

**ESTUDIO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS DEL FIQUE**

Autor:

Mabel Juliana Quintero Silva

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

BUCARAMANGA

2011

**ESTUDIO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS DEL FIQUE**

Autor:

Mabel Juliana Quintero Silva

Trabajo de Investigación para optar al grado de Magister en

Ciencias Básicas Biomédicas

Directora:

Claudia Cristina Ortiz López PhD.

Codirectora:

Carolina Guzmán Luna PhD.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

BUCARAMANGA

2011

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible y facilitaron el desarrollo de este proyecto y la construcción de mi sueño... y si se me olvida alguien me perdonan.

A los doctores Caludia Ortiz, Carolina Guzmán y Humberto Escalante.

A Franklin y Andrés y Cristian

A Clara Sánchez, Esperanza Vesga y Esperanza Blanco

A Magda, Alberto, Calorio y a toda mi familia

A Liliana Castro Alex y Angélica y a todos los muchachos del Laboratorio de Biotecnología de la escuela de Ingeniería Química y pasantes de Bacteriología.

¡GRACIAS TOTALES!

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi

*Dedicada a
Cecilia y Herminia*

INDICE GENERAL

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	158
1.1 GENERALIDADES	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	22
3.1 EL FIQUE Y SU INDUSTRIA	22
3.2 DIGESTION ANAEROBIA	23
3.2.1 Etapas de la digestión anaeróbica	24
3.2.2 Grupos microbianos	27
3.2.3 Inóculos utilizados para la producción de gas metano	30
3.2.4 Tipos de residuos utilizados como sustrato para digestión anaeróbica	31
3.2.5 Factores Ambientales que afectan la digestión anaeróbica ...	33
4. METODOLOGÍA	38
4.1 MATERIALES	38
4.1.1 Sustrato	38
4.1.2 Inóculo	38
4.1.3 Medios de cultivo	38
4.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39
4.2.1 Evaluación de la Actividad Hidrolítica de los diferentes consorcios microbianos	39
4.2.2 Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica de diferentes consorcios microbianos	39
4.2.3 Determinación de la Capacidad de Afinidad al sustrato para la producción de biogás a partir de pulpa de fique	41

4.2.4	Selección del mejor consorcio productor de biogás utilizando como os a partir del beneficio del fique	41
4.2.5	Identificación de los grupos tróficos presentes en el consorcio microbiano seleccionado.....	42
4.2.6.	Estudio del efecto de la relación Inóculo/Sustrato.....	43
4.2.7.	Estudio del efecto de las condiciones de cultivo: temperatura, pH, agitación y aireación; utilizando el consorcio previamente seleccionado	44
4.3	METODOLOGÍA ANALÍTICA	45
4.3.1	Caracterización físico química del Sustrato.....	45
4.3.2	Caracterización físico química del Inóculo	456
4.3.3	Determinación de azúcares reductores	46
4.3.4	Medición del biogás	47
4.3.5	Análisis Estadístico de Datos.....	49
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1	Caracterización Físicoquímica de los inóculos.....	50
5.2	Caracterización Físicoquímica del sustrato	50
5.3	Evaluación de la Actividad Hidrolítica de los diferentes consorcios microbianos utilizando celulosa como sustrato.....	51
5.4	Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica de diferentes consorcios microbianos usando acetato como sustrato modelo ...	53
5.5	Determinación de la Afinidad al sustrato para la producción de biogás a partir de pulpa de fique.....	55
5.6	Selección del mejor consorcio productor de biogás utilizando como sustrato los desechos generados a partir del beneficio del fique ..	61
5.7	Determinación de los grupos tróficos presentes en el consorcio microbiano seleccionado.....	64
5.8	Estudio del efecto de la relación sustrato/inóculo utilizando el consorcio seleccionado	66
5.9	Estudio del efecto del pH sobre la digestión anaerobia de la pulpa de fique utilizando el consorcio seleccionado.....	71

5.10 Estudio del efecto de la temperatura, agitación y aireación sobre la digestión anaerobia de la pulpa de fique utilizando el consorcio seleccionado	74
6. CONCLUSIONES	94
7. RECOMENDACIONES	96
8. BLIBLIOGRAFIA	97
9. ANEXOS	104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas del proceso microbiológico 27
- Figura 2.** Cinéticas producción de Azúcares Reductores (mg/ml) para cada inóculo. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando 10 g/L de celulosa como sustrato y medio de cultivo mineral Balch para mantener el pH en un valor de 7, temperatura 39 °C sin agitación. 52
- Figura 3.** Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Azúcares Reductores (ART) de cada uno de los inóculos utilizando 10 g/L de celulosa como sustrato. 53
- Figura 4.** Cinéticas de producción de CH₄ (ml) para cada inóculo. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando 10% v/v de acetato de sodio como sustrato y medio de cultivo mineral Balch para mantener el pH en un valor de 7, temperatura 39 °C sin agitación. 54
- Figura 5.** Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Metano para cada inóculo utilizando 10% v/v de acetato de sodio como sustrato. 55
- Figura 6.** Cinéticas consumo de Azúcares Reductores (mg/ml). Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV, temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación. 56
- Figura 7.** Cinéticas de producción de CH₄ (ml) para cada inóculo. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV

temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.	57
Figura 8. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV.	60
Figura 9. Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Metano utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV.	61
Figura 10. Cinéticas de producción de CH ₄ (ml) Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y relaciones inóculo/sustrato de 0,5; 1 y 2 g SV temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.	67
Figura 11. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad Ensayos realizados utilizando pulpa de fique como sustrato y relaciones inóculo/sustrato de 0,5; 1 y 2 g SV temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.	70
Figura 12. Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Metano utilizando relaciones inóculo/sustrato de 0,5; 1 y 2 g SV.	71
Figura 13. Cinética de producción de metano (ml CH ₄ /día). Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una relación inóculo/sustrato 2 g SV, temperatura 39 °C, sin agitación.	72
Figura 14. Cinética de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para cada una de las fermentaciones. Ensayos realizados a diferentes valores de pH utilizando pulpa de fique como sustrato y una relación inóculo/sustrato 2 g SV, temperatura 39 °C, sin agitación.	73

Figura 15. Distribución de medias y medianas para las cinéticas producción de Metano a diferentes valores de pH, utilizando una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	74
Figura 16. Cinética de producción de metano ml (CH ₄ /día) y cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, sin agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	75
Figura 17. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, sin agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	77
Figura 18. Cinética de producción de metano (ml CH ₄ /día) y cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	79
Figura 19. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	80
Figura 20. Cinética de producción de metano (ml CH ₄ /día) y cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con aireación y sin agitación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	80
Figura 21. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con aireación y sin agitación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	83

Figura 22. Cinéticas de producción de metano (ml CH ₄ /día) y porcentaje cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y con aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	85
Figura 23. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y con aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.	86
Figura 24. Distribución de medias y medianas para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto (Qp ml de Metano*día) a diferentes condiciones de cultivo.	88
Figura 25 Pareto para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto (Qp ml de Metano*día) a diferentes condiciones de cultivo.	89
Figura 26. Efectos Principales para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto (Qp ml de Metano*día) a diferentes condiciones de cultivo.	90
Figura 27. Gráfico de medias y medianas para los Rendimientos Acumulados de Producto en sustrato (m ³ Metano /kg SV) a diferentes condiciones de cultivo.	91
Figura 28. Pareto para los Rendimientos Acumulados de Producto en sustrato (m ³ Metano /kg SV) a diferentes condiciones de cultivo.	91
Figura 29. Efectos Principales para los Rendimientos Acumulados de Producto en sustrato (m ³ Metano /kg SV) a diferentes condiciones de cultivo.	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización Fisicoquímica de los inóculos	50
Tabla 2. Caracterización Fisicoquímica del sustrato	51
Tabla 3. Porcentaje de metano presente en el biogás, para cada uno de los inóculos evaluados. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV, temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.	58
Tabla 4: Caracterización microbiológica del Jugo de Fique	62
Tabla 5. Actividad Hidrolítica y Metanogénica y Afinidad al sustrato de cada inóculo	63
Tabla 6: Caracterización microbiológica de la mezcla LR + EP.	64
Tabla 7. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de diferentes condiciones ambientales: temperatura, agitación y aireación sobre la producción de biogás	75
Tabla 8. Rendimientos y Productividades Acumuladas para cada uno de los ensayos del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de diferentes condiciones ambientales: temperatura, agitación y aireación sobre la producción de biogás	87
Tabla 9. . Análisis estadístico de las variables para aumentar los rendimientos y las productividades de metano.	93

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Medio de cultivo Actividad Hidrolítica	104
ANEXO 2: Medio de cultivo Actividad Metanogénica Específica.	105
ANEXO 3: Medio de cultivo Caracterización Microbiológica	106
ANEXO 4: Tabla estadística para el cálculo del NMP según Mac Grady para 5 tubos por dilución	119
ANEXO 5: Diseño experimental para las variables Temperatura, Agitación y Aireación	120
ANEXO 6: Curva de calibración para la determinación de la concentración de Azúcares Reductores (AR) por el método del ácido 3,5-Di-nitro-salicílico (DNS)	121
ANEXO 7: Cálculo de la Actividad Hidrolítica	122
ANEXO 8: Cálculo de la Actividad Metanogénica	123
ANEXO 9: Cálculo de la Afinidad al sustrato	124
ANEXO 10: Ecuaciones utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos Q_p acumulada y Y_s/p acumulados calculados para las fermentaciones	125

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS DEL FIQUE *

AUTOR: MABELJULIANA QUINTERO SILVA **

PALABRAS CLAVES: *Biodegradación, Pulpa De Fique, Líquido Ruminal, Estiércol De Cerdo, Biogás, Metano, Digestion Anaerobia.*

Se realizaron estudios de actividad hidrolítica, metanogénica y afinidad al sustrato, para seleccionar un inóculo eficiente para degradar pulpa de fique y producir biogás. Los ensayos de actividad hidrolítica y metanogénica fueron realizados utilizando celulosa (10 g/L) y acetato de sodio (10%) como sustratos modelo respectivamente. Los ensayos de afinidad contenían 1g de SV de pulpa de fique/1 g de SV de inóculo. Todos los ensayos fueron realizados en bioreactores de 500 ml e incubados a una temperatura de $39 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todos los días de reacción. El inóculo seleccionado fue la co-digestión estiércol porcino/líquido ruminal obteniendo valores de actividad hidrolítica de 0,071 mg/ml*día, actividad metanogénica de 0,209 gDQO/gSSV*día y afinidad al sustrato de 0,446 m³ CH₄/Kg SV.

Al inóculo seleccionado se le realizó identificación de grupos tróficos utilizando la técnica del número más probable (NMP). Los grupos diferenciados fueron Bacterias fermentativas, Sulfato reductoras, Sintróficas y Metanogénicas.

Posteriormente, se determinó de la relación inóculo/sustrato óptima para el proceso. Los ensayos realizados utilizaron relaciones inóculo/sustrato de 0,5, 1 y 2 g de SST y un volumen de operación de 500 ml. El tiempo de reacción fue de 15 días y la temperatura se mantuvo a $39 \pm 2^\circ\text{C}$. Los mejores rendimientos de metano (0,44 m³ CH₄/Kg SV) fueron alcanzados utilizando la relación de 2 g SST.

