícula. Tomado de *Mathematical Modeling Biofilms*, 2008.



²⁸⁶ WILLIAMSON, K., MCCARTY, P.L. A model of substrate utilization by bacteria films. En: Journal Water Pollution Control Fed. Vol.; 48. 1976, p. 9-24.

²⁸⁷ SUIDAN, M.T and WANG Y. T. Unified analysis of biofilm kinetics. En: Journal Environmental Engineering. ASCE. Vol.; 111. 1985, p. 634-646.

²⁸⁸ LIN, Y-H. Kinetics of nitrogen and carbon removal in a moving-fixed bed biofilm reactor. En: Applied Mathematical Modelling. Vol.; 32.2008, p. 2360–2377.

²⁸⁹ SARKAR. Op. cit.

La descripción del modelo matemático inicia con el planteamiento de la velocidad de consumo del sustrato en la biopelícula basada en la ley de Fick y sus condiciones límites;

$$\frac{\partial S_f}{\partial t} = D_f \frac{\partial^2 S_f}{\partial z_f^2} - \frac{k S_f}{K_s + S_f} * X_f \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$C.I: S_f|_{t=0} = S_{b0} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$C.F: \left. \frac{\partial S_f}{\partial z} \right|_{z=0} = 0 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$CL : K (S_b - S_s) = D_f \left. \frac{\partial S_f}{\partial z_f} \right|_{z=L_f} \quad t > t_0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

S_f : Concentración de sustrato limitante en la biopelícula (kg/m³)

D_f : Coeficiente de difusión de sustrato limitante en la biopelícula (m²/d)

k : Velocidad máxima de consumo de sustrato limitante por la biopelícula (1/d)

K_s : Coeficiente de velocidad media del sustrato limitante por la biopelícula (kg/m³)

X_f : Densidad de la biopelícula (kg/m³)

Z_f : Distancia en la biopelícula (m)

4.5.2 Balance de sustrato y biomasa suspendida en el reactor. El reactor de biopelícula de lecho fijo, puede ser asumido como un reactor de biopelícula totalmente mezclado. Toda la biomasa suspendida en la interfase líquido/biopelícula se encuentra expuesta a la misma concentración de sustrato. El balance de masa del sustrato y de la biomasa suspendida en el reactor de biopelícula puede ser descrita de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Balance de masa del sustrato limitante:

$$\frac{dS_b}{dt} = \frac{Q}{V\varepsilon} (S_{b0} - S_b) - K_f * (S_b - S_s) * \frac{A}{V\varepsilon} - \frac{kS_b}{K_s + S_b} * X_b \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$C.I: S_b|_{t=0} = S_{b0} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Balance de masa de biomasa suspendida en la biopelícula:

$$\frac{dX_b}{dt} = \left(\frac{Y * k * S_b}{K_s + S_b} - b - \frac{Q}{V\varepsilon} \right) * X_b + \frac{A}{V\varepsilon} b_s L_f X_f \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$C.I: X_b|_{t=0} = 0 \quad (\text{Ecuación 9})$$

S_b : Concentración de sustrato limitante en el seno del líquido (kg/m^3)

S_{b0} : Concentración de sustrato en el alimento (kg/m^3)

S_s : Concentración de sustrato en la interfase líquido/biopelícula (kg/m^3)

X_b : Concentración de biomasa suspendida en el seno del líquido (kg/m^3)

Q : Velocidad de flujo del alimento (m^3/d)

V : Volumen efectivo del reactor (m^3)

A : Área superficial total del medio de soporte (m^2)

ε : Porosidad del reactor

4.5.3 Crecimiento de la biopelícula. La biopelícula utiliza el sustrato como fuente de carbono para la biosíntesis y la respiración. La biomasa en la biopelícula puede aumentar o disminuir con el tiempo hasta que encuentre un balance entre el crecimiento, desprendimiento y pérdida de la biopelícula. La densidad de la biopelícula se asume constante, por tanto, el volumen de la biopelícula y el espesor

debe aumentar con el tiempo de acuerdo con su crecimiento. La velocidad de crecimiento de la biopelícula puede ser expresada como:

$$\frac{dL_f}{dt} = \int_0^{L_f} \left(\frac{Y * k * S_f}{K_s + S_f} - b - b_s \right) dz_f \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$C.I: \quad L_f|_{t=0} = L_{f0} \quad (\text{Ecuación 11})$$

L_f : Espesor de biopelícula (m)

Y : Coeficiente de rendimiento de la biomasa (kg_x/kg_s)

b : Coeficiente de desprendimiento de biomasa (1/d)

b_s : Coeficiente de pérdida por esfuerzo (1/d)

4.5.4 Parámetros cinéticos. Los parámetros cinéticos fueron calculados tomando los resultados experimentales de la etapa de crecimiento de biomasa en el biorreactor. El coeficiente de rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) se asumió constante en el intervalo de concentración de sustrato en fase de crecimiento, puede ser determinado por:

$$Y_{x/s} = - \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde ΔX es el aumento en la concentración de biomasa y ΔS es el cambio en la concentración de sustrato. La pendiente de la linealización de la Figura del incremento en la concentración de biomasa versus la disminución en la concentración de sustrato en un intervalo de tiempo es asumido como el coeficiente de rendimiento.

El coeficiente de desprendimiento (b) puede ser calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$b = -\frac{\ln(X_2/X_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde t_1 y t_2 son el tiempo inicial y final; X_1 y X_2 son las concentraciones de biomasa inicial y final, respectivamente.

4.5.4.1 Determinación de densidad de la biopelícula. La biopelícula formada sobre los soportes fue usada para determinar la densidad de la biopelícula (X_i). Al inicio de la experimentación, los soportes fueron pesados antes y después de ser introducidos en agua estéril para determinar el volumen de biopelícula. Al finalizar esta etapa experimental, los soportes fueron nuevamente pesados. La diferencia entre el peso final e inicial fue tomada como masa de biopelícula. La densidad de biopelícula obtenida fue de 0.00147 (kg SSV/m³).

4.5.4.2 Coeficiente de transferencia de masa. Los coeficientes de difusión molecular en agua D_w y en biopelícula D_f para el sustrato pueden ser calculados de acuerdo con la ecuación empírica formulada por Wilke and Chang ²⁹⁰ y mencionada por otros autores ^{291 292 293}. La ecuación se describe como:

²⁹⁰ WILKE, C.E y CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. En: AIChE Journal. Vol.1. 1955, p. 264-270.

²⁹¹ HAYDUK, W and MINHAS, B. S. Correlations for prediction of molecular diffusivities in liquids. En: The Canadian Journal of Chemical Engineering. Vol.; 60 (2). 1982, p. 295–299.

²⁹² LEAHY-DIOS, A. and FIROOZABADI, A. Unified Model for Non ideal Multicomponent Molecular Diffusion Coefficients. En: AIChE Journal. Vol.; 53 (11). 2007, p. 2932-2939.

²⁹³ LIU, X., SCHNELL, S.K., SIMON, J.M., KRÜGER, P., BEDEAUX, D., KJELSTRUP, S., BARDOW, A. Diffusion Coefficients from Molecular Dynamics Simulations in Binary and Ternary Mixtures. En: International Journal of Thermophysics. Vol.; 34 (7). 2013, p. 1169–1196.

$$D_w = 7.4 \times 10^{-8} \frac{(\phi_b M_b)^{0.5} T}{\mu_b V_a^{0.6}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde ϕ_b es un parámetro de asociación, 2 para el agua; M_b es el peso molecular del solvente, 18 g/mol para el agua, T es la temperatura absoluta en K; μ_b la viscosidad absoluta de la solución en centipoises, 0.9002 cp para agua a 25 °C; y V_a es el volumen molar del soluto como líquido en su punto de ebullición normal. El volumen molar del soluto puede ser calculado del volumen atómico individual en unidades de cc/mol.

Los coeficientes de difusión en la biopelícula son más pequeños comparados con los de la fase líquida debido a la resistencia difusional al transporte del sustrato ²⁹⁴. El coeficiente de difusión de la biopelícula puede ser obtenido multiplicando el coeficiente de difusión en el seno del líquido por un factor de 0.8 para corregir la resistencia difusional adicional en la biopelícula.

$$\frac{D_f}{D_w} = 0.8 \quad (\text{Ecuación 15})$$

De acuerdo con lo anterior, el coeficiente de difusión calculado (D_f) es de 0.82 cm²/d.

El coeficiente de transferencia de la biopelícula (k_f) fue obtenido a partir de la ecuación empírica para reactor de lecho empacado ^{295 296}.

$$k_f = 1.17 v_s (R)^{-0.42} (S)^{-0.67} \quad (\text{Ecuación 16})$$

²⁹⁴ WANNER. Op. cit:

²⁹⁵ CUSLER, E.L. Diffusion: Mass Transfer in fluid systems, Second edition. Cambridge University Press, New York, 1997.

²⁹⁶ FOURNIER, R.L. Basic transport phenomena in biomedical engineering. Third edition. CRC press. 2012, p. 196.

v_s es la velocidad de flujo superficial (m/d)

R es el número de Reynolds = $d_p v_s / \nu$

S es el número de Schmidt = ν / D_w

d_p es el diámetro del material de empaque (m)

ν es la viscosidad cinemática (m^2/d)

La pérdida de biopelícula por esfuerzo de corte puede ser descrita de acuerdo con^{297 298 299}; como:

$$r_s = b_s X_f A L_f \quad (\text{Ecuación 17})$$

Donde b_s es el coeficiente de pérdida por esfuerzo de corte (1/d) y puede calcularse mediante:

$$b_s = 2.29 \times 10^{-6} \left[\frac{V_w \mu (1 - \varepsilon)^3}{d_p^2 \varepsilon^3 a} \right]^{0.58} \quad (\text{Ecuación 18})$$

V_w es la viscosidad del agua ($kg_s/m \cdot d$)

μ Velocidad superficial (m/d)

ε Porosidad del soporte

d_p Diámetro del soporte (m)

a es el área superficial específica del biorreactor ($1/m^2$)

²⁹⁷ SPEITEL, G.E and DiGIANO, F.A. Biofilm shearing under dynamic conditions. En: Journal Environmental Engineering- ASCE. Vol.; 113. 1987. New York.

²⁹⁸ WUERTZ, S., BISHOP, P.L., WILDERER, P.A. Biofilm in Wastewater Treatment: An interdisciplinary approach. IWA Publishing. 2008, p. 270.

²⁹⁹ WAGNER. Op. cit.

4.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la resolución del modelo matemático planteado, inicialmente se discretizó la ecuación del balance de masa en la biopelícula utilizando aproximación por diferencias centrales, para un punto i en el interior de la biopelícula. En el caso de la ecuación para el cálculo del espesor de biopelícula se utilizó la regla de Bode ($n=4$). El modelo matemático está formado por 6 ecuaciones diferenciales resueltas con ayuda del software POLYMATH 5.1 utilizando el método STIFF (rígido). Una forma muy generalizada de describir los problemas stiff, es que son aquellos donde los integradores numéricos basados en métodos explícitos no funcionan satisfactoriamente.

Los parámetros cinéticos obtenidos para el reactor son mostrados en la **Tabla 11**. Estos parámetros cinéticos fueron calculados con base a datos experimentales, las ecuaciones 10 a la 16 mencionadas anteriormente y algunos datos de literatura. En los Anexo A y B se presenta la metodología utilizada para el cálculo de los coeficientes de rendimiento (Y), coeficientes de desprendimiento (b), Coeficiente de velocidad medio Monod (K_s), Velocidad máxima de utilización Monod (k).

Los valores calculados para la velocidad máxima de utilización (k) y coeficiente de velocidad media (K_s) fueron de 5.8 (kg DQO/Kg SSV*d) y 0.83 (kg DQO/m³) para el reactor. Los valores de k son similares, en orden de magnitud a los reportados por Hsien and Lin ³⁰⁰, Lin and Hsien ³⁰¹ para la degradación de compuestos orgánicos en reactores de biopelícula. A su vez, Nava ³⁰² encontró valores de K_s del mismo orden de magnitud para el tratamiento de aguas residuales de refinerías de petróleo en reactor de película adherida; estos valores fueron mayores que la concentración de sustrato en el sistema, con lo cual se demostró la baja afinidad de los

³⁰⁰ HSIEN. Op. cit.

³⁰¹ LIN. Op. cit.

³⁰² NAVA, L.M, GASPERIN, R., y DURAN, A. Comparación de un reactor de biomasa suspendida y un reactor de biomasa adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías del petróleo. En: Revista Interamericana de contaminación ambiental. Vol.; (30). 2014, p. 101-112.

microorganismos por el sustrato. Caso contrario sucede con los valores obtenidos en este estudio donde los valores de K_s son inferiores a la concentración de sustrato.

Tabla 11. *Parámetros cinéticos y del reactor utilizados en el modelo.*

Parámetro	Símbolo	Unidades	Reactor Ladrillo
Concentración de alimento	S_{b0}	kg/m ³	60
Coeficiente rendimiento	Y	kg SSV/kg DQO	0.0234
Velocidad máxima utilización Monod	k	kg DQO/kg SSV.d	5.8
Coeficiente velocidad medio Monod	K_s	kg DQO/ m ³	0.83
Coeficiente de decaimiento	b	d ⁻¹	0.0157
Coeficiente de pérdida por esfuerzo de corte	b_s	d ⁻¹	0.095
Coeficiente de difusión en la biopelícula	D_f	m ² /d	0.000082
Coeficiente de transferencia de sustrato a la biopelícula	K_f	m/d	0.25
Densidad de biopelícula	X_f	kg SSV/ m ³	0.00147
Concentración inicial de biomasa suspendida	X_{b0}	kg SSV/ m ³	0.3
Espesor inicial de la Biopelícula	L_{f0}	m	0.00005
Porosidad del reactor	ε		0.7
Volumen efectivo del reactor	V	m ³	1500
Velocidad de flujo	Q	m ³ /d	100
Área superficial total del soporte	A	m ²	235.62

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el modelo y su comparación con los resultados experimentales. En el Anexo C se muestran los resultados numéricos obtenidos con el modelo.