Finalmente, se utilizó un diseño experimental 2³ para evaluar el efecto las condiciones de cultivo (temperatura, agitación y aireación) en la degradación anaerobia de la pulpa de fique. Los experimentos fueron realizados en reactores de 500 ml, utilizando la relación inóculo/sustrato seleccionada. El tiempo de incubación fue de 15 días. Los resultados obtenidos mostraron que las mejores condiciones de cultivo para el proceso fueron: temperatura de 25 °C, agitación de 120 rpm y tiempo de aireación de 0 horas.

* Trabajo de investigación

** Facultad de Salud. Departamento de ciencias básicas.

Directora: Claudia Cristina Ortiz López PhD.

Codirectora: Carolina Guzmán Luna PhD.

ABSTRACT

TITLE: SCREENING OF MICROBIAL CONSORTIA FOR ANAEROBIC DEGRADATION OF FIGUE PULP WASTES *

AUTOR: MABELJULIANA QUINTERO SILVA **

KEYWORDS: *Biodegradation, Figue pulp, Ruminant liquid, Pig waste sludge, Biogas, Methane, Anaerobic Digestion.*

This work presents a study of the selection of an appropriate inoculum for Figue pulp degradation and biogas production using the hydrolytic and methanogenic activities of the inoculum, as well as, its affinity towards the substrate. Experimental tests of methanogenic and hydrolytic activity were done in using model substrates, such as, cellulose (10 g/L) and sodium acetate (10 %), respectively. Affinity substrate tests were made using a ratio of 1 g SV Figue pulp/ 1 g SV inoculum. All essays was made in 500 ml bioreactors using an incubation temperature of $39 \pm 2^\circ\text{C}$ during all days of reaction. Co-digestion made by the combination of ruminant liquid and pig manure was selected as the adequate inoculum for the anaerobic figue pulp degradation, thus reaching hydrolytic and methanogenic activities values of 0,071/mg.mL.day, and 0,209 gDQO/gSSV*day, respectively, and also, it was reached 0,446 m³ CH₄/Kg SV for substrate affinity.

The trophic groups for the selected inoculums were identified. This procedure was done using the most probable number technique (MPN). The different groups that found were; fermentative bacteria, sulphate reducers bacteria, methanogenic and Sinterotrophic bacteria.

Moreover, it was identified the optimum inoculum/substrate ratio for the process. Several experiments were made using inoculum/substrate ratios of 0,5, 1 and 2 g SST, in 500 mL bioreactors. The biodigestion process was followed during 15 consecutive days at $39 \pm 2^\circ\text{C}$. The highest values of methane production; 0,44 m³ CH₄/Kg SV, were reached using an inoculums/substrate ratio of 2 g SST.

In addition, the effect of the culture parameters (temperature, agitation and aeration time) was analyzed using a 2³ experimental design. Experiments to determine the most favorable conditions for operation were made on 500 mL biorreactors, using an inoculum/substrate ratio of 2 g SS. Results showed that optimum conditions for the methane production, using figue pulp, were achieved at 25 °C with a agitation of 120 rpm and aeration time 0 hours.

* Research Paper

** Faculty of Health. Basic Science Department.
Director: Claudia Cristina Ortiz López PhD.
Co-director: Carolina Guzman Luna PhD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

En Colombia existen aproximadamente 24.000 hectáreas sembradas de fique (*Furcraea* sp, familia *Agavaceae*), de las cuales únicamente el 3% es destinado a la producción de la fibra que se utiliza para la elaboración de productos artesanales. El 97% restante corresponde a desechos (jugo y bagazo), los cuales son eliminados directamente en suelo y agua, ocasionando graves problemas de contaminación [1].

La composición fisicoquímica de la pulpa de fique indica que estos residuos pueden ser utilizados como sustrato para la producción de biogás [2]. En general, el residuo se caracteriza por tener en su estructura polímeros complejos como celulosa, hemicelulosa y lignina. Por lo tanto la degradación de la pulpa requiere de microorganismos capaces de hidrolizar o romper estos polímeros hasta compuestos simples como azúcares y ácidos grasos [3]. De esta manera, la selección del consorcio microbiano constituye una etapa determinante del bioproceso de digestión anaerobia [4-9].

La digestión anaerobia se realiza en cuatro etapas: a) hidrolítica, b) acidogénica, c) acetogénica y d) metanogénica. Estas etapas son desarrolladas por consorcios microbianos que actúan en sintrofia [4, 5, 8, 10]. Durante la etapa hidrolítica se generan compuestos mono y policarbonados a partir de los compuestos orgánicos iniciales (celulosa, almidones, proteínas y grasas). Durante la etapa acidogénica se producen ácidos orgánicos volátiles (acetato, propionato, butirato, valerato), dióxido de carbono e hidrógeno. Posteriormente durante la etapa de acetogénica se sintetizan acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente en la etapa metanogénica se obtienen gas metano y

dióxido de carbono, como productos mayoritarios del proceso metabólico [4, 10].

Para llevar a cabo la producción de gas metano, se han utilizado diferentes consorcios microbianos que incluyen lodo anaerobio proveniente de plantas de tratamiento primario de aguas residuales, líquido ruminal, estiércol porcino o bovino, compost y cultivos puros de microorganismos [11-16]. Otra alternativa para aumentar la biodegradabilidad del sustrato es la co-digestión, que consiste en mezclar consorcios de diferentes fuentes y proporciones [17-21]. La selección de un inóculo apropiado para la degradación metabólica de un sustrato hacia metano depende de su actividad hidrolítica, metanogénica y su capacidad de afinidad al sustrato, de acuerdo con las siguientes definiciones [3, 6-8].

-La Actividad Hidrolítica (AH) indica la habilidad inherente de una población microbiana para degradar fuentes de carbono (celulosa, almidón, etc); se cuantifica como la velocidad específica de consumo de sustrato [3, 22, 23].

-La Actividad Metanogénica Específica (AME) se refiere a la capacidad de la biomasa microbiana para transformar la materia orgánica en metano; se expresa como la masa de sustrato, en términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO) que es convertida a metano, por unidad de biomasa y por unidad de tiempo (gDQO-CH₄/gSSV día) [8].

-La Capacidad de Afinidad al sustrato (CAS) corresponde a la habilidad que tienen los microorganismos para producir gas metano a partir de un sustrato determinado [4].

La presencia de los diferentes grupos tróficos es determinante al momento de llevar a cabo las cuatro etapas necesarias para la producción de metano [8], por lo tanto, el estudio de las diferentes poblaciones microbianas (metabólicamente activas) presentes en un consorcio metanogénico y su cuantificación, sirven para evaluar su el desarrollo del bioproceso. De igual

forma es importante determinar las condiciones de operación a las cuales será desarrollado el proceso de digestión anaerobia, ya que los consorcios son sensibles a cambios ambientales bruscos [4, 5, 24].

En este trabajo de investigación se realizará el estudio de diferentes consorcios microbianos para producción de gas metano, a partir de residuos obtenidos del beneficio del fique cultivado en Mogotes, Santander. Inicialmente, se seleccionará el mejor inóculo teniendo en cuenta los valores máximos de rendimiento de producto en sustrato (Y_p/s), definido como concentración de gas metano producido por unidad de sustrato. La determinación se realizará con base en la AH, la AME y la CAS. Posteriormente, se realizará una caracterización microbiológica del consorcio microbiano seleccionado para determinar los grupos tróficos presentes. Finalmente, se evaluarán las mejores condiciones de producción a escala de laboratorio, teniendo en cuenta la actividad metanogénica y eficiencia de biodegradabilidad de sustrato.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes consorcios microbianos para la producción de biogás utilizando como sustrato los desechos generados del beneficio del fique.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la capacidad de diferentes consorcios microbianos para producir biogás, utilizando acetato como sustrato modelo.

Evaluar la capacidad hidrolítica de diferentes consorcios microbianos productores de biogás, utilizando celulosa como sustrato modelo.

Determinar la capacidad de afinidad de diferentes consorcios microbianos al sustrato (pulpa de fique) para la producción de biogás.

Seleccionar el mejor consorcio productor de biogás utilizando como sustrato los desechos generados a partir del beneficio del fique.

Determinar los grupos tróficos presentes en el consorcio microbiano seleccionado.

Estudiar el efecto de las condiciones de cultivo: temperatura, pH, agitación, aireación y relación sustrato/inóculo utilizando el consorcio previamente seleccionado.

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1 EL FIQUE Y SU INDUSTRIA

La planta de fique pertenece a la familia *Agavaceae* y al Género *Furcraeasp*, es tropical y crece en la mayoría de climas del país. El fique se ha utilizado mundialmente para extraer su fibra, llamada “cabuya”. En Colombia y países como Bangladesh, India, China, Tailandia y Brasil se ha utilizado industrialmente para elaborar hamacas, redes, empaques, artesanías, sogas, cordeles, agromantos, geotextiles, entre otros [1]. En Tanzania se ha investigado ampliamente acerca de la producción de biogás a partir de los desechos generados durante el beneficio del fique. Los primeros resultados se obtuvieron mezclando pulpa de fique con desechos de pescado obteniendo una producción entre el 59 – 94 % de metano [12].

En Colombia, se estima que existen 24 mil hectáreas sembradas de fique. El beneficio genera anualmente, alrededor de 500 millones de kilos y/o litros de subproductos provenientes de los jugos y bagazos [25]. En consecuencia, se produce una problemática ambiental debida a la acumulación de estos residuos.

Actualmente el país cuenta con cuatro industrias procesadoras de fibra: Coohilados del Fonce, Compañía de Empaques S.A., Empaques del Cauca S.A. e Hilanderías Colombia Ltda. Adicionalmente se encuentran alrededor de 3000 talleres familiares para la producción artesanal de empaques. Los principales departamentos productores de fique en el país son Cauca, Nariño, Antioquia, Santander y Boyacá [1].

Santander es el segundo productor de fique a nivel nacional. Los cultivos se ubican en los municipios de Mogotes, San Joaquín, Onzaga, Curití, San Gil y

Aratoca, donde existen aproximadamente 3.369 hogares de economía campesina (alrededor de 20.000 personas), dedicados a este renglón productivo en un área cultivada de 4.446 hectáreas, con una productividad de 1060 Kg/ha al año [1]. En relación con el desarrollo de productos alternativos en nuestro departamento, se destacan el Centro de Investigación en Celulosa y Papel-CICELPA, en la producción de papel a partir de la fibra de fique, CORPOICA, en el manejo agronómico y control de plagas y la Corporación Bucaramanga Emprendedora, en gestión tecnológica. Sin embargo, el nivel de desarrollo tecnológico e investigativo adelantado por parte de los actores de la cadena productiva es mínimo.

Adicionalmente, se han adelantado importantes investigaciones dirigidas hacia el aprovechamiento del jugo, el bagazo y la fibra, en la producción de nuevos materiales relacionados con la obtención de compuestos activos farmacéuticos, agentes tensoactivos, bioinsecticidas, papel y fibrorreforzados [26, 27]. En el departamento de Nariño, las investigaciones sobre el jugo del fique demostraron la presencia de hecogenina y tigogenina. La hecogenina es un compuesto activo de más de cien medicamentos utilizados para el tratamiento de deficiencias suprarrenales, enfermedades de piel, cuadros inflamatorios, impotencia y otras necesidades relacionadas con la salud. Adicionalmente se ha reportado que existe deficiencia de hecogenina a nivel mundial [28]. Sin embargo, pocos investigadores han trabajado sobre la producción de biogás a partir del fique ya que es un residuo lignocelulósico y contiene una alta concentración de saponinas, que pueden inhibir el metabolismo de los microorganismos metanogénicos [28, 29].

3.2DIGESTION ANAEROBIA

La digestión anaerobia se define como el proceso biológico en el que la materia orgánica se metaboliza en un ambiente libre de O₂ o precursores de este. Este proceso se lleva a cabo mediante fermentación anaeróbica y/o respiración anaeróbica en función del tipo de receptores de electrones [4].

Durante la fermentación anaeróbica la materia orgánica se cataboliza por acción de microorganismos anaerobios estrictos o facultativos. Este proceso degradativo se realiza principalmente por reacciones de oxido-reducción en ausencia de un aceptor de electrones externo haciendo que se genere poca energía a partir del sustrato. Sin embargo 2/3 del metano total producido se genera mediante fermentación anaeróbica, en la cual el acetato actúa como donante y aceptor de electrones al mismo tiempo. La producción de metano por esta vía se conoce como metanogénesis acetoclástica [4].

En cuanto a la respiración anaeróbica, es un proceso que exige un aceptor de electrones externo como CO_2 , $(\text{SO}_4)^{2-}$ ó NO^{3-} para la eliminación de los electrones generados durante la degradación de la materia orgánica. En esta etapa se libera mayor energía que en la etapa de fermentación, sin embargo se genera 1/3 del total del metano producido [4]. Cuando el CO_2 actúa como aceptor de electrones, este se reduce finalmente a metano. La producción de metano por esta vía se conoce como metanogénesis hidrogenofílica. Algunos microorganismos como los homoacetógenos utilizan el CO_2 como aceptor de electrones para reducir el H_2 y producir ácido acético, el cual es el principal precursor del metano [4, 5]. Por otra parte La presencia de $(\text{SO}_4)^{2-}$ como aceptor de electrones en un ambiente anaerobio desvía parte de la materia orgánica hacia la reducción de sulfatos por Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), lo que no es muy conveniente para el bioproceso [4, 5, 10, 30].

Independientemente de la vía por la cual se desarrolle el proceso digestión anaeróbica ya sea fermentación o respiración, deben ocurrir cuatro etapas (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis) para realizar la producción final de metano.

3.2.1 Etapas de la digestión anaeróbica

La transformación de las macromoléculas complejas, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono (polisacáridos), y los lípidos presentes en la materia orgánica, en productos tales como el metano y el dióxido de carbono se logra a través de cuatro etapas metabólicas mediadas por varios grupos de

microorganismos [4, 5, 10, 31]. Estas macromoléculas son transformadas en compuestos simples y solubles, como aminoácidos, azúcares, ácidos grasos de cadena larga y glicerina, por acción de enzimas extracelulares excretadas por bacterias fermentativas (grupo 1). Este paso es comúnmente conocido como **Hidrólisis o licuefacción**. La etapa de hidrólisis puede ser un paso limitante en los procesos de tratamiento anaerobio [4, 5, 10, 31].

Los productos solubles generados por las bacterias fermentativas en la etapa hidrolítica del proceso son convertidos en una mezcla de ácidos orgánicos, hidrógeno y dióxido de carbono. Esta etapa se conoce como **Acidogénesis**, que es la generación de ácidos grasos volátiles (AGV), como el ácido propiónico y butírico. Estos AGV junto con el etanol se convierten en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono por acción de otro grupo de bacterias, conocidas como bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno (grupo 2), durante la etapa de **Acetogénesis** [4, 5, 10, 31].

El acetato, el H_2 , y el CO_2 generados en la etapa anterior, son los sustratos primarios para la **Metanogénesis**. Esta variedad de intermediarios, hace que la metanogénesis, etapa final del proceso de digestión anaeróbica, se realice a través de tres vías principales: metanogénesis hidrogenofílica, metanogénesis acetoclástica, y la vía metilotrófica. El desarrollo del proceso de producción de biogás por cualquiera de estas tres vías, depende del sustrato que se encuentre en mayor concentración en el medio [4, 5, 10, 31].

La metanogénesis hidrogenofílica es realizada por bacterias metanogénicas hidrogenofílicas (grupo 4). Estas bacterias utilizan el H_2 producto del catabolismo de otras bacterias del sistema, como bacterias fermentativas, especialmente clostridios y bacterias acetogénicas para la producción de metano. Esta vía contribuye con la generación de un 28% del metano de un proceso de tratamiento anaerobio [32].

La metanogénesis acetoclástica es un proceso catabólico que contribuye en la generación del 72% del total del metano producido. En esta vía el acetato es convertido en metano. Los grupos de microorganismos implicados en la

generación de metano a partir de acetato se conocen como bacterias metanogénicas acetoclásticas (grupo 5) [31]. Dado que el metano es generado principalmente a partir de acetato (producción acetoclástica) esta etapa también puede ser otro paso limitante en el tratamiento anaerobio de residuos [31].

Finalmente la vía metilotrónica cataboliza compuestos que contienen grupos metilo, como el metanol, las mono-, di-, y trimetilaminas, y el sulfuro de dimetilo. El grupo metilo es transferido a un compuesto aceptor de grupos metilos y posteriormente es reducido a metano. Los electrones para la reducción del metilo se pueden obtener mediante la oxidación de una fracción de los grupos metilo a CO_2 o mediante el uso de H_2 como un donante de electrones [4, 31]. Esta vía es realizada por bacterias homoacetógenas (grupo 3), pero no ha sido ampliamente estudiada.

El objetivo final de cada una de estas etapas además de la producción de metano es la estabilización anaeróbica de residuos un residuo, y para lograr esto debe existir una relación simbiótica o sintrónica entre los microorganismos hidrolíticos, acetógenos y metanógenos. Esta relación simbiótica mantiene el sistema anaeróbico bien equilibrado [4, 5, 10, 31].

aminoácidos, se fermentan a AGV, CO_2 , H_2 , NH_4^+ , y S_2^- por acción de bacterias fermentativas como los clostridios [4, 5, 10, 31].

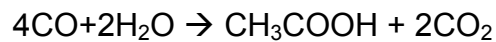
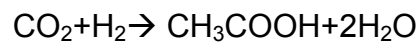
Los diversos tipos de sustratos y las condiciones ambientales determinan la generación de los productos finales del metabolismo. Por ejemplo una baja presión parcial de hidrógeno, favorece la formación de acetato, CO_2 y H_2 que son los principales sustratos para los microorganismos metanógenos. Es por esto que la regulación de la presencia de H_2 es importante [4, 5, 10, 31].

- Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno (grupo 2): Este grupo de bacterias metaboliza ácidos orgánicos de tres carbonos o más (propionato, butirato, etc), etanol, y algunos compuestos aromáticos como benzoato convirtiéndolos en acetato, H_2 y CO_2 . Sin embargo para que los microorganismos pertenecientes a este grupo realicen sus funciones metabólicas adecuadamente, debe existir una relación simbiótica con bacterias metanogénicas hidrogenofílicas. Esto se debe a que el consumo de hidrógeno por parte de las bacterias metanogénicas, mantiene bajo el nivel de la presión parcial del hidrógeno, proporcionando un ambiente favorable para que las bacterias acetogénicas degraden los compuestos orgánicos mencionados en acetato, H_2 y CO_2 [4, 5, 10, 31, 32]. El proceso anterior es comúnmente conocido como transferencia entre especies de hidrógeno y su importancia radica en la asociación que tiene con la oxidación del propionato. La acumulación de este ácido orgánico puede generar inhibición de la metanogénesis. Es por esto que la configuración del reactor, los suplementos de nutrientes, y las características del sustrato, son importantes para mejorar el metabolismo del ácido propiónico [32].

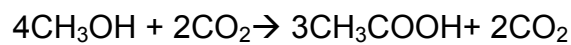
- Bacterias homoacetógenas (grupo 3): Las bacterias homoacetógenas se denominan así porque realizan la síntesis de acetato como producto principal de su metabolismo a partir de fuentes diferentes a los ácidos orgánicos como CO_2 y metanol. Estas bacterias pueden ser autótrofas o heterótrofas. Las bacterias homoacetógenas autótrofas utilizan una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (el CO_2 actúa como fuente de carbono) para realizar los procesos de síntesis de la célula. Algunos homoacetógenos pueden utilizar

monóxido de carbono como fuente de carbono. Las bacterias homoacetógenas heterótrofas utilizan sustratos orgánicos tales como formiato y metanol como fuente de carbono, para la generación de acetato como producto final [4, 5, 10, 31].

- Bacterias homoacetógenas autótrofas [5, 8]



- Bacterias homoacetógenas heterótrofas [5,8]



- Bacterias metanogénicas (grupo 4 y 5): Los microorganismos Metanógenos en la actualidad se encuentran clasificación taxonómicamente en el dominio *Archaea* (antes estaban clasificados dominio *Bacteria*), teniendo en cuenta sus características físicas genéticas y filogenéticas. Este grupo es exclusivo de los microorganismos se diferencian de la bacterias verdaderas por la ausencia de lípidos de membrana (por ejemplo, peptidoglicano), además de la ausencia de RNA ribosomal. Los Metanógenos son microorganismos anaerobios obligados, abundantes en la naturaleza, se encuentran en ambientes anaeróbicos ricos en materia orgánica, tales como pantanos, ciénagas, lagunas, sedimentos lacustres y marinos, y el rumen de los animales [4, 5, 10, 31].

- Bacterias metanogénicas hidrogenofílicas: Los géneros de metanobacterias hidrogenofílicas más frecuentes en reactores anaerobios son *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, y *Methanobrevibacter*. Estos microorganismos utilizan H_2/CO_2 como sustratos para realizar la producción de metano.
- Bacterias metanogénicas acetoclasticas: Los dos géneros más importantes de este grupo son *Methanosaeta* y *Methanosarcina* (anteriormente conocidos como *Methanothrix*). *Methanosarcina*, presenta una morfología esférica (coco) formando racimos grandes,

puede utilizar varios sustratos además del acetato para la producción de metano como el metanol, las metilaminas y a veces H_2/CO_2 . Por otra parte *Methanosaeta*, se caracteriza morfológicamente por ser bacilo y crece sólo en presencia de acetato [31]

Estos grupos microbianos no se encuentran libremente en la naturaleza, de manera contraria, se encuentran asociados en consorcios bacterianos, dentro de los cuales pueden establecer las diferentes relaciones metabólicas para su desarrollo y crecimiento. Algunos de los diferentes consorcios microbianos metanogénicos se describen en el siguiente numeral.

3.2.3 Inóculos utilizados para la producción de gas metano

La hidrólisis o conversión biológica de la celulosa y los demás componentes presentes en la materia orgánica, se puede realizar utilizando diferentes consorcios de microorganismos anaerobios como inóculo o cultivo primario. Los inóculos más estudiados son el lodo anaerobio proveniente de plantas de tratamiento primario de aguas residuales (lodo PTAR) y el líquido ruminal [33, 34]. Sin embargo, en países como China y México se han utilizado inóculos obtenidos a partir de otras fuentes como lixiviados de vertedero, estiércol de cerdo o vaca, compostaje, cultivos puros de microorganismos aislados de diferentes ambientes [11, 12, 35].