En la **Figura 48** que muestra la variación de la concentración de sustrato en el efluente del reactor; las curvas del modelo y de los datos experimentales mostraron la misma tendencia. El análisis ANOVA (Statgraphics Centurion XV, 2013) no mostró diferencia estadística significativa ($P \geq 0.5$) entre los resultados de las dos curvas (**Figura 49**).

La curva de S_b se puede dividir en tres partes. En la primera etapa de la curva que va hasta los 25 días de operación, la concentración de sustrato se incrementó hasta alcanzar un valor de 31 (kg/m^3). En este período de tiempo, no se presentó una degradación significativa del sustrato por parte de los microorganismos presentes. En la segunda etapa del día 25 hasta el día 80, la concentración de sustrato disminuyó drásticamente como resultado de la actividad de los microorganismos que conformaban la biopelícula. En la tercera parte de la curva de los 80 días en adelante, la concentración de sustrato alcanzó un estado estacionario alrededor de 10 (kg/m^3). La eficiencia de remoción del sustrato fue de 83 %.

Figura 48. Comparación resultados del modelo y experimental de la concentración de sustrato en el seno del líquido (S_b) para el reactor con LADRILLO como soporte. Factor de correlación de 0.9401.

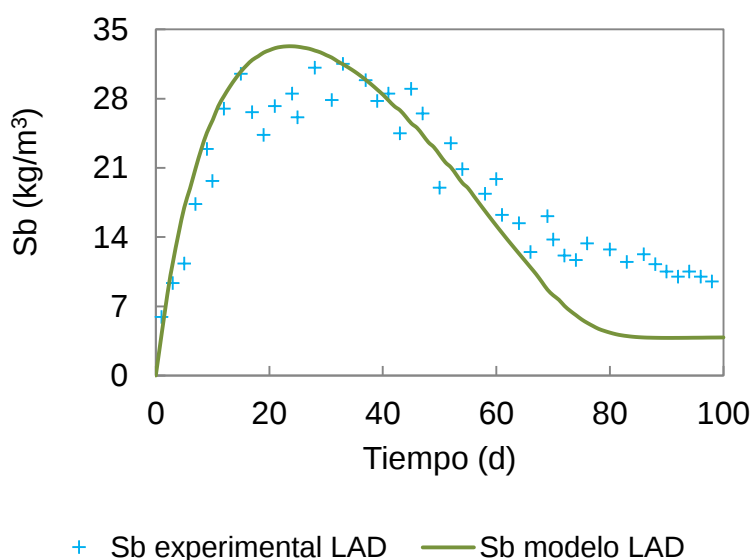
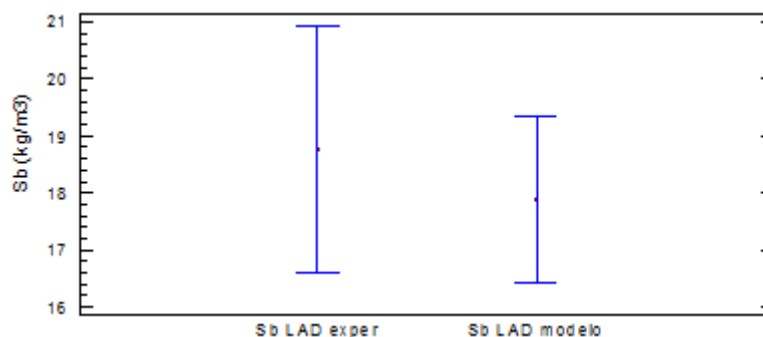


Figura 49. Comparación análisis ANOVA de datos experimentales y modelo para S_b en reactor con ladrillo como soporte.



En el estado estacionario, los datos experimentales son superiores a los del modelo, este comportamiento puede ser el resultado de que las bacterias degradadoras del sustrato crecieron lo suficiente para formar biopelícula y que el efecto del esfuerzo de corte fue más significativo a medida que la biopelícula aumentó su espesor. El aumento en el esfuerzo de corte en la biopelícula dio como resultado un incremento en la biomasa suspendida. La biomasa suspendida se descompone y libera productos microbianos solubles los cuales pueden aumentar ligeramente la concentración de sustrato en el efluente ^{303 304}.

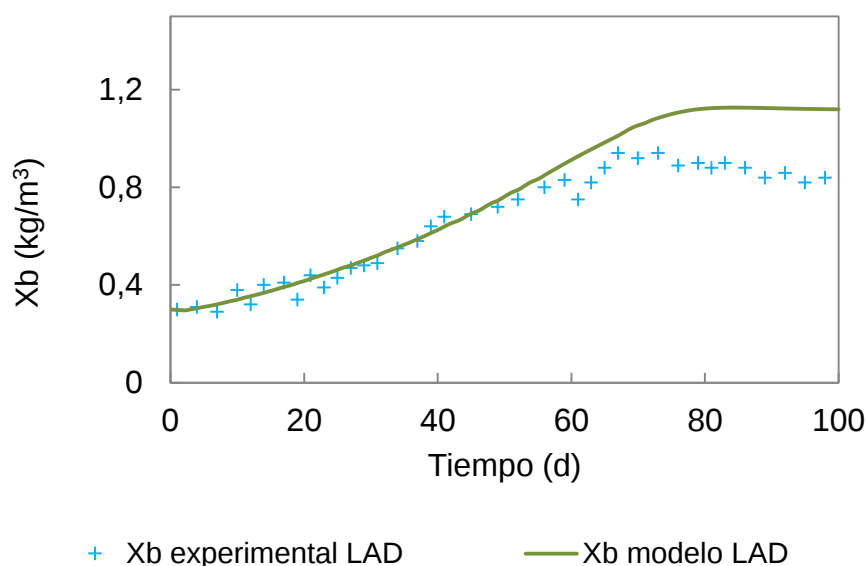
La concentración de biomasa suspendida X_b de acuerdo con la **Figura 50** mostró la misma tendencia en el modelo y en datos experimentales, aunque al alcanzar el estado estacionario en el caso experimental, las concentraciones son menores comparadas con las del modelo. El análisis ANOVA (Statgraphics Centurion XV, 2013) mostró diferencia estadística significativa ($P < 0.5$) entre los resultados experimentales y el (**Figura 51**). Los datos experimentales mostraron una elevada utilización del sustrato los primeros setenta días de experimentación. En el caso del modelo, X_b alcanzó un estado estacionario a una concentración de $1.12 \text{ (kg/m}^3\text{)}$. En

³⁰³ QI, P.S., WANG, W.B., QI, Z. Effect of Shear Stress on Biofilm Morphological Characteristics and the Secretion of Extracellular Polymeric Substances. En: 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. 2008, p. 3438-3441.

³⁰⁴ MOLOBELA, I.T., and ILUNGA, F.M. Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. En: Annals of Microbiology. Vol.; 62 (2).2012, p. 461–467.

el caso de los datos experimentales, X_b alcanzó una máxima concentración de 0.92 (kg/m^3) y luego disminuyó hasta alcanzar un estado estacionario en 0.84 (kg/m^3). De acuerdo con estos resultados, tanto en el modelo como en los datos experimentales, la concentración de biomasa suspendida se incrementó con el aporte de la biomasa por esfuerzo de corte ($b_s=0.095 \text{ d}^{-1}$), que para los datos experimentales, debió ser de mayor magnitud para lograr la máxima concentración dada por el modelo.

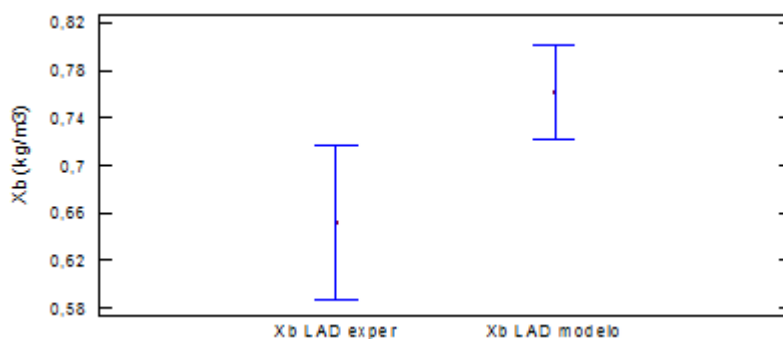
Figura 50. Comparación resultados del modelo y experimental de la concentración de biomasa suspendida en el seno del líquido (X_b) para el reactor de película adherida. Factor de correlación de 0.9695.



En el modelo, se observó que el coeficiente de decaimiento (b) no mostró influencia en X_b al alcanzar el estado estacionario, ya que esta concentración no disminuyó. El comportamiento de X_b en los datos experimentales antes de alcanzar el estado estacionario mostró una disminución que puede ser atribuida en parte a la influencia del coeficiente de decaimiento, b (0.0157 kg/m^3). X_b alcanzó una concentración en estado estacionario de 1.12 (kg/m^3) y los datos experimentales 0.84 (kg/m^3). De

acuerdo con estos datos, se observa que en los resultados experimentales, el desprendimiento de biomasa activa fue menor comparada con la contribución de ésta al modelo. En el reactor pudo presentarse muerte de células en la biopelícula que al desprenderse provocaron disminución en X_b .

Figura 51. Comparación análisis ANOVA de datos experimentales y modelo para X_b en reactor de película adherida.



El espesor de la biopelícula predicho por el modelo aumentó hasta alcanzar un valor estable de 14 μm (**Figura 54**). De acuerdo con estos resultados, en la etapa inicial la remoción de sustrato es baja debido a la formación incipiente de la biopelícula y la remoción estaría siendo realizada por los microorganismos suspendidos provenientes del inóculo utilizado. La biomasa continuó aumentando hasta desarrollar la biopelícula. La etapa inicial de formación de la biopelícula es un proceso muy sensible, inestable y poco eficiente para la remoción orgánica que se relaciona con el hecho de la compleja relación existente entre los microorganismos acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos.

La concentración de biomasa suspendida tanto en el modelo como en los datos experimentales es menor al valor de 3.2 kg/m^3 reportada por Leyva-Díaz ³⁰⁵ en el modelamiento de tratamiento de agua residual en un reactor de lecho.

La **Figura 52** muestra la producción de metano en el reactor. El análisis ANOVA (Statgraphics Centurion XV, 2013) mostró diferencia estadística significativa ($P < 0.5$) entre los resultados experimentales y los del modelo (**Figura 53**). El modelo alcanzó un valor máximo en el estado estacionario de $0.56 \text{ (m}^3 \text{ CH}_4/\text{m}^3 \text{ reactor}\cdot\text{d)}$ y los datos experimentales alcanzaron $0.42 \text{ (m}^3 \text{ CH}_4/\text{m}^3 \text{ reactor}\cdot\text{d)}$. Los valores de metano obtenidos son superiores en el caso el modelo comparado con los experimentales. Aunque en el modelo se incluyeron coeficientes de desprendimiento, no se tuvieron en cuenta otros factores; tales como, inhibición por pH, por sustrato o por metanogénesis que afectan la producción de metano. La presencia de alguna de estas inhibiciones durante el desarrollo experimental pudo haber influido en la disminución de la producción de metano en el sistema ^{306 307}.

La producción de metano fue baja al inicio de la operación del reactor debido a que los microorganismos metanogénicos no se encontraban activos y la mayor parte del metabolismo de éstos se utilizó en la producción de biomasa. Este valor aumentó hasta alcanzar un valor estable que coincide con el establecimiento de una biopelícula con un espesor que permite la simbiosis de los diferentes microorganismos presentes y la transformación del sustrato en metano. Esta diferencia entre los valores del modelo y los datos experimentales pudo deberse a que las velocidades de reacción observadas normalmente son menores que las velocidades predichas por la cinética de reacción ya que la concentración de sustrato disponible a los microorganismos es menor a la concentración de sustrato

³⁰⁵ LEYVA-DÍAZ, J.C., CALDERÓN, K., RODRÍGUEZ, F.A, GONZÁLEZ-LÓPEZ, J., HONTORIA, E. POYATOS, J.M. Comparative kinetic study between moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor and membrane bioreactor systems and their influence on organic matter and nutrients removal. En: Biochemical Engineering Journal. Vol.; 77. 2013, p. 28– 40.

³⁰⁶ CHEN, Y., CHENG, J.J., CREAMER, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2008, p. 4044–4064.

³⁰⁷ ZHAI, N.; ZHANG, T.; YIN, D.; YANG, G.; WANG, X.; REN, G.; FENG, Y. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. En: Waste Management. Vol.; 38. 2015, p. 126–131.

presente en el seno del líquido, como resultado del control ejercido por la difusión molecular en la penetración del sustrato al interior de la biopelícula ³⁰⁸

Figura 52. Comparación resultados del modelo y experimental de la formación de metano (CH_4) para el reactor de película adherida. Factor de correlación de 0.7801.