El líquido ruminal ha sido ampliamente estudiado como inóculo o cultivo primario para el arranque de reactores metanogénicos, debido a la alta actividad metanogénica y celulolítica que presenta. Estos microorganismos, poseen una alta capacidad para descomponer polisacáridos como la celulosa, lignocelulosa y hemicelulosa a sus respectivos monómeros. De esta manera, se ha demostrado una mayor eficiencia de los reactores, cuando se utilizan microorganismos ruminales en vez de lodos anaerobios, en procesos de degradación de sustratos vegetales [11, 13, 14].

El estiércol bovino y el estiércol de cerdo poseen una alta eficiencia en la producción de metano, y la posibilidad de adaptarse fácilmente a diferentes

sustratos. Estas características los convierte en excelentes inóculos para la digestión anaerobia de residuos [36]. Por otro lado, el uso del lodo PTAR es interesante, debido a los altos rendimientos de producción de CH₄ obtenidos (aproximadamente entre 70 y 85%). Sin embargo, este último posee una baja afinidad por sustratos de tipo vegetal [7].

Para mejorar los porcentajes de rendimiento de biogás en países como Estados Unidos y España, se han utilizado sistemas de co-digestión, realizando mezclas de estos inóculos, en diferentes proporciones, con el fin de aumentar la biodegradabilidad del sustrato [17-19].

La elección del tipo de inóculo, o de la mezcla a utilizar, en el caso de la co-digestión, depende del rendimiento y producción de metano por unidad de sustrato. Es decir, por su actividad hidrolítica, metanogénica y su afinidad al sustrato.

3.2.4 Tipos de residuos utilizados como sustrato para digestión anaeróbica

Con el fin de aprovechar la maquinaria metabólica que presentan los microorganismos y hacer un uso integral de la materia orgánica, el hombre ha desarrollado procesos fermentativos para obtener productos de mayor interés y valor agregado. Un ejemplo de ello es el desarrollo de procesos para convertir la biomasa residual en energía [37].

Los procesos de recuperación por bioconversión anaerobia, se pueden iniciar a partir de diferentes residuos como desechos agroindustriales, desechos sólidos (estiércoles de animales) y desechos líquidos (aguas residuales domésticas y lodos). El producto principal obtenido del tratamiento de estos residuos es el biogás que es una mezcla de gases compuesta principalmente por metano y que puede ser utilizado como combustible. Adicionalmente se obtienen otros subproductos que pueden ser utilizados

posteriormente en otros procesos. A continuación se presentan los principales residuos utilizados:

- Desechos industriales: Los residuos de industrias alimenticias o destilerías presentan un buen potencial para la aplicación en procesos de digestión anaerobia. El bagazo de caña de azúcar y las aguas residuales de esta industria, constituyen un sustrato clásico para la producción de biogás. Igualmente los desechos de papa, frutas, vegetales y aguas residuales de la industria láctea han sido usados para este fin.
- Desechos animales y biomasa agrícola: La digestión anaerobia es un proceso que presenta una alternativa para el tratamiento de residuos agrícolas como el estiércol de cerdo, biomasa lignocelulósica recalcitrante, bagazo de maíz entre otros, ya que aumenta la digestibilidad de estos materiales y presenta altos rendimientos en la producción de metano.
- Desechos domésticos y municipales: Desde el siglo XIX en muchos países de Europa se han realizado procesos de digestión anaerobia utilizando como sustrato desechos domésticos y aguas residuales, con el fin de reducir los problemas de contaminación y bioacumulación de estos residuos.

En países como España, India, Suecia y Austria, se han utilizado desechos de oliva, maíz, remolacha, y otros desechos urbanos, para la obtención de metano como energía renovable, obteniendo altos rendimientos de producción [15, 36, 38-40]. En Turquía y Japón se han utilizado desechos provenientes del algodón y desechos sólidos de plantas acuáticas para la producción de biogás [41, 42]. Igualmente en Rusia se han aprovechado los desechos sólidos de la papa y la cebolla para la obtención de gas metano [34].

En Colombia, se han utilizado desechos orgánicos urbanos y desechos agrícolas como estiércol de cerdo, para la producción de biogás, alcanzando altos rendimientos [25, 33, 43]. Sin embargo, un sustrato que despierta gran interés para ser utilizado en sistemas de bioconversión anaerobia, es el residuo generado durante el beneficio del fique. Este residuo está constituido por un

70% de pulpa vegetal que contiene celulosa, sacarosa, glucosa, fructuosa y otros compuestos, que lo hacen un sustrato viable para la degradación por microorganismos metanogénicos [1].

3.2.5 Factores Ambientales que afectan la digestión anaeróbica

Los microorganismos anaerobios, especialmente los metanogénicos son altamente susceptibles a cambios en las condiciones ambientales. La alta vulnerabilidad de las bacterias metanogénicas y la tasa de crecimiento extremadamente baja de un sistema de tratamiento anaerobio, hacen que se requiera de un cuidadoso mantenimiento y vigilancia de las condiciones medioambientales. Algunas de estas condiciones ambientales son la temperatura, el pH, sustancias tóxicas, y el potencial redox, la agitación y la aireación.

3.2.5.1 Temperatura

Los procesos anaeróbicos, son mucho más dependientes de la temperatura que otros sistemas biológicos. En un sistema anaeróbico, existen tres rangos de temperatura óptima para la metanogénesis: psicrófila, mesófila y termófila. Los tipos de conversión anaeróbica generalmente aumentan con la temperatura hasta los 60 °C. La conversión anaeróbica tiene su máxima eficacia en 5 - 15 °C para psicrófilos, 35 - 40 °C mesófilos, y cerca de 55 °C para termófilos [4, 5].

La temperatura tiene un efecto significativo sobre la cinética de crecimiento, el rendimiento de biomasa y producto, por tanto, los procesos termófilos presentan mayores rendimientos que los procesos realizados a temperaturas psicrófilas y mesófilas [4, 5]. Además de los procesos de digestión anaerobia termófilos hay reducción del tiempo de estabilización en comparación con los procesos mesófilos debido al crecimiento más rápido de los microorganismos. Sin embargo, los procesos termófilos poseen desventajas como una mayor

susceptibilidad a la concentración y tipo de sustrato y a los agentes tóxicos [4, 5].

Por otra parte, algunas investigaciones sugieren que los procesos anaeróbicos son capaces de estabilizar la variación de temperatura. La actividad disminuye cuando la temperatura se reduce, pero se recupera inmediatamente cuando la temperatura descienda a un valor óptimo.

3.2.5.2 pH y Alcalinidad

Los resultados del tratamiento anaeróbico se ven afectados por leves cambios en el pH. Los microorganismos metanógenos son más susceptibles a la variación del pH que otros microorganismos presentes en el consorcio microbiano. Los microorganismos anaerobios se pueden agrupar en dos grupos teniendo en cuenta el pH: los acidogénicos (pH entre 5,5 – 6,5) y los metanogénicos (pH entre 7,8 – 8,2). El pH óptimo para una combinación de estos microorganismos está en un rango 6,8 a 7,4; con un valor óptimo de 7 [4, 5, 31].

La actividad Metanogénica en función del pH muestra una drástica disminución a valores de pH superiores de 8,0 e inferiores a 6,5. El aumento del pH podría ser explicado por el cambio de NH_4^+ a un compuesto más tóxico en forma de NH_3 . Por otra parte en el proceso de tratamiento anaerobio, la caída en el pH es a menudo causada por la acumulación de AGV y / o la generación excesiva de dióxido de carbono [4, 5, 31].

Sin embargo los sistemas de tratamiento anaerobio poseen la capacidad de amortiguar o mitigar los cambios de pH de manera eficiente, por la alcalinidad natural generada por el sistema, producto de la degradación de la materia orgánica (COHNS), principalmente de las proteínas. Cada mol de compuestos orgánicos de nitrógeno en teoría genera un equivalente de alcalinidad, entonces el N-amonio reacciona con el dióxido de carbono produciendo durante la reacción bioquímica bicarbonato de amonio, lo que contribuye a la alcalinidad [4, 5, 31]. Cuando AGVs comienzan a acumularse en el reactor

anaeróbico, y se neutralizan por la alcalinidad presente en el reactor, el pH se mantiene estable [4, 5, 31].

La estabilidad de un sistema de tratamiento anaerobio también puede ser evaluada por la relación AGV/ALK (alcalinidad). Para el tratamiento anaerobio, esta relación debe ser de 0,1 – 0,25; para que sea favorable para el sistema y no haya riesgo de acidificación. Un aumento de esta relación por encima de 0,3 – 0,4 indica fallas en el digestor y son necesarias medidas correctivas. Una relación de 0,8 o superior, significa reducción del pH, inhibición de la producción de metano y el fracaso del digestor [4]. El pH deseado durante la operación del reactor puede lograrse ya sea controlando el efluente de alimentación o el pH en el reactor en sí.

3.2.5.3 Materiales Tóxicos

La toxicidad de los procesos anaeróbicos, está mediada por el afluente de sustancias presentes en los residuos como, metales pesados, compuestos halogenados, cianuro, y el fenol, o subproductos de las actividades metabólicas de los microorganismos como el amoníaco, los sulfuros, y los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs). En algunos casos, la tolerancia se manifiesta por la afinidad de los microorganismos a las sustancias tóxicas. Estas observaciones constituyen un avance importante para la viabilidad del tratamiento anaerobio en situaciones difíciles, en particular para el tratamiento de aguas y otros residuos industriales que contienen concentraciones significativas de compuestos tóxicos [4, 5, 10, 32].

- **Amonio:** Muchos desechos agroindustriales, especialmente los que están relacionados con la crianza y procesamiento de ganado, generan altos niveles de amoníaco. El amoníaco puede estar presente en el residuo utilizado como sustrato para el reactor o puede ser producido durante la degradación anaeróbica de los compuestos orgánicos nitrogenados como las proteínas o aminoácidos. El tratamiento anaeróbico de estos residuos a menudo no tiene éxito, debido a altas concentraciones de este compuesto [4, 5, 10, 32]. Concentraciones de amoníaco entre 50 y 1000 mg/L no presentan reacciones

adversas, pero concentraciones superiores a 1500 mg/L presentan inhibición de la metanogénesis por efecto tóxico.

El nitrógeno libre del NH_3 es la forma más tóxica del nitrógeno para los microorganismos metanogénicos, ya que el amoníaco o la molécula no ionizada del nitrógeno pueden penetrar a la célula a través de la membrana celular y en concentraciones muy bajas es capaz de causar la muerte celular. La toxicidad del amonio puede aumentar con la temperatura, los sistemas anaerobios termófilos son más susceptibles al amonio que los sistemas anaerobios mesófilos, esto ocurre porque en los sistemas mesófilos los microorganismos sufren un proceso de afinidad a concentraciones aumentadas de amonio [4, 5, 10, 32]. Por otra parte, el ión amonio (NH_4^+) es menos tóxico para las poblaciones microbianas del consorcio, ya que ayuda a mantener la neutralidad del reactor [4, 5, 10, 32].

- **Toxicidad de los Sulfuros:** El sulfuro se produce durante el tratamiento anaeróbico de los efluentes que contengan residuos de azufre y que además sean ricos en bacterias sulfato-reductoras. El sulfuro también es producido durante la degradación del azufre que contiene la materia orgánica (proteínas) presentes en los residuos, tales como el estiércol de cerdo. El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es considerado tóxico para los microorganismos metanógenos por presentar una forma ionizada [4, 5, 10, 30, 32].

- **Ácidos Grasos Volátiles:** El nivel de los AGV es un indicador de la estabilidad de un sistema. Durante la degradación anaeróbica, la materia orgánica compleja hidrolizada genera compuestos de menor peso molecular, incluyendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (C-2-C-6). Esto incluye principalmente acético, propiónico y butírico y cantidades menores de isobutírico, isovalérico, y caproico. En un sistema anaeróbico eficiente, la concentración de AGVs en el efluente es relativamente baja. Sin embargo cuando la relación simbiótica entre microorganismos acidogénicos y metanogénicos se rompe, los AGVs se acumulan [4, 5, 8, 31].

La inhibición de los microorganismos metanogénicos debido a la toxicidad, a cambios en los factores ambientales, o a las condiciones de limitación de nutrientes provoca la acumulación de AGVs principalmente acetato, además de hidrógeno, ocasionando a su vez una disminución de los valores de pH. Pero este efecto negativo causado por la acumulación de AGVs se puede mitigar manteniendo el pH dentro del rango óptimo (6.8 - 7.4).

- **Potencial de Oxidación–Reducción:** Para favorecer el crecimiento de un microorganismo anaerobio estricto en cualquier medio, el cultivo debe mantener un potencial de óxido reducción cercano a -200 a -350 mV a pH 7.0. Esto porque los microorganismos metanogénicos requieren de un entorno altamente reducido. Para alcanzar las condiciones de óxido reducción necesarias en el medio, se pueden utilizar agentes como el sulfuro de sodio, la cisteína, o el titanio III [5].

3.2.5.4 Agitación

Se realiza cuando se necesita obtener mezclas homogéneas entre el sustrato o alimento de reactor y los microorganismos presentes en el consorcio metanogénico, debido al alto contenido de sólidos de los mismos. Por otra parte la agitación brinda ventajas al proceso como una distribución adecuada de los nutrientes, distribuye homogéneamente el calor dentro del reactor y previene la acumulación de sustancias tóxicas como los AGVs. La agitación usada en procesos de digestión anaeróbica pueden ser de dos tipos mecánica por recirculación de gas y el uso de una u otra depende del tamaño del reactor y de la disposición de tecnología [5].

3.2.5.5 Aireación

Otra condición poco explorada en procesos de digestión anaerobia es la administración periódica de oxígeno en el sistema. La oxigenación moderada ayuda a eliminar el exceso de AGVs generados por los microorganismos facultativos y estimula la etapa hidrolítica del bioproceso. Por lo anterior la aireación favorece la degradación de sustratos complejos y se considera como un pre-tratamiento aeróbico para mejorar la digestión anaeróbica [5].

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

4.1.1 Sustrato

La pulpa de fique se recolectó en una planta de beneficio ubicada en Mogotes, Colombia, y posteriormente fue caracterizada.

4.1.2 Inóculo

Inicialmente se evaluaron microorganismos nativos aislados de muestras de bagazo y jugo como inóculo metanogénico para la producción de Biogás a partir de pulpa de fique.

Posteriormente se evaluaron siete nuevos consorcios microbianos que incluyeron: Líquido Ruminal (LR) y Estiércol Bovino (EB) recolectados en el frigorífico municipal (Bucaramanga, Colombia), Lodo Anaerobio (LPTAR) obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales (Floridablanca, Colombia), Estiércol Porcino (EP) recolectado en una porcícola municipal (Los Santos, Colombia) y la co-digestión entre los consorcios LR+EB, LR+EP y LR+LPTAR, en proporción 1:1 (v/v).

4.1.3 Medios de cultivo

Los medios de crecimiento y producción de biogás que se utilizaron para el desarrollo experimental de este trabajo (pruebas de selección de inóculos e identificación de microorganismos) fueron medios reducidos “Balch” [8]. Las soluciones de sales que contenían estos medios fueron preparadas con reactivos grado comercial.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1.4 Evaluación de la Actividad Hidrolítica de los diferentes consorcios microbianos

La actividad hidrolítica de los consorcios se basó en la capacidad de hidrólisis de la celulosa, de acuerdo con el protocolo descrito por *Hu, et al.* [22]. Los ensayos de actividad hidrolítica fueron realizados en biodigestores de 500 ml de capacidad. Inicialmente se añadió el volumen de inóculo equivalente a una concentración de 1,5 g/L de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y se aforó con medio mineral “balch” [8] hasta completar un volumen de operación de 400 ml. El medio de “balch” contenía sales minerales disueltas en tampón bicarbonato de sodio 0,02 N y pH 7 (**Anexo 1**). Los experimentos fueron realizados por triplicado durante 30 días a temperatura de incubación de $39 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

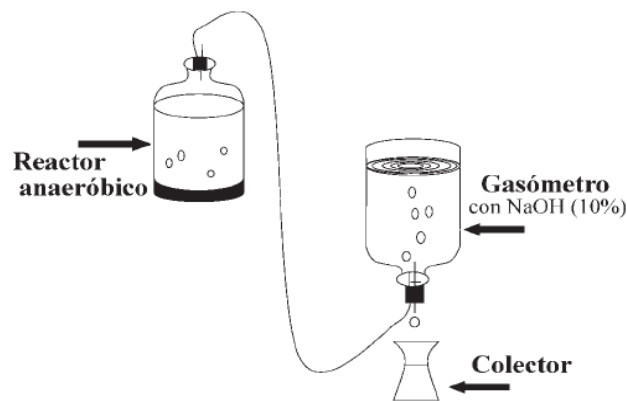
Para el ensayo de actividad hidrolítica se utilizaron 10 g/L de celulosa (papel de filtro cuantitativo *Schleicher & Schuell*, 589/1, 110 mm) como sustrato. La concentración de azúcares reductores producidos durante la hidrólisis de la celulosa, fue determinada por espectrofotometría, de acuerdo con el método colorimétrico del Ácido Di-nitro-salicílico (DNS) descrito en el numeral 4.3.3 [23]. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 xg, durante 10 minutos. Los sobrenadantes recuperados fueron mantenidos en refrigeración a 4 °C, hasta su análisis. La actividad hidrolítica fue calculada para la máxima velocidad de producción de azúcares reductores, definida como mg de azúcares reductores/ml*día.

4.1.5 Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica de diferentes consorcios microbianos

La determinación de la capacidad de cada inóculo para producir gas metano se evaluó mediante el test de AME [8]. Los ensayos de actividad metanogénica específica fueron realizados en biodigestores de 500 ml de

capacidad. Inicialmente se añadió el volumen de inóculo equivalente a una concentración de 1,5 g/L de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y se aforó con medio mineral “balch” [8] hasta completar un volumen de operación de 400 ml. El medio de “balch” contenía una concentración de acetato de sodio al 10% como sustrato, además de sales minerales disueltas en tampón bi-carbonato de sodio 0,02 N y pH 7 (**Anexo 2**). Los experimentos fueron realizados por triplicado durante 30 días a temperatura de incubación de $39 \pm 2^\circ\text{C}$.

En esta prueba, el biogás producido en los reactores, fue conducido a través de mangueras, a una botella que contenía NaOH 0.1N. El biogás producido burbujeara desplazando la soda por otra manguera de salida. Por lo tanto, el volumen de NaOH desplazado era directamente proporcional al volumen de metano generado [8].



Ensayo Actividad metanogénica [8]

El cálculo de la actividad metanogénica específica se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$AME = \frac{P}{FC \cdot V_{SSV}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

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

P = Máxima pendiente de la cinética de producción de metano para cada experimento (ml/d)

FC = Factor de conversión de g DQO (430 ml CH₄ húmedo/g DQO a 39 °C)

V = Volumen del inóculo utilizado en el ensayo (L)

SSV= Concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles en el inóculo (g/L)

4.1.6 Determinación de la Capacidad de Afinidad al sustrato para la producción de biogás a partir de pulpa de fique

La capacidad de afinidad al sustrato se realizó mezclando los microorganismos con pulpa de fique. De esta manera se evaluó el tiempo de afinidad o bioestabilización de los reactores.

La producción de metano a partir de pulpa de fique se realizó en bioreactores de 500 ml, conteniendo una relación sustrato/inóculo de 1g de SSV de sustrato/1 g de SSV de inóculo. La biodigestión fue evaluada durante 15 días, a temperatura de 39 ± 2°C. La concentración de azúcares reductores, los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y el porcentaje de metano producido, cuantificado mediante un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls* (Nottinghamshire, England 2003), fueron cuantificados como parámetros de control del proceso usando muestras destructivas [44]. La variable de respuesta para la determinación de la capacidad de afinidad al sustrato fue el volumen de metano, determinado por el método de desplazamiento alcalino [45]. Los experimentos fueron realizados por triplicado. La capacidad de afinidad del inóculo a la pulpa de fique se calculó como el rendimiento acumulado de producto en sustrato durante todo el tiempo de fermentación, expresado en m³ CH₄/Kg de SV de pulpa de fique.

4.1.7 Selección del mejor consorcio productor de biogás utilizando como sustrato los residuos generados a partir del beneficio del fique

La selección del mejor consorcio para la producción de biogás a partir de los residuos generados del beneficio del fique se hizo con base en los resultados obtenidos de la actividad hidrolítica, actividad metanogénica específica y capacidad de afinidad al sustrato para cada uno de los inóculos.

Los valores de actividad hidrolítica fueron obtenidos a partir de las cinéticas de producción de azúcares reductores usando celulosa como sustrato. Los valores de actividad metanogénica específica fueron calculados a partir de las cinéticas de producción de metano utilizando acetato como sustrato. Los valores de capacidad de afinidad al sustrato fueron obtenidos a partir de las cinéticas de producción de metano utilizando pulpa de fique como sustrato.

4.1.8 Identificación de los grupos tróficos presentes en el consorcio microbiano seleccionado

Este procedimiento se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP) descrita en el *Standard Methods* diferenciando los siguientes grupos de microorganismos según el medio de cultivo: Bacteria fermentativas, Sulfato reductoras, Sintróficas y Metanogénicas. A su vez para cada población se cuantificó el número de microorganismos que utilizaron diferentes sustratos como glucosa, lactato, acetato, propionato y metanol [32].

Los medios utilizados para la realización de esta prueba fueron: Medio de cultivo para recuento de Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS), Bacterias Fermentadoras de Lactosa (BFL) y Fermentadoras de Glucosa (BFG); Medio de cultivo para recuento de Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato y Sulfatorreductoras del Acetato (BSRLAC Y BSRAC), Medio de cultivo para recuento de Bacterias Metanogénicas Hidrogenofílicas (BMH) y Metanogénicas Acetoclásticas (BMA) y Medio de cultivo para recuento de Bacterias Sintróficas del Propionato y Sintróficas del Butirato (BSP Y BSB). Estos medios de cultivo fueron preparados según los protocolos propuestos por Días–Báez *et al.*, [8] (**Anexo 3**).