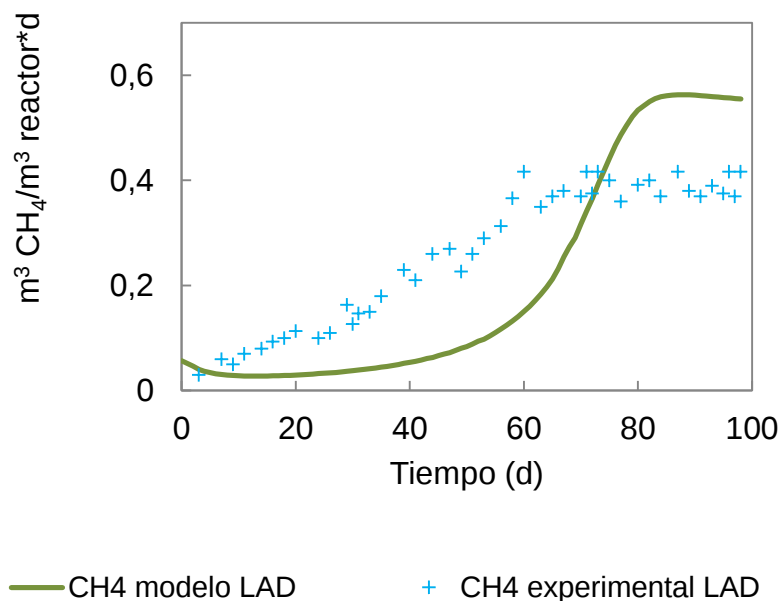
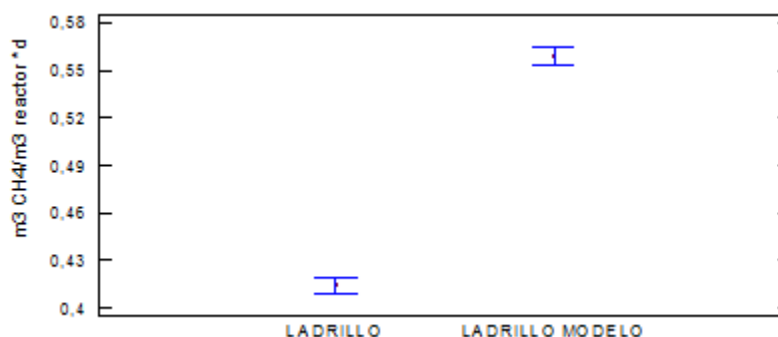


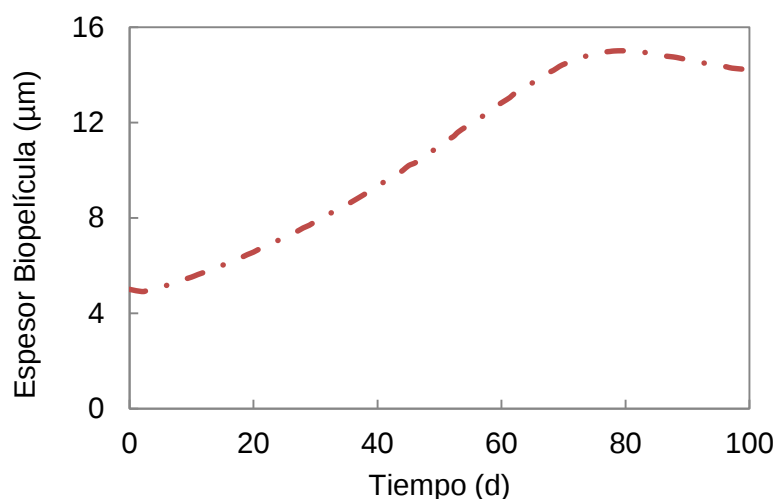
Figura 53. Comparación análisis ANOVA de datos experimentales y modelo para la formación de metano (CH_4) en el reactor de película adherida



³⁰⁸ SUN, J., HU, Sh., SHARMA, K-J., NI, B-J., YUAN, Zh. Stratified Microbial Structure and Activity in Sulfide- and Methane- Producing Anaerobic Sewer Biofilms. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 80 (22). 2014, p. 7042 -7052.

El desarrollo de la biopelícula de acuerdo con el modelo (**Figura 54**) inició su formación en los primeros cinco días. La biopelícula alcanzó su máximo valor de 15 μm alrededor de los ochenta días de operación y luego presentó una ligera disminución a 14.2 μm . Esta leve disminución en el espesor de la biopelícula pudo ser consecuencia del desprendimiento de biomasa activa, tanto por el esfuerzo de corte como por el decaimiento. Esta tendencia coincide con la disminución en la curva de biomasa suspendida de la **Figura 50**.

Figura 54. Resultados del modelo de espesor de biopelícula, L_f para el reactor.



De acuerdo con Rittmann and McCarty ³⁰⁹, el espesor de la biopelícula está determinado por el flujo del sustrato en el interior de la misma desde el seno del líquido y las velocidades de crecimiento y desprendimiento de las bacterias presentes en el biopelícula. De esta forma, la masa en la biopelícula es mayor cuando la concentración de sustrato en el seno del líquido es elevada, lo cual concuerda con los resultados del modelo propuesto. Además, la biopelícula es afectada en forma negativa por elevados esfuerzos que aumentan el desprendimiento de la misma ³¹⁰.

³⁰⁹ RITTMANN, B. E. and McCARTY, P. L. Environmental Biotechnology: Principles and Applications. Mc-Graw Hill, New York, NY. 2001.

³¹⁰ ANDALIB, M., HAFEZ, H., ELBESHISHY, E., NAKHLA, N., ZHU, J. Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR). Bioresource Technology. Vol.; 121. 2012, p. 411-418.

Los valores de espesor en la biopelícula obtenidos por el modelo estuvieron entre 5 a 14 μm , los cuales se encuentran dentro de intervalos encontrados por otros autores. Langer ³¹¹ realizó mediciones de espesor de biopelícula en reactores con soporte de polipropileno para el tratamiento de aguas residuales con cargas orgánicas de 45 ($\text{kg SV}/\text{m}^3$) y 15 ($\text{kg SV}/\text{m}^3$). El espesor de las muestras del reactor con carga orgánica elevada varió de 5 a 160 μm , mientras que para la carga orgánica baja se observaron microcolonias en vez de biopelícula.

Con relación al modelamiento del flujo de sustrato en el interior de la biopelícula (**Figura 55**); en los primeros 20 días de operación no se presentó flujo de sustrato en el interior de la biopelícula. En este periodo de tiempo, el crecimiento de la biopelícula fue bajo. Al finalizar este periodo inicial, el espesor de la biopelícula inició su crecimiento con el consumo del sustrato. A medida que la diferencia de concentración de sustrato entre el seno del líquido y la interfase líquido/biopelícula aumentaba, favorecía el flujo en el interior de la biopelícula, debido a la actividad metabólica de los microorganismos. En el reactor, luego de alcanzar el máximo valor de 0.0019 ($\text{kg}/\text{m}^2\cdot\text{d}$) a los sesenta y cinco días de operación, el flujo se mantuvo constante, debido a que la concentración de sustrato en el efluente continuó disminuyendo hasta alcanzar un estado estacionario.

En la **Tabla 12** se resumen los valores obtenidos en el modelo y datos experimentales de las variables X_b , L_f , RCH_4 y el flujo en el interior de la película, así como la desviación estándar mostrada.

³¹¹ LANGER. Op. cit.

Figura 55. Resultados del modelo del flujo de sustrato en la biopelícula para el reactor.

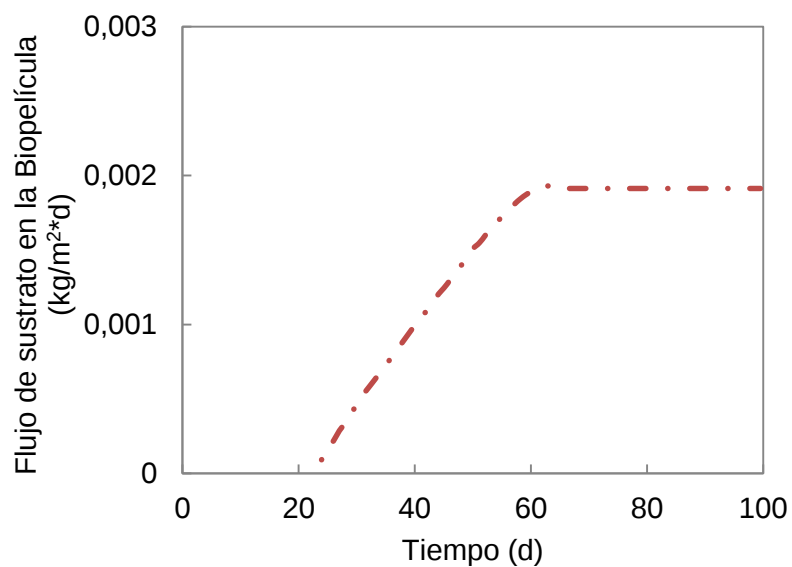


Tabla 12. Resultado de los parámetros evaluados en el modelo para el reactor de película adherida.

PARÁMETRO	UNIDADES	VALOR EXPERIMENTA L	VALOR MODELO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR MODELO-DATOS EXPERIMENTALES
S_b	kg/m ³	10	3.8	3.86
X_b	kg/m ³	0.84	1.12	0.28
L_f	μm	-	14.2	-
RCH_4	m ³ CH ₄ /m ³ reactor	0.42	0.56	0.19
Flujo	kg/m ³	-	0.0019	-

5 CONCLUSIONES

En la etapa de selección del inóculo se observó que el reactor que contenía la mezcla de lodos como inóculo fue el de mayor producción específica de metano ($0.45 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg SV}_{\text{adicionado} \cdot \text{d}}$) a $25^\circ \text{C} \pm 2$ y $1.33 (\text{m}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg SV}_{\text{adicionado} \cdot \text{d}})$ $37^\circ \text{C} \pm 2$. Por esta razón, se seleccionó a la mezcla de lodos como el inóculo para llevar a cabo el desarrollo de esta investigación.

Los mayores rendimientos en la producción de metano para los residuos de yuca, papa, plátano y hortalizas fueron obtenidos con una RIS de $2 \text{ gSV}_{\text{inóculo}} / \text{gSV}_{\text{sustrato}}$ y $37^\circ \text{C} \pm 2$. Los reactores no necesitaron la adición de micronutrientes debido a que los sustratos tienen las concentraciones necesarias que favorecer el desarrollo bacteriano y facilitan la velocidad de descomposición de la materia orgánica.

Del mismo modo, los mayores rendimientos en producción de metano fueron para los reactores con residuos de papa y plátano a 37°C con $0.235 \text{ m}^3 / \text{kg SV}_{\text{adicionado}}$. Asimismo, a 25°C , el reactor con residuo de plátano produjo $0.217 \text{ m}^3 / \text{kg SV}_{\text{adicionado}}$ y el de residuo de papa $0.185 (\text{m}^3 / \text{kg SV}_{\text{adicionado}})$. La obtención de mayores producciones de metano para los residuos de papa y plátano se debe principalmente a su elevado contenido de carbohidratos y proteínas que influyen positivamente en su Digestión Anaerobia.

Los rendimientos de producción de metano más bajos se presentaron con RIS de $0.4 (\text{g SV} / \text{gSV})$, debido principalmente a la baja transferencia de masa presentada y a la inhibición dada por las elevadas concentraciones de AGVs en estos reactores.

De acuerdo con los resultados de la primera etapa de experimentación se encontró que el biorreactor con el soporte de ladrillo cerámico fue el que alcanzó una mayor eficiencia en la remoción de DQO, seguido por el reactor con tusa de mazorca y por último los reactores con espuma de poliuretano y *luffa cilíndrica*. Sin embargo, la diferencia en el porcentaje de remoción no es significativa. Por lo tanto, se puede

asumir que de acuerdo con la remoción de DQO, estos dos soportes (espuma de poliuretano y *luffa cilíndrica*) pueden ser utilizados como soportes para biorreactores anaerobios de biopelícula.

La producción de biogás observada en los cuatro biorreactores con glucosa como sustrato fue de 0.232 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$) en el reactor en el que se utilizó ladrillo cerámico como soporte, seguido por la tusa de mazorca con 0.211 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$) y la espuma de poliuretano 0.154 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$), por último la *luffa cilíndrica* con 0.111 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$).

En la segunda etapa de experimentación con sustrato real y ladrillo cerámico como soporte se observó una máxima producción de metano de 0.27 ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg DQO}_{\text{removido}}/\text{d}$). El porcentaje de metano presente en el biogás estuvo entre el 40 – 60 %, dióxido de carbono entre 25 – 45 % y trazas de ácido sulfhídrico.

En el conteo de grupos tróficos para la selección del soporte se observó mayor presencia de las BFG, BFL y BSRE. Las arqueas presentaron menores órdenes de magnitud. Los reactores con Tusa de mazorca y Ladrillo cerámico mostraron la mayor presencia de metanógenos en los reactores con glucosa como sustrato.

Las poblaciones de metanógenos en el reactor de película adherida con ladrillo cerámico como soporte presentaron órdenes de magnitud entre 10^4 y 10^7 , valores inferiores a los reportados en literatura.

En la identificación de los microorganismos metanogénicos se observó la presencia de metanógenos acetoclásticos pertenecientes al género *Methanotrix sp.* y *Methanosarcina sp.* en el reactor de biopelícula, los cuales utilizan el acetato como principal ruta metabólica para la producción de metano. Por otro lado, también se identificó la presencia de población metanogénica hidrogenofílica (*Methanococcus sp.* y *Methanobacterium sp.*) que utilizan el formiato para la producción de metano.

En el modelo matemático propuesto, los valores obtenidos para la máxima utilización (k) y el coeficiente de velocidad media (K_s) resultaron comparables

(mismo orden de magnitud) con los obtenidos por otros investigadores que utilizaron reactores de biopelícula.