La técnica de NMP consistió en realizar ocho diluciones seriadas del inóculo en el medio correspondiente, en tubos de *Hungate*, los cuales fueron tapados con corchos de butilo y grafados para garantizar la anaerobiosis. Se realizaron cinco replicas por ensayo. La positividad de los tubos se identificó de acuerdo

con las características de cada grupo bacteriano y la determinación del NMP con base en la tabla estadística de Mac Grady [8] (**Anexo 4**).

4.2.6. Estudio del efecto de la relación Inóculo/Sustrato

Teniendo en cuenta la concentración de SST de la pulpa de fique y los resultados de experimentaciones preliminares, se realizaron experimentos manteniendo constante la concentración de inóculo. La concentración de sustrato fue variable según como se indica a continuación:

- Relación inóculo/sustrato 0,5 g de SST:
Contenía 300ml inóculo/90 g de pulpa de fique

- Relación inóculo/sustrato 1g de SST:
Contenía 300ml inóculo/50 g de pulpa de fique

- Relación inóculo/sustrato 2 g de SST:
Contenía 300ml inóculo/22 g de pulpa de fique

Los ensayos para la determinación de la mejor relación inóculo/sustrato se realizaron en bioreactores de 500 ml de capacidad, conteniendo cada una de las relaciones inóculo/sustrato. La biodigestión fue evaluada durante 15 días, a temperatura de $39 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los valores que se tuvieron en cuenta para monitorear el proceso fueron: la concentración de azúcares reductores, AGVs y el porcentaje de metano producido (cuantificado mediante un detector de gases infrarrojo). Las muestras fueron destructivas. La variable de respuesta fue el volumen de metano, determinado por el método de desplazamiento alcalino [44, 45]. La selección de la mejor relación Inóculo/Sustrato se realizó con el máximo rendimiento acumulado de producto en sustrato durante todo el tiempo de fermentación, expresado en $\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{Kg}$ de SV de pulpa de fique, adicionalmente se determinó la productividad volumétrica acumulada Q_p (ml

CH₄/día) como un parámetro indicador del proceso. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

4.2.7. Estudio del efecto de las condiciones de cultivo: temperatura, pH, agitación y aireación; utilizando el consorcio previamente seleccionado

El estudio de la relación entre la temperatura, el pH, la agitación y la aireación sobre la producción de gas metano, se hizo mediante un diseño de experimentos 2³. El exponente 3 representa el número de variables (temperatura, agitación, aireación) y la base 2, el número de niveles para cada variable (alto y bajo). En el caso de la temperatura se probaron 25 y 39°C. Los experimentos que tenían agitación, se realizaron con un nivel alto de 150 rpm y un nivel bajo sin agitación. Los ensayos de aireación se clasificaron de la siguiente manera: el nivel alto correspondió a los ensayos que fueron aireados y el nivel bajo para los que no fueron aireados. La aireación consistió en colocar los reactores destapados durante nueve horas en una plancha de agitación siguiendo el protocolo propuesto por *Mshandet et al.* [3], después de este tiempo los experimentos fueron gaseados con CO₂ con el fin de remover el oxígeno y garantizar las condiciones de anaerobiosis. Posteriormente fueron sellados con corchos de butilo y agrafes de aluminio y llevados a incubación (**Anexo 5**).

Para el estudio del efecto del pH sobre la producción de gas metano, se había propuesto inicialmente estudiar 2 niveles (pH 6 y 8). Sin embargo esta variable no fue incluida en el diseño experimental teniendo en cuenta dos razones. La primera razón fue con base en resultados preliminares realizados disminuyendo el pH con HCL 1N hasta un valor de 6, los cuales presentaron bajos rendimientos de metano, y la segunda razón fue debido a que los valores de pH de todas las fermentaciones se encontraban en un rango de 6,8 – 8,2; lo que nos muestra que el bioproceso no requiere de la optimización de esta variable.

Los experimentos para la determinación de las mejores condiciones de operación se realizaron en bioreactores de 500 ml, conteniendo una relación inóculo/sustrato de 2 gSSV. La biodigestión fue evaluada durante 15 días, a temperatura de 39 ± 2 °C. Los valores que se tuvieron en cuenta para monitorear el proceso fueron: la concentración de azúcares reductores, los AGVs y el porcentaje de metano producido (cuantificado mediante un detector de gases infrarrojo). Las muestras fueron destructivas. La variable de respuesta fue el volumen de metano, determinado por el método de desplazamiento alcalino [44, 45]. La selección de las mejores condiciones de cultivo se realizó con base en el máximo rendimiento acumulado de producto en sustrato durante todo el tiempo de fermentación, expresado en $\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{Kg}$ de SV de pulpa de fique adicionalmente se determinó la productividad volumétrica acumulada Q_p ($\text{ml CH}_4/\text{día}$) como un parámetro indicador del proceso. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

4.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.2.1 Caracterización físico química del Sustrato

La pulpa de fique fue caracterizada utilizando parámetros físico-químicos. El análisis incluyó la determinación del pH, concentración de Sólidos Totales (ST), concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), relación carbono/nitrógeno C/N, Celulosa, Hemicelulosa y Lignina. Adicionalmente al sustrato se le realizó un Análisis Bromatológico, para determinar el contenido de materia orgánica disponible (proteínas, grasas y carbohidratos), FDN fibra detergente neutra, FDA fibra detergente acida, algunos minerales, humedad y cenizas.

4.2.2 Caracterización físico química del Inóculo

Para realizar la caracterización fisicoquímica del inóculo, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: pH, alcalinidad, ácidos grasos volátiles (AGV), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV). [5, 8, 44].

4.2.3 Determinación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante el método del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). El Ácido 3,5- dinitrosalicílico (color amarillo), es reducido al Ácido 3-amino-5-nitro Ácido D-glucónico (color rojo), en presencia de azúcares reductores. La intensidad del color es proporcional a la concentración de azúcares y cuantificada por espectrofotometría a 540 nm [36]. Este método se seleccionó por ser rápido y reproducible.

La determinación de la concentración de azúcares reductores se obtuvo interpolando en una curva de calibración (**Anexo 6**) que correlacionó la absorbancia medida a 540 nm con la concentración de azúcares.

Reactivo DNS

- Mezclar y disolver en 250 ml de agua destilada 8 g de NaOH y 150 g de tartrato de sodio y potasio.
- Posteriormente agregar 5 g de Acido Di-nitro-salicílico (marca Merck únicamente)
- Aforar a 500 ml con agua destilada.
- Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Procedimiento

- Agregar 1 ml de reactivo a 1 ml de muestra usando tubos tapa rosca.
- Dejar en baño con agua en ebullición durante 5 minutos.
- Detener la reacción en un baño con hielo.

- Agregar 10 ml de agua destilada, y dejar reposando durante 15 minutos.

Leer densidad óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra

4.2.4 Medición del biogás

Las mediciones del biogás se realizaron con el equipo PGD-IR3, el cual posee sensores de espectro infrarrojo con los cuales puede determinar los porcentajes de metano, dióxido de carbono y oxígeno presentes en la muestra y por el método de desplazamiento alcalino [5].

El método de desplazamiento alcalino determina la capacidad de la biomasa para convertir sustratos en CH_4 y CO_2 , donde el CH_4 burbujea, desplazando al NaOH y el CO_2 se disuelve en el NaOH [8, 44, 45]

Materiales y Reactivos

- NaOH al 10 %
- Muestra
- Mangueras estériles
- Nitrógeno gaseoso
- Medio de cultivo para el test de AME
- Solución de AGV
- Agua destilada estéril
- Frascos de suero estériles
- Tapones de caucho estériles
- Agujas hipodérmicas estériles
- Agitador termostático
- Agua destilada libre de oxígeno
- Fenofaleína

Procedimiento

- Preparar el medio de cultivo “Balch” (Ver sección Preparación de soluciones y medios de cultivo).
- En una botella de vidrio agregar aproximadamente 110 ml de medio de cultivo y 18 ml de solución de AGV (Ver sección Preparación de soluciones y medios de cultivo).
- Homogenizar el contenido de la botella, gasear con CO₂, tapar con tapón de caucho y grafar.
- Esterilizar durante 15 min., 2,05 bares, 15 lb. de presión.
- Inocular la muestra en una botella con una concentración 1,5 g/L de SSV de biomasa, utilizando una cámara de atmósfera de CO₂.
- Agregar 500 ml de NaOH al 10%, y fenofaleína como indicador en otro frasco de vidrio. Tapar con tapón de caucho y grafar. Insertar dos agujas hipodérmicas estériles acopladas cada una a una manguera de 5 mm de diámetro y comunicar una de ellas a la botella reactiva y la otra a la botella recolectora de NaOH.
- Invertir la botella que contiene el NaOH.
- Realizar medición del NaOH que es desplazado por la producción de gas.
- Conservar durante 30 días la botella en reacción, cambiando cada vez que sea necesario la botella de NaOH.
- Realizar mediciones diarias de metano a la botella reactiva y azúcares reductores y cada 72 horas de AGVs y pH, como parámetros de seguimiento y control del bioproceso.

4.2.5 Análisis Estadístico de Datos

Para realizar el análisis estadístico de los resultados, se utilizó un Análisis de Varianza ANOVA utilizando el software *Statgraphics Plus 5.1*, California, USA, teniendo como variable de respuesta la producción de CH₄, ya que es indicador de una buena actividad metanogénica y afinidad al sustrato por parte de los consorcios microbianos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización Físicoquímica de los inóculos

En la **tabla 1** se presenta la caracterización físicoquímica de los inóculos estudiados. Los consorcios microbianos presentaron valores de pH entre 7 y 8 para todas las muestras evaluadas. Los inóculos EB y EP presentan mayor concentración de ST y SV en comparación con el inóculo LR, esto indica que los consorcios poseen una mayor carga orgánica y microbiana, por lo que se esperaría que favorecieran la degradación anaerobia de la pulpa de fique. Se destacan las altas concentraciones iniciales de AGVs para LR, EB y LR+EB, los cuales son poco favorables para el proceso de la metanogénesis [17, 19, 46]. El LR y las co-digestiones LR+EB, LR+EP y LR+LPTAR presentaron mayores valores de alcalinidad, lo que podría favorecer el proceso de digestión anaerobia una vez que se empiezan a producir los AGVs durante la etapa acidogénica de la biodegradación [17, 19, 46].

Tabla 1. Caracterización Físicoquímica de los inóculos

Parámetro	Unidades	EB	EP	LPTAR	LR	LR+EB	LR+EP	LR+LPTAR
pH		8	8	7	7	8	8	7
ST	g/l	107,5	105,9	35,1	17,5	36,5	43,8	23,6
SSV	g/l	80,5	51,7	22,1	7,9	20,8	23,6	29,1
Alcalinidad	mgCaCO ₃ /L	2200	1700	2100	4100	3000	3100	3100
AGV	mg/l	20880	2520	2280	9360	15120	7200	6960

5.2 Caracterización Físicoquímica del sustrato

En la **tabla 2** se presenta la caracterización físicoquímica de la pulpa de fique y la pulpa de sisal obtenida por Mshandete *et al.* El sisal es una planta de similares características y pertenece al igual que el fique a la familia *Agavaceae*. El contenido de materia orgánica de la pulpa de fique, la relación C/N, los ST,

la celulosa y la hemicelulosa, es similar en ambas plantas, pero los valores de pH y los SSV son menores en la pulpa de fique y el contenido de lignina es menor para la pulpa de sisal. Sin embargo se han reportado producciones de metano entre 50-60 % a partir de la pulpa de sisal [3, 12, 46]. Lo anterior indica que la pulpa de fique es un residuo potencial para la producción de biogás.