El modelo matemático fue validado por los resultados en el caso de la concentración de sustrato (S_b) para el reactor utilizando ladrillo como soporte de inmovilización celular.

Las predicciones del modelo con relación a la concentración de biomasa activa y la producción de metano presentan tendencia similar a la de los resultados experimentales con una variación en los valores mostrados en el estado estacionario.

De acuerdo con el modelo, el espesor de la biopelícula en la estabilización fue de $14\ \mu\text{m}$. De igual forma, el flujo en el interior de la biopelícula fue de $0.0019\ (\text{kg}/\text{m}^2\cdot\text{d})$.

6. RECOMENDACIONES

En este trabajo de investigación se evaluó el funcionamiento en un reactor de película adherida para el tratamiento del efluente de un reactor hidrolítico/acidogénico. Los resultados experimentales mostraron una baja producción de metano en el reactor metanogénico de película adherida como consecuencia de la baja actividad de los microorganismos presentes en los sistemas. El escalado de estos sistemas de película en el tratamiento de la FO de RSU adherida a nivel industrial es complejo debido a la elevada DQO de estos residuos. Del mismo modo, en la implementación de este sistema de dos fases se hace necesario una etapa intermedia que permita el filtrado del efluente de la primera fase para evitar la elevada presencia de sólidos que lleguen a colmatar la superficie de los soportes en el reactor metanogénico.

Las recomendaciones basadas en los resultados obtenidos son:

- Realizar ajuste al modelo matemático, en el que se incluyan otras variables que permitan obtener una mayor información de la formación de la biopelícula.
- Realizar caracterización microbiológica con técnicas avanzadas como microscopia electrónica, FISH, finger print que ayuden a determinar la influencia de las condiciones operacionales sobre la formación de la biopelícula y realizar un seguimiento a la formación de la misma.

7. BIBLIOGRAFÍA

ABBASI, T., ABBASI, S.A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol.; 16 (3). 2012, p. 1696–1708.

ABU-DAHRIEH, J., OROZCO, A.; GROOM, E., ROONEY, D. Batch and continuous biogas production from grass silage liquor. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 10922–10928.

ADU-GYAMFI, N., RAVELLA, S.R., HOBBS, P.J. Optimizing anaerobic digestion by selection of the immobilizing surface for enhanced methane production. En: Bioresource Technology. Vol.; 120. 2012; p. 248–255.

AGARWAL, G.K and GHOSHAL, A.K. Packed bed dynamics during microbial treatment of wastewater: Modelling and simulation. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2008, p. 3765–3773.

ALVAREZ, J.A; OTERO, L.; LEMA, J.M. A methodology for optimizing feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. En: Bioresource Technology. Vol.; 101. 2010; p. 1153-1158.

ALZATE, M.E., MUNOZ, R., ROGALLA, F., FDZ-POLANCO, F., PREZ-ELVIRA, S.I. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. En: Bioresource Technology. Vol.; 123. 2012, p. 488–494.

AMANI, T.; NOSRATI, M.; AND SREEKRISHNAN, T.R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. En: Environmental Rev. Vol.; 18. 2010: p. 255-278.

AMANI, T.; NOSRATI, M.; AND SREEKRISHNAN, T.R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. En: Environmental Rev. Vol.; 18. 2010, p. 255-278.

AMON, T., AMON, B., KRYVORUCHKO, V., ZOLLITSCH, W., MAYER, K., GRUBER, L. Biogas production from maize and dairy cattle manure - Influence of biomass composition on the methane yield. En: Agriculture, Ecosystems and Environment. Vol.; 118. 2007; p. 173–182.

ANDALIB, M., HAFEZ, H., ELBESHBISHY, E., NAKHLA, N., ZHU, J. Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR). Bioresource Technology. Vol.; 121. 2012, p. 411-418.

ANGELIDAKI, I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., CAMPOS, J.L., GUWY, A.J. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. En: Water Science Technology. Vol.; 59. 2009, p. 927–934.

ANGELIDAKI, I., KARAKASSHEV, D., BATSTONE, D., PLUGGE, C., STAMS, A. Biomethanation and its potential. En: *Methods in enzymology*. Vol.; 494. 2011; p. 327-351.

ANGELONIDI, E AND SMITH, S.R. A comparison of wet and dry anaerobic digestion processes for the treatment of municipal solid waste and food waste. En: *Water and Environment Journal*. Vol.; 29. 2015, p. 549–557.

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

AQUINO, S., CHERNICHARO, C., FORESTI, E., FLORENCIO DOS SANTOS, M. and MONTEGGIA, L. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) En *Lodos Anaeróbios*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol.; 12 (2). 2007.

ARAFAT, H., JIJAKLI, K., AHSAN, A. Environmental performance and energy recovery potential of five processes for municipal solid waste treatment. En: *Journal of cleaner production*. 2013; p. 1-8.

ARENAS, L., ESCALANTE, H., COMBARIZA, M. Estudio comparativo de la etapa metanogénica de la digestión anaerobia para el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos municipales de frutas y verduras. En: *Revista ION*. Vol.; 25(1).2012; p.89-96.

ASLANZADEH, S., RAJENDRAN, K., TAHERZADEH, M.J. A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol.; 95.2014; p. 181-188.

AYMERICH, E., ESTEBAN-GUTIÉRREZ, M., SANCHO, L. Analysis of the stability of high-solids anaerobic digestion of agro-industrial waste and sewage sludge. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 144. 2013; p. 107–114.

BALAGUER, M. D., VICENT, M. T., PARIS, J. M. A. Comparison of different support materials in anaerobic fluidized bed reactors for the treatment of vinasses. En: *Environmental Technology*. Vol.; 18. 1997; p. 539–544.

BARBANTI, L., DI GIROLAMO, G., GRIGATTI, M., BERTIN, L., CIAVATTA, C. Anaerobic digestion of annual and multi-annual biomass crops. En: *Industrial Crops and Products*. Vol.; 56. 2014; p. 137–144.

BARBOSA, A.K., ZAIAT, M., FORESTI, E. Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads. En: *Journal of Environmental Management*. Vol.; 76. 2005, p. 319–325.

BATSTONE, D.J.; KELLER, J.; ANGELIDAKI, I.; KALYUZHNYI, S., PAVLOSTATHIS, S.G; ROZZI, A.; SANDERS, W.; SIEGRIST, H.; VAVILIN, V. *IWA Task Group on Modeling of Anaerobic Digestion Processes*. IWA Publishing, London. 2002.

BERTIN, L. LAMPIS, S. TODARO, D., SCOMA, A., VALLINI G., MARCHETTI, L., MAJONE, M., FAVA, F. Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors

packed with ceramic filters or granular activated carbon. En: Water Research. Vol.; 44. 2010; p. 4537 -4549.

BOLTZ, J.P., JOHNSON, B.R., DAIGGER, G.T., SANDINO, J. Modeling Integrated Fixed-Film Activated Sludge and Moving-Bed Biofilm Reactor Systems I: Mathematical Treatment and Model Development. En: Water Environment Research. Vol.; 81(6). 2009; p. 555-575.

BOLTZ, J.P., JOHNSON, B.R., DAIGGER, G.T., SANDINO, J., ELENTER, D. Modeling Integrated Fixed-Film Activated Sludge and Moving-Bed Biofilm Reactor Systems II: Evaluation. En: Water Environment Research. Vol.; 81(6). 2009a; p. 576-586.

BOLTZ, J.P., MORGENROTH, E., SEN, D. Mathematical modelling of biofilms and biofilm reactors for engineering design. En: Water Science Technology. Vol.; 62 (8). 2010, p.1821–1836.

BORKAR, R.P, GULHANE, M.L, KOTANGALE, A.J. Moving Bed Biofilm Reactor – A New Perspective in Wastewater Treatment. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. Vol.; 6 (6). 2013, p. 15-21.

BOSSIER, P., POELS, J., VANASSCHE, P., VERSTRAETE, W. Influence of the dimensional characteristics of polyurethane foam on high-rate anaerobic digestion of piggery manure. En: Biotechnology Letters. Vol.; 8. 198; p. 901-906.

BOUALLAGUI, H., LAHDHEB, H., BEN ROMDAN, E., RACHDI, B., HAMDIA, M., Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition. En: Journal of Environmental Management. Vol.; 90. 2009; p. 1844–1849.

BOUALLAGUI, H., RACHDI, B., GANNOUN, H. y HAMDIA, M. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of abattoir wastewater and fruit and vegetable waste in anaerobic sequencing batch reactors. En: Biodegradation. Vol.; 20. 2009; p. 401–409.

BOUALLAGUI, H., TOUHAMI, Y., BEN CHEIKH, R., HAMDIA, R.M. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. En: Process Biochemistry. Vol.; 40. 2005; p. 989 – 995.

BOULANGER, A.; PINET, E.; BOUIX, M., BOUCHEZ, T.; MANSOUR. A.A. Effect of inoculum to substrate ratio (I/S) on municipal solid waste anaerobic degradation kinetics and potential. En: Waste Management. Vol.: 32. 2012, p. 2258–2265

BOWEN, E.J., DOLFING, J., DAVENPORT, R.J., READ, F.L., CURTIS, T. P. Low-temperature limitation of bioreactor sludge in anaerobic treatment of domestic waste- water. En: Water Science Technology. Vol.; 69. 2014, p.1004 – 1013.

BROCKMANN, D., CAYLET, A., ESCUDIÉ, R., STEYER, J-P, BERNET, N. Biofilm model calibration and microbial diversity study using Monte Carlo simulations. En: Biotechnology Bioengineering. Vol.; 110. 2013, p.1323–1332.

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

CAVINATO, C., BOLZONELLA, D., FATONE, F., GIULIANO, A., PAVAN, P. Two-phase thermophilic anaerobic digestion process for biohythane production treating biowaste: preliminary results. En: Water Science and Technology. Vol; 64. 2011; p. 715–721.

CAVINATO, C., BOLZONELLA, D., PAVAN, P., FATONE, F., CECCHI, F. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge and source sorted biowaste in pilot-and full-scale reactors. En: Renewable Energy. Vol.; 55. 2013; 260–265.

CHAE, K.J., KIM, S.M., PARK, H.D., YIM, S.H., KIM, I.S. Development of pseudoamphoteric sponge media using polyalkylene oxide-modified ZAFIRI polydimethylsiloxane (PDMS) for rapid start-up of wastewater treatment plant. En: Chemosphere. Vol.; 71. 2008; p. 961–968.

CHAKRABORTY, C., CHOWDURY, R., BHATTACHARYA, P. Experimental studies and mathematical modeling of an up-flow biofilm reactor treating mustard oil rich wastewater. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (10). 2011, p. 5596–5601.

CHAMY, R. and RAMOS, C. Factors in the determination of methanogenic potential of manure. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (17). 2011, p.7673- 7677.

CHEN, Y., CHENG, J.J., CREAMER, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2008, p. 4044–4064.

CHERNICHARO, C. Principios do tratamento biológico de águas residuárias. Universidad Federal de Minas Gerais. Vol V. Brasil. 2007.

CHU, L.; WANG, J. Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio. En: Chemosphere. Vol.; 83. 2011; p. 63–68.

CONKLIN, A., STENSEL, H.D., FERGUSON, J. Growth kinetics and competition between Methanosarcina and Methanosaeta in mesophilic anaerobic digestion. En: Water Environmental Research. Vol.; 78 (5). 2006, p. 486–496.

CRESSON, R., DABERT, P., BERNET, N. Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. En: Journal of Applied Microbiology, Wiley. Vol.; 106 (3). 2009; p. 863 - 876.

CUSLER, E.L. Diffusion: Mass Transfer in fluid systems, Second edition. Cambridge University Press, New York, 1997.

DAREIOTI, M.A., KORNAROS, M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. En: Bioresource Technology. Vol.; 167. 2014, p.407-415.

DAVIES, D.G. Biofilm dispersion. In H.-C. Flemming, J. Wingender, and U. Szewzyk, editors, Biofilm highlights, volume 5 of Springer series on biofilms. Springer, Berlin, 2011, p. 1–28.

DE AMORIN, E., SADER, L.; SILVA, E. Effects of the organic loading rate on the performance of an anaerobic fluidized-bed reactor treating synthetic wastewater containing phenol. En: Journal of Environmental Engineering. Vol.; 141(10). 2015, p. 1-9.

DE VRIEZE, J., RAPORT, L., WILLEMS, B., VERBRUGGE, S., VOLCKE, E., MEERS, E. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. En: Microbial Biotechnology. Vol.; 8 (5), p. 776-786.

DEL REAL, J. Evaluación y modelado de la cinética de depuración anaerobia de vinazas de la industria alcoholera. Tesis Doctorado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. 2007, p. 41.

DEMIREL, B. y SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a Review. En: Environmental Science Biotechnology. Vol.; 7. 2008; p. 173–190.

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

DONG, J., ZHAO, Y., HONG, M. Influence of alkalinity on the stabilization of municipal solid waste in anaerobic simulated bioreactor. En: Journal of Hazardous Materials. Vol.; 163. 2009, p.717–722.

DONG, X., SHAO, L., WANG, Y., KOU, W., CAO, Y., ZHANG, D. Biogas by two-stage microbial anaerobic and semi-continuous digestion of Chinese cabbage waste. En: Chinese Journal of Chemical Engineering. Vol.; 23. 2015; p. 847–852.

DONG, Z., LUB, M., HUANG, W., XU, X. Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier. En: Journal of Hazardous Materials. Vol.; 196. 2011; p.123– 130.

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>.

DUAN, N., DONG, B., WU, B., DAI, X. High-solid anaerobic digestion of sewage sludge under mesophilic conditions: feasibility study. En: Bioresource Technology. Vol.; 104. 2012; p.150–156.