Tabla 2. Caracterización Físicoquímica del sustrato

Parámetro	Unidades	Pulpa de fique	Pulpa de Sisal
pH		4	5,6
ST	% (p/p)	19,5	14,2
SSV	% (p/p)	16,3	82,3
C/N		63	65
Alcalinidad	mgCaCO ₃ /L	3300	ND
AGV	mg/l	10800	ND
Celulosa	%	41,81	47,1
Hemicelulosa	%	22,17	23,1
Lignina	%	15,56	8,6

La caracterización físicoquímica del sisal fue tomada de Mshandete et al., [3, 12, 23]

ND: No Determinado

En cuanto a la acidez de la pulpa de fique, ésta podría inhibir el desarrollo de las bacterias metanogénicas, disminuyendo la producción de metano, pero este efecto puede ser compensado por los valores de pH alcalino que presentaron los inóculos.

5.3 Evaluación de la Actividad Hidrolítica de los diferentes consorcios microbianos utilizando celulosa como sustrato

En la **Figura 2** se observa la cinética de producción de Azúcares Reductores de cada uno de los inóculos estudiados utilizando de celulosa como fuente de carbono. Los consorcios microbianos alcanzan la mayor producción de azúcares entre el día 10 y 18 de reacción, obteniendo un valor máximo de 0,80 mg/ml para LR. Los valores obtenidos superan los valores reportados por otros autores utilizando pulpa de sisal y lodo PTAR (0,07 mg/ml) [3] y celulosa y líquido ruminal (0,26 mg/ml) [22], como sustratos e inóculos respectivamente, para la producción de biogás.

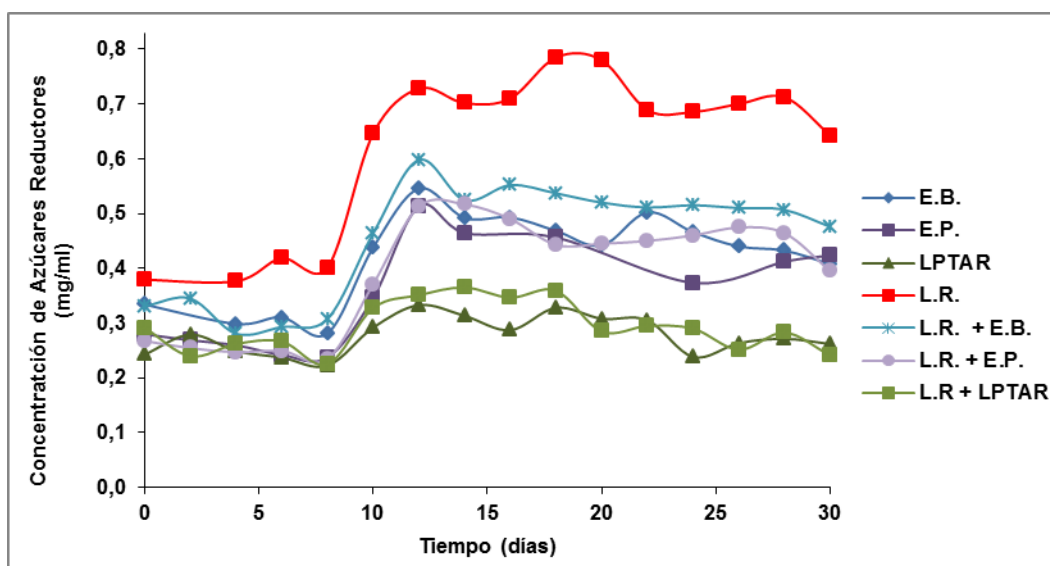


Figura 2. Cinéticas producción de Azúcares Reductores (mg/ml) para cada inóculo. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando 10 g/L de celulosa como sustrato y medio de cultivo mineral *Balch* para mantener el pH en un valor de 7, temperatura 39 °C sin agitación.

A partir de las velocidades de producción de azúcares reductores se determinó la Actividad Hidrolítica para cada inóculo. En el **Anexo 7** se muestra un ejemplo de cálculo de la Actividad Hidrolítica. Los resultados obtenidos indican que el consorcio microbiano con mayor actividad fue LR, con un valor de 0,095 mg/ml*día. Este valor es comparable con los obtenidos en investigaciones anteriores y demuestran que el consorcio LR posee una buena actividad enzimática para degradar carbohidratos complejos como la celulosa hasta azúcares simples [4, 22, 46]. Los resultados de Actividad Hidrolítica correspondientes a los demás inóculos se encuentran consignados en la **Tabla 4**.

En la **Figura 3** se presenta la distribución de los valores de medias y medianas con error estándar utilizados para el análisis estadístico de los resultados. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 7 muestras con un Intervalo de Confianza de 95% y un *valor P*= 0,1438. También se evaluó la distribución normal de los datos utilizando el test de Shapiro Wilks, comprobando que todos los datos mantenían una distribución normal para todas las muestras evaluadas.

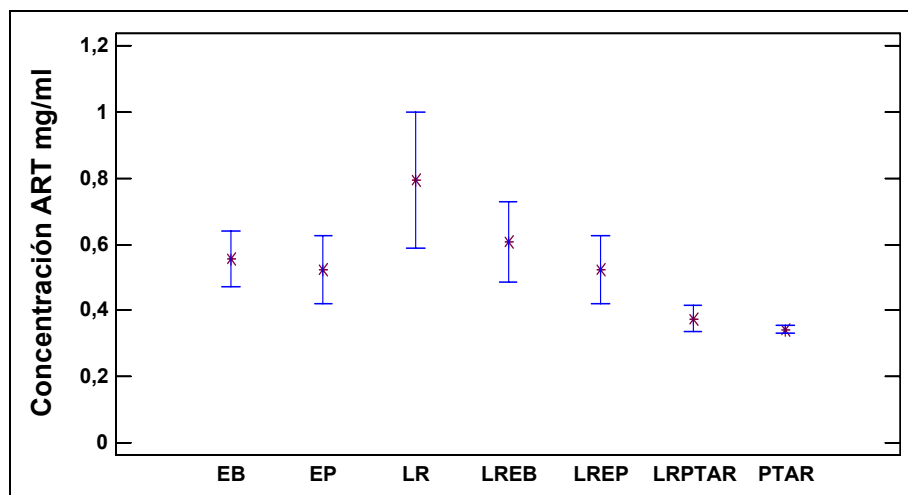


Figura 3. Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Azúcares Reductores (ART) de cada uno de los inóculos utilizando 10 g/L de celulosa como sustrato

5.4 Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica de diferentes consorcios microbianos usando acetato como sustrato modelo

En la **Figura 4** se muestran los volúmenes de biogás producidos por cada uno de los inóculos, durante la biodegradación del acetato. Los mayores volúmenes de metano obtenidos fueron 660 ml y 572 ml, los cuales correspondieron a los inóculos EP y la co-digestión LR+EP respectivamente. Mientras que para los inóculos LR, LPTAR, EB y sus co-digestiones los volúmenes de metano obtenidos estuvieron entre 130 y 337 ml.

Las altas producciones de metano obtenidas utilizando el consorcio EP pueden ser correlacionadas con las características fisicoquímicas de este inóculo como la alta concentración de ST y SV que indican una mayor carga orgánica y microbiana, lo cual probablemente favoreció eficientemente la producción de CH₄ [5]. Sin embargo utilizando el consorcio EB se observó un comportamiento diferente, aunque presentaba altos valores de ST y SV, además presentaba altas concentraciones de AGVs, indicando que estos últimos pueden presentar un efecto negativo sobre el bioproceso [4, 5, 8, 31]. Un efecto similar se presentó en las fermentaciones donde se utilizaron LR Y LR+EB como inóculos. Por otra parte cuando se utilizó la co-digestión LR+EP,

se obtuvieron rendimientos de metano similares a los obtenidos por el consorcio EP, esto se puede explicar por el efecto de dilución que se logra al mezclar los dos inóculos, disminuyendo el efecto negativo de los AGVs aportados por el líquido ruminal [47].

Finalmente, para los inóculos LPTAR y LR+LPTAR, se obtuvieron bajos rendimientos de metano. Esto se puede correlacionar con las bajas concentraciones de ST y SV presentadas por estos consorcios, combinadas con bajas concentraciones de AGVs [4, 5, 8, 31].

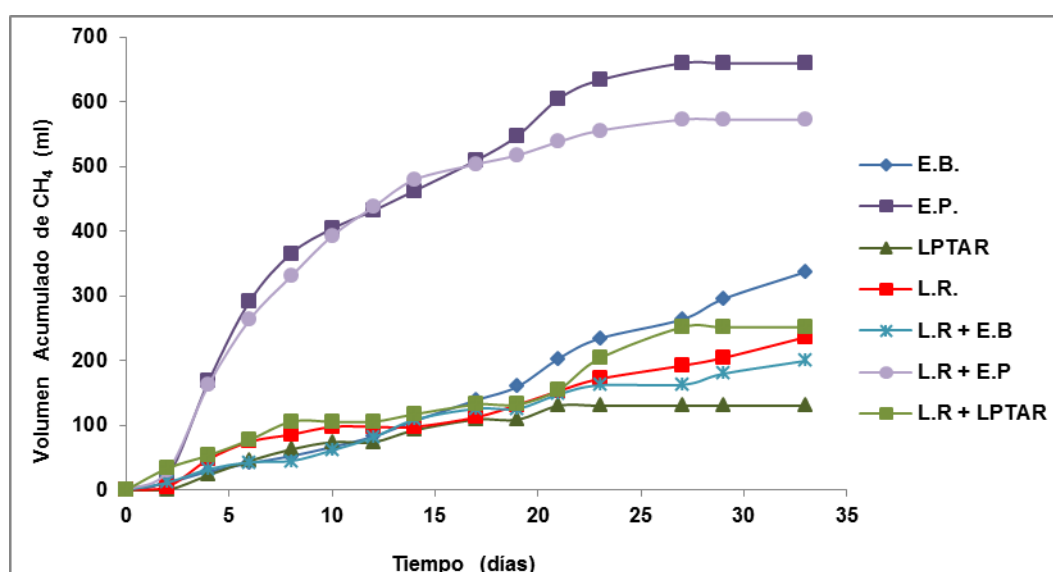


Figura 4. Cinéticas de producción de CH₄ (ml) para cada inóculo. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando 10% v/v de acetato de sodio como sustrato y medio de cultivo mineral *Balch* para mantener el pH en un valor de 7, temperatura 39 °C sin agitación.

Teniendo en cuenta las cinéticas anteriores se calculó la actividad metanogénica específica para cada inóculo. En el **Anexo 8** se muestra un ejemplo de cálculo de la Actividad metanogénica específica. Los consorcios EP y LR+EP presentaron los mayores valores de actividad (0,146 y 0,144 g DQO/g SVS*día, respectivamente). Las Actividades metanogénicas obtenidas fueron similares a las determinadas por Field, 1987 para la producción de biogás a partir de lodos anaerobios de diferentes fuentes orgánicas [48]. Por lo anterior es posible inferir que los consorcios microbianos estudiados convierten una mayor concentración de AGVs en metano por unidad de tiempo [5, 8, 10]. Los resultados de Actividad metanogénica específica correspondientes a los demás

inóculos se encuentran consignados en la **Tabla 4**.