ELBESHISHY, E., NAKHLA, G., HAFEZ, H. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. En: Bioresource Technology. Vol.; 110. 2012, p. 18–25.

ESCUDIÉ, R., CRESSON, R., DELGENES, J.P., BERNET, N. Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. En: Water Research. Vol.; 45. 2011; p. 1-10.

FAZOLO, A., FORESTI, E., ZAIAT, M. Removal of nitrogen and organic matter in a radial flow anaerobic-anoxic immobilized biomass reactor used in the posttreatment of anaerobically treated effluent. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol.; 142. 2007; p. 44-51.

FDEZ.-GÜELFO, L.A., ÁLVAREZ-GALLEGO, C., SALES MÁRQUEZ, D., ROMERO GARCÍA, L.I Biological pretreatment applied to industrial organic fraction of municipal solid

wastes (OFMSW): Effect on anaerobic digestion. En: Chemical Engineering Journal. Vol.; 172. 2011; p. 321– 325.

FENG, L., LI, Y., CHEN, C., LIU, X., XIAO, X., MA, X., ZHANG, R., HE, Y., y LIU, G. Biochemical methane potential (BMP) of vinegar residue and the influence of feed to inoculum ratios on biogas production. En: Bioresources. Vol.; 8(2). 2013; p. 2487-2498.

FENG, X.M., KARLSSON, A., SVENSSON, B.H., BERTILSSON, S. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste-linking process to microbial communities. En: FEMS Microbiology Ecology. Vol.; 74. 2010, p. 226–240.

FERNANDEZ, J., PEREZ, M., ROMERO, L.I. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: influence of initial total solid concentration. En: Bioresource Technology. Vol.; 101. 2010, p.6322–6328.

FERNÁNDEZ, N., DÍAZ, E.E., AMILS, R. SANZ, J.L. Analysis of Microbial Community during Biofilm Development in an Anaerobic Wastewater Treatment Reactor. En: Microbial Ecology. Vol.; 56 (1). 2008, p. 121-132.

FERRER, P., CAMBRA-LÓPEZ, M., CERISUELO, A., PEÑARANDA, D., MOSET, V. The use of agricultural substrates to improve methane yield in anaerobic co-digestion with pig slurry: Effect of substrate type and inclusion level. En: Waste Management. Vol.; 34. 2014; p. 196–203.

FONGSATITKUL, P., ELEFSINIOTIS, P., WAREHAM, D.G. Effect of mixture ratio, solids concentration and hydraulic retention time on the anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. En: Waste Management Research. Vol.; 28. 2010, p. 811–817.

FORSTER-CARNEIRO, T., PEREZ, M., ROMERO, L.I., SALES, D. Dry thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: Focusing on the inoculum sources. En: Bioresource Technology. Vol.; 98. 2007; p. 3195–3203.

FOURNIER, R.L. Basic transport phenomena in biomedical engineering. Third edition. CRC press. 2012, p. 196.

FUKUI, M., SUH, J. y URUSHIGAWA, Y. In situ substrates for sulfidogens and methanogens in municipal anaerobic sewage digesters with different levels of sulfate. En: Water Research. Vol.; 34(5). 2000; p. 1515-1524.

FYNN, G.H., WITHMORE, T.N. Retention of methanogens in colonized reticulated polyurethane foam biomass support particle. En: Biotechnology Letters. Vol.; 6. 1984; p. 81-86.

GARCÍA, J-L., PATEL, B. K. C. y OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. En: Anaerobe. Vol.; 6. 2000; p. 205-226.

GARCIA, M.L.; LAPA, K.R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage. En: Journal of Environmental Management. Vol.; 88. 2008, p. 1471–1477.

GARCIA-PEÑA, E.I., PARAMESWARAN, P., KANG, D.W., CANUL-CHAN, M., KRAJMALNIK-BROWN, R. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011; p. 9447–9455.

GHANIYARI-BENIS, S., BORJA, R., ALI MONEMIAN, S., GOODARZI, V. Anaerobic treatment of synthetic medium-strength wastewater using a multistage biofilm reactor. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 100. 2009, p. 1740-1745.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., GARCÍA-ENCINA, P.A., Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. En: *Biomass Bioenergy*. Vol.; 33. 2009; p. 1065–1069.

GOODE, C. Understanding biosolids dynamics in a moving bed biofilm reactor. En: PhD thesis, University of Toronto, Canada. 2010.

GRAF VON DER SCHULENBURG, D.A., PINTELON, T.R., PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M, JOHNS, M.L. Three-dimensional simulations of biofilm growth in porous media. En: *AIChE Journal*. Vol.; 55, 2009; p. 494–504.

GRIFFIN, M.E., MCMAHON, K.D., MACKIE, R.I., RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.; 57. 1988, p. 342–354.

GUO, C., YANG, Z., HUANG, J., WANG, H., XU, H., WANG, L. Effects of temperature and organic loading rate on the performance and microbial community of anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste. En: *Chemosphere*. Vol.; 105. 2014, p.146–51.

HABOUZIT, F.; HAMELIN, J., CATALINA, G.S, STEYER, J.P.; BERNET, N. Biofilm development during the start-up period of anaerobic biofilm reactors: the biofilm *Archaea* community is highly dependent on the support material. En: *Microbial Biotechnology*. Vol.; 7 (3). 2014; p. 257–264.

HABOUZIT., F.; GÉVAUDAN, G.; HAMELIN, J.; STEYER, J.P.; BERNET, N. Influence of support material properties on the potential selection of *Archaea* during initial adhesion of a methanogenic consortium. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011; p. 4054–4060.

HALWACHS, W. Km and Vmax from only one experiment. En: *Biotechnology Bioengineering*. Vol.; 20. 1978, p. 281-285.

HAN, W.; YUE,Q.; WU, S.; ZHAO,Y.; GAO, B.; LI,Q.; WANG,Y. Application and advantages of novel clay ceramic particles (CCPs) in an up-flow anaerobic bio-filter (UAF) for wastewater treatment. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 137. 2013; p. 171–178.

HAYDUK, W and MINHAS, B. S. Correlations for prediction of molecular diffusivities in liquids. En: *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. Vol.; 60 (2). 1982, p. 295–299.

HEEG, K., POHLB, M., SONTAG, M., MUMMEA, J., KLOCKE, M., NETTMANN, E. Microbial communities involved in biogas production from wheatstraw as the sole substrate within a

two-phase solid-state anaerobic digestion. En: Systematic and Applied Microbiology. Vol.; 37. 2014; p. 590–600.

HEIDRICH, E.S., CURTIS, T.P., DOLFING, J. Determination of the internal chemical energy of wastewater. En: Environmental Science Technology. Vol.; 45 (2). 2011; p. 827–832.

HOORMWEG, D. and BHADA-TATA, P. What a waste. A global Review of solid state management. Urban Development Series Knowledge Papers. The World Bank. Washington D.C. 2012.

HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M., IGARASHI, Y. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 72. 2006; p. 1623–30.

HSIEN, T-Y Y LIN, Y-H. Biodegradation of phenolic wastewater in a fixed biofilm reactor. En: Biochemical Engineering Journal. Vol.; 27. 2005, p. 95-103.

IKE, M., INOUE, D., MIYANO, T., LIU, T.T., SEI, K., SODA, S. Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project. En: Bioresource Technology Vol.; 101. 2010; p. 3952–3957.

IZUMI, K., OKISHIO, Y-K., NAGAO,N., NIWA, CH., YAMAMOTO,Sh., TODA, T. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. En: International Biodeterioration & Biodegradation. Vol.; 64. 2010; p. 601-608.

JAGADABHI, P.S., KAPARAJU, P., RINTALA, J. Two-stage anaerobic digestion of tomato, cucumber, common reed and grass silage in leach-bed reactors and upflow anaerobic sludge blanket reactors. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 4726– 4733.

JHA, A.K., LI, J., NIES, L. and ZHANG, L. Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes. En: Afr. Journal Biotechnology. 10. 2011; p. 14242–14253.

JURECSKA, L.; BARKÁCS, K.; KISS, E.; GYULAI, G.; FELFÖLDI, T.; TÖRŐ,B.; KOVÁCS,R.; ZÁRAY, G. Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. En: Microchemical Journal. Vol.; 107. 2013; p. 108–114.

KADER, F., BAKY, A.H., KHAN, M.N., CHOWDHURY, H.A. Production of Biogas by Anaerobic Digestion of Food Waste and Process Simulation. En: American Journal of Mechanical Engineering. Vol.; 3 (3). 2015; p. 79-83.

KALLISTOVA, A. Y., GOELB, G. Y NOZHEVNIKOVA, A. N. Microbial Diversity of Methanogenic Communities in the Systems for Anaerobic Treatment of Organic Waste. En: Microbiology. Vol.; 83(5). 2014; p. 462–483.

KAPLAN; J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. En: Journal Dent. Research. Vol.; 89. 2010, p. 205–218.

KARADAG, D., KOROGLU, E.O., OZKAYA, B., CAKMAKCI, M., A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. En: Process Biochemistry. Vol.; 50 (2). 2015, p. 262-271.

KARAKASHEV D., BATSTONE, DJ, ANGELIDAKI, I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 71. 2005; p.331–8.

KARAKASHEV, D., BATSTONE, D.J., TRABLY, E., ANGELIDAKI, I. Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 72. 2006; p. 5138–41.

KARTHIKEYAN, O.P., VISVANATHAN, C. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: a review. Rev. En: Environment Science Biotechnology. Vol.; 12. 2013; p. 257–284.

KAYRANLI, B and UGURLU, A. Assessment of methanogenic activity and kinetics of anaerobic granular sludge. En: Fresenius Environmental Bulletin. Vol.; 21(8B). 2012, p. 2394–2398.

KHALID, A., ARSHAD, M., ANJUM, M., MAHMOOD, T., DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste – review. En: Waste Management. Vol.; 31. 2011, p. 1737–1744.

KHASSEHKHAN, H., HILLEN, T., EBERL, H.J. A Nonlinear Master Equation for a Degenerate Diffusion Model of Biofilm Growth. En: Lecture Notes in Computer Science. 2009, p. 735-744.

KIM, H.W., NAM, J.Y., SHIN, H.S. A comparison study on the high-rate co-digestion of sewage sludge and food waste using a temperature-phased anaerobic sequencing batch reactor system. En: Bioresource Technology. Vol.; 102. 2011; p. 7272–7279.

KIM, S., BAE, J., CHOI, O., JU, D., LEE, J., SUNG, H. A pilot scale two-stage anaerobic digester treating food waste leachate (FWL): Performance and microbial structure analysis using pyrosequencing. En: Procedure Biochemical. 49(2). 2013; p.301–308.

KOTSYURBENKO, O.R. Trophic interaction in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. En: FEMS Microbiology Ecology. Vol.; 53. 2005, p. 3–13.

KRAKAT, N., WESTPHAL, A., SCHMIDT, S., SCHERER, P. Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 76. 2010; p. 1842–50.

LABATUT, R.A., ANGENENT, L.T., SCOTT, N.R. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (3). 2011, p. 2255–2264.

LANGER, S., SCHROPP, D., BENGLSDORF F. R., OTHMAN, M., KAZDA, M. Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste. En: Anaerobe. Vol.; 29. 2014, p. 44-51.

LANGER, S., SCHROPP, D., BENGLSDORF, F.R., OTHMAN, M., KAZDA, M. Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste. En: Anaerobe. Vol.; 29. 2014; p. 44-51.

- LEAHY-DIOS, A. and FIROOZABADI, A. Unified Model for Non ideal Multicomponent Molecular Diffusion Coefficients. En: *AIChE Journal*. Vol.; 53 (11). 2007, p. 2932-2939.
- LEE, D.H., BEHERA, S.K., KIM, J., PARK, H.S. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab scale study. En: *Waste Management*. Vol.; 29. 2009, p. 876–882.
- LESTEUR, M., BELLON-MAUREL, V., GONZALEZ, C., LATRILLE, E., ROGER, J.M., JUNQUA, G., STEYER, J.P. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: a review. En: *Process Biochemical*. Vol.; 45 (4). 2010, p. 431–440.
- LETTINGA, G., VAN NELSEN, A.F.M., HOBMA, S.W., DE ZEEW, W., and KLAPWIJK, A. Use of the Up flow Sludge Blanket (USB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment, especially for anaerobic treatment. En: *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.; 22. 1980; p. 699 – 734.
- LEYVA-DÍAZ, J.C., CALDERÓN, K., RODRÍGUEZ, F.A, GONZÁLEZ-LÓPEZ, J., HONTORIA, E. POYATOS, J.M. Comparative kinetic study between moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor and membrane bioreactor systems and their influence on organic matter and nutrients removal. En: *Biochemical Engineering Journal*. Vol.; 77. 2013, p. 28– 40.
- LI, D.,LIU, S.; MI, L.; LI, Z., YUAN, Y., YAN, Z., LIU, X. Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and cow manure. En: *Bioresource Technology*. Vol., 189.2015; p. 319–326.
- LIANHUA, L., DONG, L., YONGMING, S., LONGLONG, Ma., ZHENHONG, Y., XIAOYING, K. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. En: *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol.; 35. 2010, p. 7226-7266.
- LIM, J-W., CHEN, C.L., HO, I.J.R., WANG, J.Y Study of microbial community and biodegradation efficiency for single- and two-phase anaerobic co-digestion of brown water and food waste. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 147. 2013; p.193–201.
- LIM, J-W.; SENG, C-E.; LIM, P-E.; NG, S-L; SUJARI, A-N. Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011; p. 9876–9883.
- LIN, J., ZUO, J., GAN, L., LI, P., LIU, F., WANG, K., CHEN, L., GAN, H. Effects of mixture ratio on anaerobic co-digestion with fruit and vegetable waste and food waste of China. En: *Journal of Environmental Sciences*. Vol.; 23(8). 2011; p. 1403–1408.
- LIN, Y-H and HSIEN, T-Y. Kinetics of Biodegradation of phenolic wastewater in a biofilm reactor. En: *Water science and technology*. Vol.; 59 (9). 2009, p. 1703-1711
- LIN, Y-H. Kinetics of nitrogen and carbon removal in a moving-fixed bed biofilm reactor. En: *Applied Mathematical Modelling*. Vol.; 32.2008, p. 2360–2377.
- LIU, C., YUAN, X., ZENG, G., LI, W., LI, J. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 99. 2008; p. 882–888.

- LIU, X., SCHNELL, S.K., SIMON, J.M., KRÜGER, P., BEDEAUX, D., KJELSTRUP, S., BARDOW, A. Diffusion Coefficients from Molecular Dynamics Simulations in Binary and Ternary Mixtures. En: *International Journal of Thermophysics*. Vol.; 34 (7). 2013, p. 1169–1196.
- LUO, G.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011, p. 8700–8706.
- MAO, CH., FENG, F., WANG, X., REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol.; 45. 2015; p. 540–555.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, L., FONT, X., VICENT, T. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. En: *Biochemical Engineering Journal*. Vol.; 76. 2013; p. 1–5.
- MAYA-ALTAMIRA, L., BAUN, A., ANGELIDAKI, I., SCHMIDT, J.E. Influence of wastewater characteristics on methane potential in food-processing industry wastewaters. *Water Res.* Vol.; 42. 2008, p. 2195–2203.
- McDOUGALG, D., RICE, S.A., BARRAUD, N, STEINBERG, P.D, KJELLEBERG, S. Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal (Review). En: *Nature Reviews Microbiology*. Vol.; 10 (1). 2012, p. 39-50.
- McMAHON, K. D., STROOT, P. G., MACKIE, R. I. y RASKIN, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions II: microbial population dynamics. En: *Water. Research*. Vol.; 35(7). 2001; p. 1817–1827.
- MENG, Y., JOST, C., MUMME, J., WANG LINKE, B. An analysis of single and two stage, mesophilic and thermophilic high rate systems for anaerobic digestion of corn stalk. En: *Chemical Engineering Journal*. Vol.; 288. 2016; p. 79–86.
- MICHAUD, S., BERNET, N., BUFFIÈRE, P., ROUSTAN, M. MOLETTA, R. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. En: *Water Research*. Vol.; 36. 2002; p. 1385–1391.
- MICHAUD, S., BERNET, N., BUFFIÈRE, P., y DELGENÈS, J.-P. Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. En: *Process Biochemical*. Vol.; 40. 2005; p. 2751–2755.
- MIJAYLOVA-NACHEVA, P., PENA-LOERA, B., CUEVAS-VELASCO, S. Anaerobic treatment of organic chemical wastewater using packed bed reactors. En: *Water Science and Technology*. Vol.; 54. 2006; p. 67-77.
- MOLOBELA, I.T., and ILUNGA, F.M. Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. En: *Annals of Microbiology*. Vol.; 62 (2).2012, p. 461–467.
- MONTALVO, S., GUERRERO, L., BORJA, R., SÁNCHEZ, E., MILÁN, Zh., CORTÉS, I., DE LA RUBIA, M.A. Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. En: *Applied Clay Science*. Vol.; 58. 2012; p. 125–133.

MORGENROTH, E., EBERL, H.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., NOGUERA, D.R., PIZARRO, G.E., PICIOREANU, C., RITTMANN, R.E., SCHWARZ, A.O., WANNER, O. Comparing biofilm models for a single species biofilm system. En: Water Science and Technology. Vol.; 49 (11–12). 2004, p. 145-154.

MSHANDETE, A., BJORNSSON, L., KIVAIISI, A.K., RUBINDAMAYUGI, M.S.T., MATTIASSEN, B., Effect of particle size on biogas yield from sisal fiber waste. Renewable. En: Energy. Vol.; 31. 2006; p. 2385-2392.

MUSTAFA, N.; ELBESHBISHY, E., NAKHLA, G.; ZHU, J. Anaerobic digestion of municipal wastewater sludges using anaerobic fluidized bed bioreactor. En: Bioresource Technology. Vol.; 172. 2014; p. 461–466.

NAJAFPOUR, G.D. Bioconversion of Cheese Whey to Methane in an Upflow Anaerobic Packed Bed Bioreactor. En: Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. Vol.; 24 (1). 2010.

NATHAO, C., SIRISUKPOKA, U., PISUTPAISAL, N. Production of hydrogen and methane by one and two stage fermentation of food waste. En: International Journal Hydrogen Energy. Vol.; 38(35). 2013; p. 15764–15769.

NAVA, L.M, GASPERIN, R., y DURAN, A. Comparación de un reactor de biomasa suspendida y un reactor de biomasa adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías del petróleo. En: Revista Interamericana de contaminación ambiental. Vol.; (30). 2014, p. 101-112.

NETTMANN, E., BERGMANN, I., PRAMSCHÜFER, S., MUNDT, K., PLOGSTIES, V., HERRMANN, C. and KLOCKE, M. Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plant. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 76 (8). 2010; p. 2540-2548.

NEVES, L., GONSALO, E., OLIVEIRA, R., ALVES, M.M. Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures. En: Waste Management. Vol.; 28. 2008, p. 965–972.

NGES, I.A AND BJÖRNSSON, L. High methane yields and stable operation during anaerobic digestion of nutrient-supplemented energy crop mixtures. En: Biomass Bioenergy. Vol.; 47. 2012, p. 62–70.

NIELSEN, H. B., MLADENOVSKA, Z., WESTERMANN, P. y AHRING, B. K. Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. Biotechnology and Bioengineering Vol.; 86(3). 2004, p. 291-300.

NOGUERA, D.R and MORGENROTH, E. Introduction to the IWA Task Group on Biofilm Modeling. En: Water Science and Technology. Vol.; 49 (11–12). 2004; p.131–136.

OGBONNA, C. B., IBIENE A. A., STANLEY H. O. Microbial Population Dynamics during Anaerobic Digestion of Guinea Grass (*Panicum maximum*). En: Journal of Applied & Environmental Microbiology. Vol.; 2 (6). 2014, p. 294-302.

OPEN-BIO. Opening bio-based markets via standards, labelling and procurement Work package 6 Managed end-of-life options Deliverable N° 6.6: Review on standards for biogasification. 2014.

PALACIO-BARCO, E., ROBERT-PEILLARD, F., BOUDENNE, J-L., COULOMB, B. On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes. En: *Analytica Chimica Acta*. Vol.; 668 (1). 2010, p. 74–79.

PALATS, J., LAURENI, M., ANDRÉS, M.V, FLOTATS, X., NIELSEN, H.B, ANGELIDAKI, I. Strategies for recovering inhibition caused by long chain fatty acids on anaerobic thermophilic biogas reactors. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 100. 2009; p. 4588–96.

PANDEY, P., NDEGWA, P., SOUPIR, M., ALLDREDGE, R., PITTS, M. Efficacies of inocula on the start up of anaerobic reactors treating dairy manure under stirred and unstirred conditions. En: *Biomass and Bioenergy*. Vol.; 35. 2011; p. 2705 – 2720.

PERNI, S., PREEDY, E.C., PROKOPOVICH, P. Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces. En: *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol.; 206. 2014, p. 265–274.

PEVERE, A., GUIBAUD, G., GOIN, E., VAN HULLEBUSCH, E., LENS, P. Effects of physico-chemical factors on the viscosity evolution of anaerobic granular sludge. En: *Biochemical Engineering Journal*. Vol.; 43 (3). 2009, p. 231–238.

PINHO, S.C, FORESTI, E., ZAIAT, M. Degradation of partially soluble wastewater in an anaerobic sequencing batch biofilm reactor role of impeller type. En: *Environmental Engineering Science*. Vol.; 23. 2006; p. 803-813.

PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS. PGIRS 2016-2027. Formulación y actualización. Alcaldía de Bucaramanga. 2015.

POELS, J., VANASSCHE, P., WERSTRAETE, W. High-rate anaerobic digestion of piggery manure with polyurethane sponges as support material. En: *Biotechnology Letters*. Vol.; 6. 1984; p. 747-752.

QI, P:S., WANG, W.B., QI, Z. Effect of Shear Stress on Biofilm Morphological Characteristics and the Secretion of Extracellular Polymeric Substances. En: *2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*. 2008, p. 3438-3441.

QUINTERO, M., CASTRO, L., ORTIZ, C., GUZMÁN, C. ESCALANTE, H. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 108. 2012, p. 8–13.

RAJAGOPAL, R., SAADY, N.M.C., TORRIJOS, M., THANIKA, L J.V., HUNG, Y.T. Sustainable agro-food industrial wastewater treatment using high rate anaerobic process. En: *Water*. Vol.; 5. 2013, p. 292-311.

RAJINIKANTH, R., GANESH, R., ESCUDIE, R., MEHROTRA, I., KUMAN, P., THANIKAL, J.V.,TORRIJOS, M. High rate anaerobic filter with floating supports for the treatment of effluents from small-scale agro-food industries. En: *Desalination Water Treatment*. Vol.; 4. 2009, p. 183-190.

RAPOSO, F., BANKS, C.J., SIEGERT, I., HEAVEN, S., BORJA, R. Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. En: *Process Biochemistry*. Vol.; 41. 2006, p. 1444–1450.

RAPOSO, F., BORJAA, R., MARTIN, M.A., MARTIN, A., RUBIA, M.A., RINCON, B. Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: process stability and kinetic evaluation. En: *Chemical Engineering Journal*. Vol.; 149. 2009, p. 70–77.

RAPOSO, F., DE LA RUBIA, M.A., FERNANDEZ-CEGRI, V., BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures. En: *Renewable Sustainable Energy Rev.* Vol.; 16. 2012, p. 861–877.

REGUEIRO, L., VEIGA, P., FIGUEROA, M., ALONSO-GUTIERREZ, J., STAMS, A.J.M., LEMA, J.M., CARBALLA, M. (2012) Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. En: *Microbiology Research*. Vol.; 167. 2012, p. 581–589.

RIBEIRO, R., VARESCHE, M.D.A, FORESTI, F., ZAIAT, M. Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices. En: *Journal of Environmental Management*. Vol.; 74. 2005; p. 187-198.

RINCÓN, B., BORJA, R.J, MARTÍN, M.A, MARTÍN, A. Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic–acidogenic step. En: *Waste Management*. Vol.; 29. 2009; p. 2566–2573.

RITTMANN, B. E. and McCARTY, P. L. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Mc-Graw Hill, New York, NY. 2001.

RITTMANN, B.E., SCHWARZ, A, O., EBERL, H.J., MORGENROTH, E., PEREZ, J., VAN LOOSDRECHT, M., WANNER. W. Results from the multi-species Benchmark Problem (BM3) using one-dimensional models. En: *Water Science and Technology*. Vol.; 49 (11-12). 2004; p. 163-168.

RODGERS, M., ZHAN, X.M, DOLAN, B. Mixing characteristics and whey wastewater treatment of a 8 novel moving anaerobic biofilm reactor. En: *Journal Environmental Science Health*. Vol.; 39. 2004, p. 2183-2193.

ROZZI, A. and REMIGI, E. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. En: *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Vol.; 3(93). 2004; p.115.

RYCHERT, K and NEU, T. Protozoan impact on bacterial biofilm formation. En: *Biological Letters*. Vol.; 47 (1). 2010, p. 3-10.

SANABRIA, J., DURÁN, M.F, GUTÉRREZ, N. Comparación de dos métodos de medición de actividad metanogénica específica en reactores anaerobios aplicados al tratamiento de vinazas. En: *Revista Ingeniería y región*. Vol.; 9. 2012; p. 75-82.

SANDOVAL, C.J, VERGARA, M., CARREÑO, M. CASTILO, E. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. En: Waste Management. Vol.; 29. 2009; p. 704–711.

SARKAR, S and MAZUMDER, D. Development of a simplified biofilm model. En: Applied Water Science. Vol.; 72(9). 2015, p.1601-1610.

SASAKI, D., HORI,T., HARUTA,S., UENO, Y., ISHII,M. y IGARASHI, Y. Methanogenic pathway and community structure in a thermophilic anaerobic digestion process of organic solid waste. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol.; 111(1). 2011; p. 41–46.

SATYA, E.J and VENKATESWARLU, Ch. Evaluation of anaerobic biofilm reactor kinetic parameters using ant colony optimization. En: Environmental engineering Science. Vol.; 30 (9). 2013, p. 527-535.

SCHIEVANO, A., D'IMPORZANO,G., MALAGUTTI, L., FRAGALI, E., RUBONI, G., ADANI, F. Evaluating inhibition conditions in high-solids anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. En: Bioresource Technology. Vol.; 101. 2010; p. 5728–5732.

SCHNEIDERS, D., DIAS DA SILVA, J., TILL, A., LAPA, K.R. PINHEIRO, A. Specific methanogenic activity (SMA) of industrial sludge from the aerobic and anaerobic biological treatment. En: Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. Vol.; 8 (2). 2013; p. 135-145.

SCHNURER, A. and JARVIS, A. Microbiological handbook for biogas plants. Swedish Gas Centre Report 207. 2010, p. 13-138.

SHEN, F., YUAN, H., PANG, Y., CHEN, S., ZHU, B., ZOU, D. Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FWV) and food waste (FW): Single-phase vs. two-phase. En: Bioresource Technology. Vol.; 144. 2013; p. 80–85.

SHIN, S.G., HAN, G., LIM, J., LEE, C., HWANG, S. A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste recycling wastewater. En: Water Research. Vol.; 44(17). 2010; p. 4838–4849.

SHIVA KUMAR, B and VENKATESWARLU, Ch. Inverse Modeling Approach for Evaluation of Kinetic Parameters of a Biofilm Reactor Using Tabu Search. En: Water Environment Research. Vol., 86 (8). 2014, p, 675-686.

SIEGERT, I y BANKS, CH. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. En: Process Biochemistry. Vol.; 40(11). 2005; p. 3412-3418.

SILVA, A.J, HIRASAWA, J.S, VARESCHE, M.B., FORESTI, E., ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. En: Anaerobe. Vol.; 12. 2006; p. 93–98.

SINGH, S.P. and PRERNA, P. Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol.; 13 (6-7). 2009, p. 1569–1575.

SPEITEL, G.E and DiGIANO, F.A. Biofilm shearing under dynamic conditions. En: Journal Environmental Engineering- ASCE. Vol.; 113. 1987. New York.

STALEY, J., BRIANT, M., PFENNIG, N. y HOIT, J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkilms. Vol.; 3. 2000.

SUIDAN, M.T and WANG Y. T. Unified analysis of biofilm kinetics. En: Journal Environmental Engineering. ASCE. Vol.; 111. 1985, p. 634-646.

SUN, J., HU, Sh., SHARMA, K-J., NI, B-J., YUAN, Zh. Stratified Microbial Structure and Activity in Sulfide- and Methane- Producing Anaerobic Sewer Biofilms. En: Applied Environmental Microbiology. Vol.; 80 (22). 2014, p. 7042 -7052.

SUPERINTENDENCIA DE SERVCIOS PUBLICOS DOMICILIARIOS- SSPD. Situación de la disposición final de residuos sólidos en Colombia. Diagnóstico 2011.

SUTARYO S, WARD AJ, MØLLER HB. Thermophilic anaerobic co-digestion of separated solids from acidified dairy cow manure. En: Bioresource Technology. Vol. 114. 2012; p.195–200.

TABATABAEI, M., ZAKARIA, M.R., RAHIM, R.A., WRIGHT, A.D.G., SHIRAI, Y., ABDULLAH, N. PCR based DGGE and FISH analysis of methanogens in anaerobic closed digester tank treating palm oil mill effluent (POME). En: Electronic Journal of Biotechnology. Vol.; 12(3). 2009.

TAHERZADEH, D., PICIOREANU, D., HORN, H. Mass Transfer Enhancement in Moving Biofilm Structures .En: Biophysical Journal. Vol.; 102 (7). 2012; p. 1483–1492.

TAKRIFF, M.S, JAAFAR, N.L., ABDULLAH, S.R.S. A review of biofilm treatment systems in treating downstream palm oil mil effluent (POME). En: Journal of applied Sciences. Vol.; 14 (12). 2014, p. 1334-1338.

THURY, P., BARTHA, L., GULYÁS, L., PITÁS, V., FAZEKAS, B., KÁRPÁTI, A. Improvement of biofilm carriers for the treatment of automotive industry wastewater. En: Hungarian Journal of Industry and Chemistry. Vol.; 40(1). 2012; p. 1–4.

UEMURA S. Mineral requirements for mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of organic solid waste. En: International Journal Environment Research. Vol.; 4. 2010, p.33–40.

UMAÑA, O., NIKOLAEVA, S., SANCHEZ, E., BORJA, R., RAPOSO, F. Treatment of screened dairy manure by upflow anaerobic fixed bed reactors packed with waste tyre rubber and a combination of waste tyre rubber and zeolite: effect of the hydraulic retention time. En: Bioresource Technology. Vol.; 99. 2009; p. 7412–7417.

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

VENTURA, J.S, LEE, JAHNG, D. A comparative study on the alternating mesophilic and thermophilic two-stage anaerobic digestion of food waste. *Journal of Environmental Sciences*. Vol.; 26. 2014; p. 1274–1283.

WAGNER, M., MANZ, B., VOLKE, F., NEU, T.R., HORN, H. Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. En: *Biotechnology Bioengineering*. 107(1):Vol.; 107(1). 2010, p. 172–181.

WALKER, M., BANKS, C.J., HEAVEN, S. Two-stage anaerobic digestion of biodegradable municipal solid waste using a rotating drum mesh filter bioreactor and anaerobic filter. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 100. 2009, p. 4121–4126.

WANG X, YANG G, FENG Y, REN G, HAN X. Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co- digestion of dairy, chicken manure and wheat Straw . En: *Bioresource Technology*. Vol.; 120. 2012; p.78–83.

WANG, SH., RAO, N.C., QIU, R., MOLETT, R. Treatability and kinetic analysis of anaerobic moving bed biofilm reactor treating high strength milk permeate. En: *Desalination Water Treatment*. Vol.; 4. 2009, p. 1-3.

WANNER, O., EBERL, H.J, MORGENROTH, E., NOGUERA, D.R, PICIOREANU, C., RITTMANN, B.E, VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Mathematical modeling of biofilms. 2008. IWA Publishing.

WARD, A.J. HOBBS, P.J, HOLLIMAN, P. J. and JONES, D.L. Optimisation of the anaerobic digestion of agriculture resources. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 99. 2008; p. 7928-7940.

WEI-JIA, G.; HENG, L.; WEN-ZHE, L.; ZHEN-ZHEN, W. Selection and evaluation of biofilm carrier in anaerobic digestion treatment of cattle manure. En: *Energy*. Vol., 36. 2011; p. 3572–3578.

WEIB, S., ZANKEL, A., LEBUHN, M., PETRAK, S., SOMITSCH, W., GUEBITZ, G.M. Investigation of microorganisms colonizing activated zeolites during anaerobic biogas production from grass silage. En: *Bioresource Technology*. Vol.; 102. 2011; p. 4353–4359.

WILKE, C.E y CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. En: *AIChE Journal*. Vol.1. 1955, p. 264-270.

WILLIAMSON, K., MCCARTY, P.L. A model of substrate utilization by bacteria films. En: *Journal Water Pollution Control Fed*. Vol.; 48. 1976, p. 9-24.

WU, C. S., HUANG, J. S., YANG, J. L., JIH, C. G. Consecutive reaction kinetics involving distributed fraction of methanogens in fluidized-bed bioreactors. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.; 57(2). 1998, p. 367–379.

WU, G., HEALY, M.G. y ZHAN, X., Effect of the solid content on anaerobic digestion of meat and bone meal. En: *Bioresource Technology*. Vol. 100. 2009; p. 4326-4331.

WU, L.J, KOBAYASHI, T., LIC, Y.Y, XU, K.Q. Comparison of single-stage and temperature-phased two-stage anaerobic digestion of oily food waste. En: Energy Conversion and Management. Vol.; 106. 2015; p. 1174–1182.

WUERTZ, S., BISHOP, P.L., WILDERER, P.A. Biofilm in Wastewater Treatment: An interdisciplinary approach. IWA Publishing. 2008, p. 270.

YANG, Y., SUN, G., GUO, J., XU, M., 2011. Differential biofilms characteristics of shewanella decoloration is microbial fuel cells under open and closed circuit conditions. En: Bioresource Technology. Vol.; 102 (14). 2011, p. 7093–7098.

YANG, Y., TADA, CH., SHOHIDULLAH, M., TSUKAHARA, K., YAGISHITA, T., SAWAYANA, Sh. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. En: Materials Science and Engineering, Vol.; C24. 2004; p. 423-419.

YANG, Y., TADA, CH., SHOHIDULLAH, M., TSUKAHARA, K., YAGISHITA, T., SAWAYANA, Sh. Influence of bed material son methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. En: Materials Science and Engineering, Vol.; C24. 2004; p. 423-419.

YANG, Y.N.; TSUKAHARA, K., SAWAYANA, S. Performance and methanogenic community of rotating disk reactor packed with polyurethane during thermophilic anaerobic digestion. En: Materials Science and Engineering C – Biomimetic and Supramolecular Systems. Vol.; 27. 2007; p. 767 – 772.

YE, J., LI, D.; SUN, Y.; WANG, G.; YUAN,Z.; ZHEN, F.; WANG, Y. Improved biogas production from rice straw by co-digestion with kitchen waste and pig manure. En: Waste Management. Vol.; 33. 2013, p. 2653-2658.

YENIGÜN, O., DEMIRE, L. B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. En: Process Biochemical. Vol.; 48. 2013; p. 901–11.

YI, J., DONG, B., JIN, J., DAI, X. Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. En: PLOS ONE. Vol.; 9(7). 2014, p. 1-10.

YUAN, Y., ZHAO, B., ZHOU, S., ZHONG, S., ZHUANG, L. Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells. En: Bioresource. Technology. Vol.; 102 (13). 2011, p. 6887–6891.

YUE, Z-B, WANG, J., LIU, X-M., YU, H-Q. Comparison of rumen microorganism and digester sludge dominated anaerobic digestion processes for aquatic plants. En: Renewable Energy. Vol.; 4. 2012; p. 255-258.

ZAHER, U., CHEONG, D-Y., WU, B., CHEN, Sh. Producing Energy and Fertilizer From Organic Municipal Solid Waste. Department of Biological Systems Engineering Washington State University. 2007, p. 14-15.

ZAKARYA, I.A.; ABUSTAN, I.; ISMAIL, N.; YUSOFF, M.S. Production of methane gas from organic fraction municipal solid waste (OFMSW) via anaerobic process: application

methodology for the Malaysian condition. En: International Journal Environment and Waste Management. Vol.; 12 (2). 2013; p. 121-129.

ZEYNALIA, M.E and HAKIM, S. Diffusion Processes Affecting the Performance of Heterogeneous Catalysts: Part 1. En: Defect and Diffusion Forum. Vol.; 319. 2011, p 107-115.

ZHAI, N.; ZHANG, T.; YIN, D.; YANG, G.; WANG, X.; REN, G.; FENG, Y. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. En: Waste Management. Vol.; 38. 2015, p. 126–131.

ZHANG, L., LEE, Y., and JAHNG, D. Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: focusing on the role of trace elements. En: BioresourceTechnology. Vol.; 102. 2011, p. 5048–5059.

ZHANG, L.; YANG, J.; MA, Y.; LI, Z.; FUJII, T., ZHANG, W.; TAKASHI, N., Y FURUKAWA, K. Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol.; 110 (1). 2010; p. 72–78.

ZHANG, P., CHEN, Y., ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: effect of pH. En: Water Research. Vol.; 43.2009, p. 3735 - 3742.

ZHANG, W., WEIQ, W., QID, L., ZUOZ, E .Batch anaerobic co-digestion of pig manure with dewatered sewage sludge under mesophilic conditions. En: Applied Energy. Vol.; 128. 2014; p. 175–83.

ZHAO, H.; LI, J.; LI, J.; YUAN, X.; PIAO, R.; ZHU, W.; LI, H.; WANG, X.; CUI, Z. Organic loading rate shock impact on operation and microbial communities in different anaerobic fixed-bed reactors. En: Bioresource Technology. Vol.; 140. 2013, p.211–219.

ZHOU, Y.; ZHANG, Z.; NAKAMOTO, T.; LI, Y.; YANG, Y.; UTSUMI, M.; SUGIURA, N. Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. En: Biomass and Bioenergy. Vol.; 35. 2011, p, 3251 – 3256.

ZHU, G., LI, J and JHA, A.K. Anaerobic treatment of organic waste for methane production under psychrophilic conditions. En: International Journal of Agriculture Biology. Vol.; 16. 2014; p. 1025–1030.

ZIGANSHIN, AM., LIEBETRAU, J., PRÖTER, J., KLEINSTEUBER, S. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. En: Applied Microbiology Biotechnology. Vol.; 97.2013; p. 5161–74.

ZIZI, O.B, AMAR, H A. Treatment of dairy wastewater by fixed-film system in continuous flow. En: Desalination Water Treatment. Vol.; 51. 2013, p. 2214-2224.

ZUO, Z.; WU, SH.; ZHANG, W.; DONG, R. Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste. En: Bioresource Technology. Vol.; 146. 2013, p. 556–561.

ANEXO A. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO (Y), COEFICIENTE DE DESPRENDIMIENTO (b)

El coeficiente de rendimiento y de desprendimiento del reactor fue calculado con base en datos experimentales de concentración de sustrato y concentración de biomasa suspendida.

Figura 56. Cálculo del coeficiente de rendimiento (Y) para el reactor de película adherida.

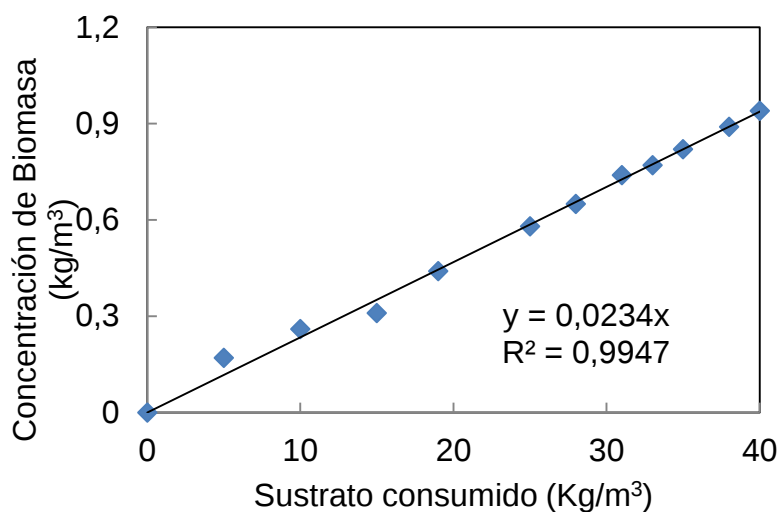
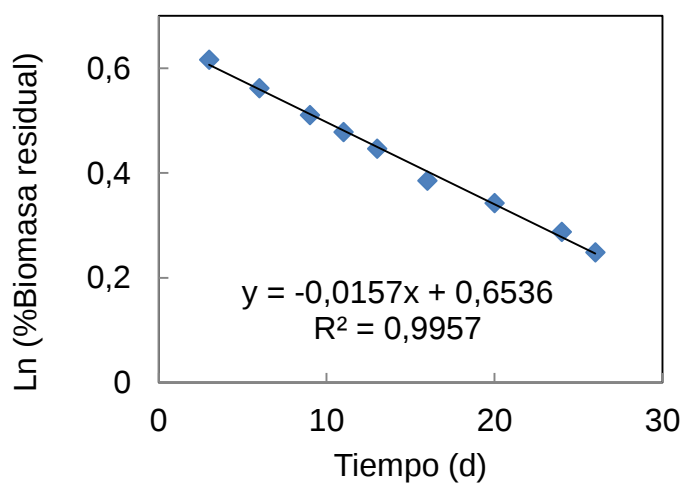


Figura 57. Cálculo del coeficiente de desprendimiento (b) para el reactor de película adherida.



ANEXO B. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VELOCIDAD MEDIA DE MONOD (Ks) Y VELOCIDAD MAXIMA DE UTILIZACIÓN DE MONOD (k)

Estos coeficientes fueron calculados de acuerdo con la ecuación desarrollada por Halwachs³¹²; Wu³¹³

$$\frac{t}{U} = \frac{K_s}{k * X_b} \left[\frac{1}{U} \ln \left(\frac{1}{1 - U} \right) - 1 \right] + \frac{S_{b0} + K_s}{k X_b}$$

$$U = \frac{S_{b0} - S_b}{S_{b0}}$$

Figura 58. Cálculo de k y K_s para el reactor de película adherida.

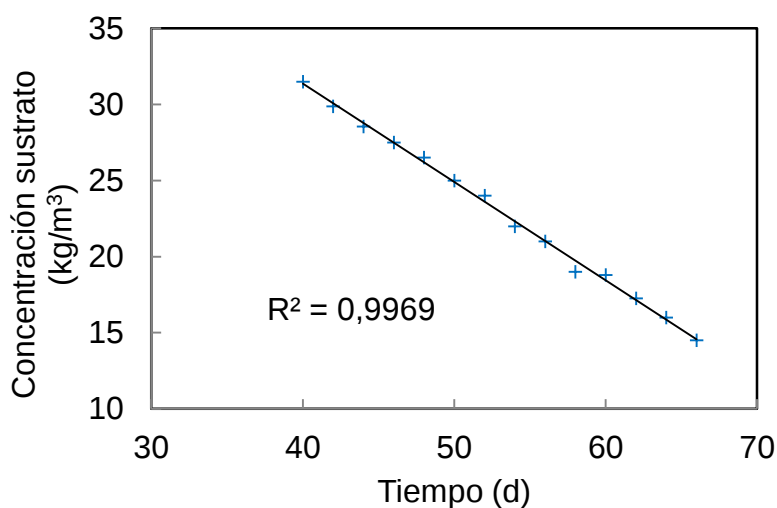


Tabla 13. Cálculo de los valores de k y K_s para el reactor de película adherida.

Xb (kg/m3)	0,3
Sb0 (kg/m3)	60
k (kg sust/kg SSV*d)	5,8
Ks (kg sust/m3)	0,83

³¹² HALWACHS, W. Km and Vmax from only one experiment. En: Biotechnology Bioengineering. Vol.; 20. 1978, p. 281-285.

³¹³ WU, C. S., HUANG, J. S., YANG, J. L., JIH, C. G. Consecutive reaction kinetics involving distributed fraction of methanogens in fluidized-bed bioreactors. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol.; 57(2). 1998, p. 367–379.

t (d)	S (kg/m3)	Ks/(k*Xb)	(Sb0-Sb)/Sb0	$((1/U)*\ln(1/(1-U))-1)$	(Sb0+Ks)/k*Xb	t calculado	Error cuad
40	31,5	1,421	0,475	0,357	34,960	40,432	0,187
42	29,875	1,421	0,502	0,389	34,960	42,793	0,628
44	28,55	1,421	0,524	0,417	34,960	44,725	0,525
46	27,5	1,421	0,542	0,440	34,960	46,261	0,068
48	26,5	1,421	0,558	0,464	34,960	47,729	0,073
50	25	1,421	0,583	0,501	34,960	49,940	0,004
52	24	1,421	0,600	0,527	34,960	51,421	0,335
54	22	1,421	0,633	0,584	34,960	54,401	0,161
56	21	1,421	0,650	0,615	34,960	55,901	0,010
58	19	1,421	0,683	0,683	34,960	58,926	0,857
60	18,8	1,421	0,687	0,690	34,960	59,230	0,593
62	17,25	1,421	0,713	0,750	34,960	61,603	0,158
64	16	1,421	0,733	0,802	34,960	63,537	0,215
66	14,5	1,421	0,758	0,873	34,960	65,885	0,013
							3,826

ANEXO C. RESULTADOS POLYMATH

Datos utilizados en el cálculo del modelo matemático para el reactor de película adherida

POLYMATH Results

REACTOR CON LADRILLO COMO SOPORTE

Calculated values of the DEQ variables

<u>Variable</u>	<u>initial value</u>	<u>minimal value</u>	<u>maximal value</u>	<u>final value</u>
t	0	0	100,	100,
Sf0	0	0	33,29595	3,8508262
Sf1	0	0	33,29595	3,8508262
Sf2	0	0	33,29595	3,8508263
Sf3	0	0	33,29595	3,8508263
Sf4	0	0	33,29595	3,8508264
Sf5	0	0	33,29595	3,8508266
Sf6	0	0	33,29595	3,8508267
Sf7	0	0	33,29595	3,8508269
Sf8	0	0	33,29595	3,8508271
Lf	5,0E-05	4,906E-05	1,501E-04	1,416E-04
Sb	0	0	33,295949	3,8508274
Xb	0,3	0,2960373	1,1266804	1,1195817
H	0	0	2,1915375	2,1915375
PosSf0	0	0	33,29595	3,8499068
PosSf1	0	0	33,29595	3,8499068
PosSf2	0	0	33,29595	3,8499069
PosSf3	0	0	33,29595	3,849907
PosSf4	0	0	33,29595	3,849907
PosSf5	0	0	33,29595	3,8499072
PosSf6	0	0	33,29595	3,8499073
PosSf7	0	0	33,29595	3,8499075
PosSf8	0	0	33,29595	3,8499077
Y	0,0234	0,0234	0,0234	0,0234
k	5,8	5,8	5,8	5,8
Ks	0,83	0,83	0,83	0,83
b	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167
bs	0,098	0,098	0,098	0,098
Df	8,2E-05	8,2E-05	8,2E-05	8,2E-05
Kf	2,5	2,5	2,5	2,5
Xf	0,00147	0,00147	0,00147	0,00147
E	0,7	0,7	0,7	0,7
V	0,0015	0,0015	0,0015	0,0015
Q	1,0E-04	1,0E-04	1,0E-04	1,0E-04
A	0,0235	0,0235	0,0235	0,0235
Sb0	60,	60,	60,	60,
DZ	6,25E-06	6,133E-06	1,876E-05	1,77E-05
G0	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G1	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G2	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G3	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G4	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G5	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G6	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G7	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
G8	-0,1147	-0,1147	0,0177191	-0,0030505
PosLf	5,0E-05	4,906E-05	1,501E-04	1,416E-04
PosSb	0	0	33,295949	3,849908
PosXb	0,3	0,2960373	1,1266804	1,1196361
FlujoenBi	0	-0,003246	0,0019304	-1,975E-05
m	6,9879518	0,1699586	6,9879518	1,2393406

Ym	0,2	0,2	0,2	0,2
Produccci	8,3855422	0,2761493	8,3855422	5,5504418

ODE Report (STIFF)

Differential equations as entered by the user

```
[1] d(Sf0)/d(t) = (2*Df*(PosSf1-PosSf0)/DZ/DZ)-(k*PosSf0/(Ks+PosSf0+Sf0*Sf0))*Xf
[2] d(Sf1)/d(t) = (Df*(PosSf2-2*PosSf1+PosSf0)/DZ/DZ)-(k*PosSf1/(Ks+PosSf1+Sf1*Sf1))*Xf
[3] d(Sf2)/d(t) = (Df*(PosSf3-2*PosSf2+PosSf1)/DZ/DZ)-(k*PosSf2/(Ks+PosSf2+Sf2*Sf2))*Xf
[4] d(Sf3)/d(t) = (Df*(PosSf4-2*PosSf3+PosSf2)/DZ/DZ)-(k*PosSf3/(Ks+PosSf3+Sf3*Sf3))*Xf
[5] d(Sf4)/d(t) = (Df*(PosSf5-2*PosSf4+PosSf3)/DZ/DZ)-(k*PosSf4/(Ks+PosSf4+Sf4*Sf4))*Xf
[6] d(Sf5)/d(t) = (Df*(PosSf6-2*PosSf5+PosSf4)/DZ/DZ)-(k*PosSf5/(Ks+PosSf5+Sf5*Sf5))*Xf
[7] d(Sf6)/d(t) = (Df*(PosSf7-2*PosSf6+PosSf5)/DZ/DZ)-(k*PosSf6/(Ks+PosSf6+Sf6*Sf6))*Xf
[8] d(Sf7)/d(t) = (Df*(PosSf8-2*PosSf7+PosSf6)/DZ/DZ)-(k*PosSf7/(Ks+PosSf7+Sf7*Sf7))*Xf
[9] d(Sf8)/d(t) = 2*Df*(PosSf7-PosSf8)/DZ/DZ+2*Kf*(PosSb-PosSf8)/DZ-Xf*k*PosSf8/(Ks+PosSf8+Sf8*Sf8)
[10] d(Lf)/d(t) = DZ*(2790/10000*(G0+G8)+1661/1000*(G1+G7)-2618/10000*(G2+G6)+
29618/10000*(G3+G5)-128/100*G4)
[11] d(Sb)/d(t) = (Q*(Sb0-PosSb)/V/E)-((Kf*A*(PosSb-PosSf8))/V/E)-(k*PosSb*Xb/(Ks+PosSb))
[12] d(Xb)/d(t) = ((Y*k*PosSb/(Ks+PosSb))-b-Q/V/E)*Xb+ (A*bs*PosLf*Xf/V/E)
[13] d(H)/d(t) = (((1-(142/100)*Y)/4)*(Ks/(Ks+PosSb))*PosXb+(355/1000)*b*PosXb
```

Explicit equations as entered by the user

```
[1] PosSf0 = if (Sf0<0) then (0) else (Sf0)
[2] PosSf1 = if (Sf1<0) then (0) else (Sf1)
[3] PosSf2 = if (Sf2<0) then (0) else (Sf2)
[4] PosSf3 = if (Sf3<0) then (0) else (Sf3)
[5] PosSf4 = if (Sf4<0) then (0) else (Sf4)
[6] PosSf5 = if (Sf5<0) then (0) else (Sf5)
[7] PosSf6 = if (Sf6<0) then (0) else (Sf6)
[8] PosSf7 = if (Sf7<0) then (0) else (Sf7)
[9] PosSf8 = if (Sf8<0) then (0) else (Sf8)
[10] Y = 234/10000
[11] k = 580/100
[12] Ks = 83/100
[13] b = 167/10000
[14] bs = 98/1000
[15] Df = 82/1000000
[16] Kf = 250/100
[17] Xf = 147/100000
[18] E = 7/10
[19] V = 1500/1000000
[20] Q = 100/1000000
[21] A = 235/10000
[22] Sb0 = 60
[23] DZ = Lf/8
[24] G0 = Y*k*PosSf0/(Ks+PosSf0)-b-bs
[25] G1 = Y*k*PosSf1/(Ks+PosSf1)-b-bs
[26] G2 = Y*k*PosSf2/(Ks+PosSf2)-b-bs
[27] G3 = Y*k*PosSf3/(Ks+PosSf3)-b-bs
[28] G4 = Y*k*PosSf4/(Ks+PosSf4)-b-bs
[29] G5 = Y*k*PosSf5/(Ks+PosSf5)-b-bs
[30] G6 = Y*k*PosSf6/(Ks+PosSf6)-b-bs
[31] G7 = Y*k*PosSf7/(Ks+PosSf7)-b-bs
[32] G8 = Y*k*PosSf8/(Ks+PosSf8)-b-bs
[33] PosLf = if (Lf<0) then (0) else (Lf)
[34] PosSb = if (Sb<0) then (0) else (Sb)
[35] PosXb = if (Xb<0) then (0) else (Xb)
[36] FlujoenBiopelícula = -((Kf*A)/(V*E))*(PosSb-PosSf8)
```

```
[37] m = k/(Ks+PosSb)
[38] Ym = 0.4
[39] ProduccionMet = Ym*m*PosXb
```

Independent variable

variable name : t
initial value : 0
final value : 100

Precision

Independent variable accuracy. eps = 0,00001
First stepsize guess. h1 = 0,0001
Minimum allowed stepsize. hmin = 0,00000001
Good steps = 469
Bad steps = 4

General

number of differential equations: 13
number of explicit equations: 39