En la **Figura 5** se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 7 muestras con un Intervalo de Confianza de 95% y un *valor P* = 0,0008. Por lo tanto se validan estadísticamente los resultados obtenidos en la Figura 4. La distribución normal de los datos fue corroborada con el test de Shapiro Wilks, comprobando que todos los datos mantenían una distribución normal para todas las muestras evaluadas.

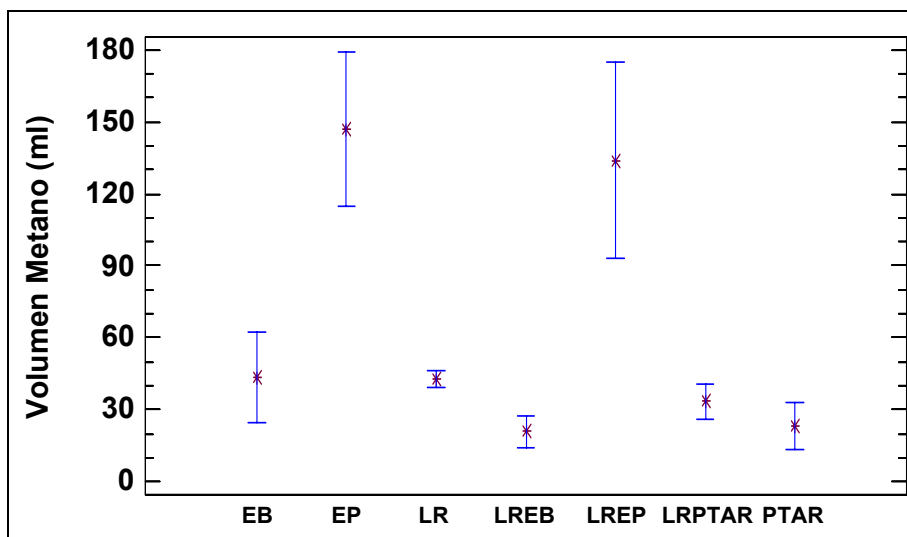


Figura 5. Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Metano para cada inóculo utilizando 10% v/v de acetato de sodio como sustrato.

5.5 Determinación de la Afinidad al sustrato para la producción de biogás a partir de pulpa de fique

La **Figura 6** muestra las cinéticas de consumo de azúcares reductores presentes en el bagazo de fique por parte de los microorganismos contenidos en los diferentes consorcios microbianos. Durante los primeros 3 días de fermentación, se observa un rápido consumo de azúcares para todo los inóculos, después de este tiempo todos los consorcios mantienen constante su actividad hidrolítica, haciendo constante también la concentración de azúcares

reductores en el medio, como se evidencia en la figura hasta el final de la fermentación.

Los resultados de actividad hidrolítica utilizando pulpa de fique como sustrato para cada uno de los inóculos, son muy similares a los obtenidos utilizando celulosa como sustrato (datos no mostrados). Por lo tanto se corrobora que el LR es el inóculo con mayor actividad enzimática (9,7137 mg ART/ml*d) para hidrolizar sustratos lignocelulósicos como la pulpa de fique.

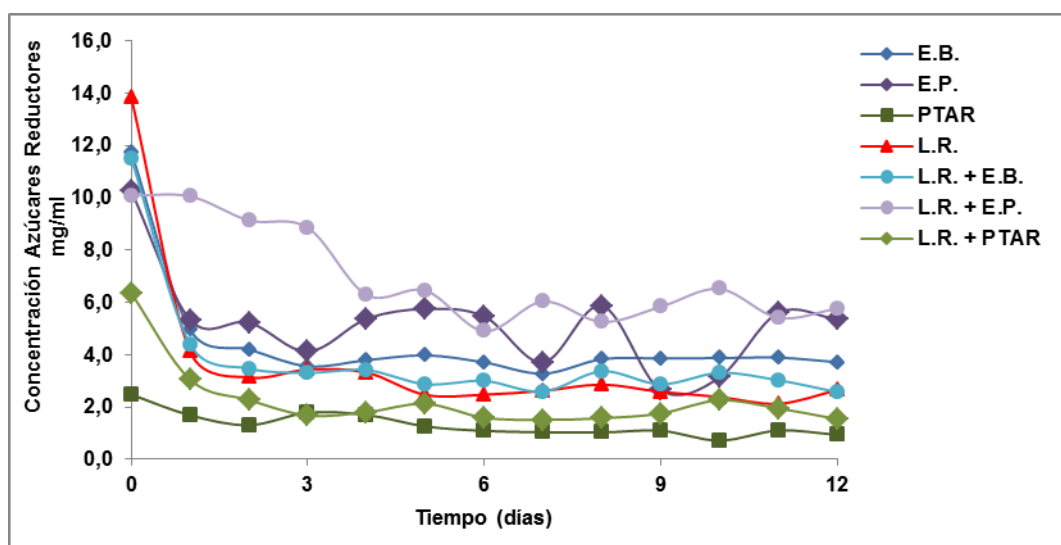


Figura 6. Cinéticas consumo de Azúcares Reductores (mg/ml). Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV, temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.

En la **Figura 7** se presentan los resultados obtenidos para la producción de metano usando pulpa de fique como sustrato. Los inóculos EP y LR + EP muestran los máximos valores de producción de volumen de metano por unidad de tiempo durante todos los días de fermentación. Estos resultados muestran una tendencia similar a los resultados obtenidos anteriormente utilizando acetato como sustrato modelo para la producción de metano, en donde los inóculos EP y LR+EP muestran la mejor actividad. Lo anterior se puede explicar por las características fisicoquímicas de los inóculos discutidas anteriormente.

Con relación a los demás inóculos, todos incrementan la producción de metano hasta el día 4, después de este tiempo, disminuyen la productividad. La disminución de la actividad metanogénica de un consorcio se puede explicar por el incremento en la concentración de AGVs, la presencia de un agente tóxico o por el agotamiento de un sustrato esencial [4, 5]. En este caso fue observado un aumento en la concentración de AGVs superior a 8.000 ml/L, lo que ocasionó acidificación del reactor afectando la producción de metano [4, 5, 8, 31, 49].

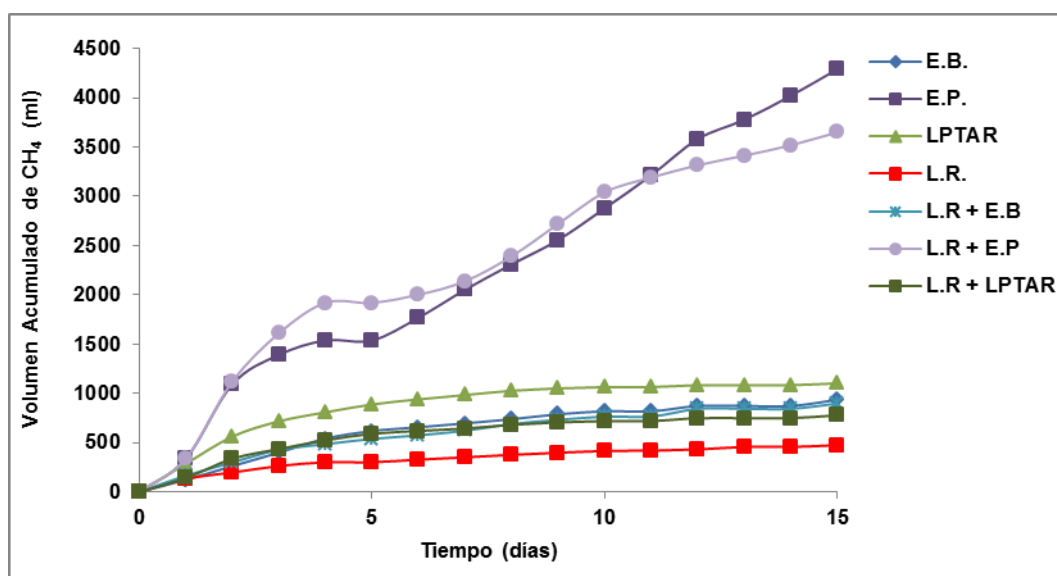


Figura 7. Cinéticas de producción de CH₄ (ml) para cada inóculo. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV, temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.

A partir de los resultados obtenidos en la Figura 7 se determinaron los rendimientos acumulados de producto en sustrato. En el **Anexo 9** se muestra un ejemplo de cálculo de los rendimientos acumulados de producto en sustrato utilizados para expresar la capacidad de afinidad al sustrato. Se obtuvieron valores máximos de 0,29 y 0,45 m³CH₄/Kg SV los cuales correspondieron a los consorcios EP y LR + EP. Al comparar la los rendimientos de metano obtenidos usando pulpa de fique y la pulpa de sisal, la producción de metano a partir de pulpa de fique es superior a la reportada por *Mshandete et al* 2006 (0,22 m³CH₄/Kg SSV) usando pulpa de sisal. De esta manera, se demuestra la capacidad de los microorganismos para aprovechar la materia orgánica

contenida en la pulpa de fique. Es decir que los consorcios microbianos de cada matriz actúan en sinergia para degradar la celulosa contenida en la pulpa de fique a azúcares simples y además son capaces de convertir estos azúcares en AGVs y finalmente transformarlos en metano [10]. Los resultados de afinidad al sustrato correspondientes a los demás inóculos se encuentran consignados en la **Tabla 5**.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados de porcentaje de metano en el biogás obtenido a partir de la digestión anaerobia de la pulpa de fique. Los inóculos EP y LR + EP muestran los máximos valores de porcentaje de metano durante todo el tiempo de fermentación, alcanzando producciones de 48% y 43,6% respectivamente. Estos valores nos indican que estos dos inóculos generan un biogás de mejor calidad por su alto contenido de metano, en comparación con los demás inóculos estudiados.

Tabla 3. Porcentaje de metano presente en el biogás, para cada uno de los inóculos evaluados. Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV, temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.

INÓCULO	% MÁXIMO DE METANO
E.B.	7
E.P,	48
L. PTAR	27,6
L.R.	13,2
L.R. + E.B.	12,5
L.R. + E.P.	43,6
L.R. + PTAR	8

En la **Figura 8** se presentan los resultados obtenidos para los análisis de AGVs, pH y alcalinidad. En cuanto a la concentración de AGVs, los inóculos que presentaron los mayores valores de AGVs, presentaron también los rendimientos acumulados de metano más bajos. De lo anterior se puede inferir que valores superiores a 8.000 mg/L de AGVs inhiben la producción de metano, debido a que causan acidificación del reactor disminuyendo los valores de pH como se observa en la figura con los inóculos EB, PTAR y las co-

digestiones LR+EB y LR+PTAR. Los valores bajos de pH afectan los microorganismos presentes en los consorcios principalmente los microorganismos metanogénicos, los cuales son más sensibles a los cambios bruscos de pH [4, 5, 8, 31, 49]. Sin embargo la co-digestión LR+EP presentó valores altos de AGVs, pero además presentó valores altos de alcalinidad (3.500-5.000 mg CaCO₃/ml), en comparación con los demás inóculos, lo cual ejerció un efecto tampón sobre el bioproceso, favoreciendo el desarrollo de los microorganismos metanogénicos y por tanto la producción de metano [4, 46, 50].

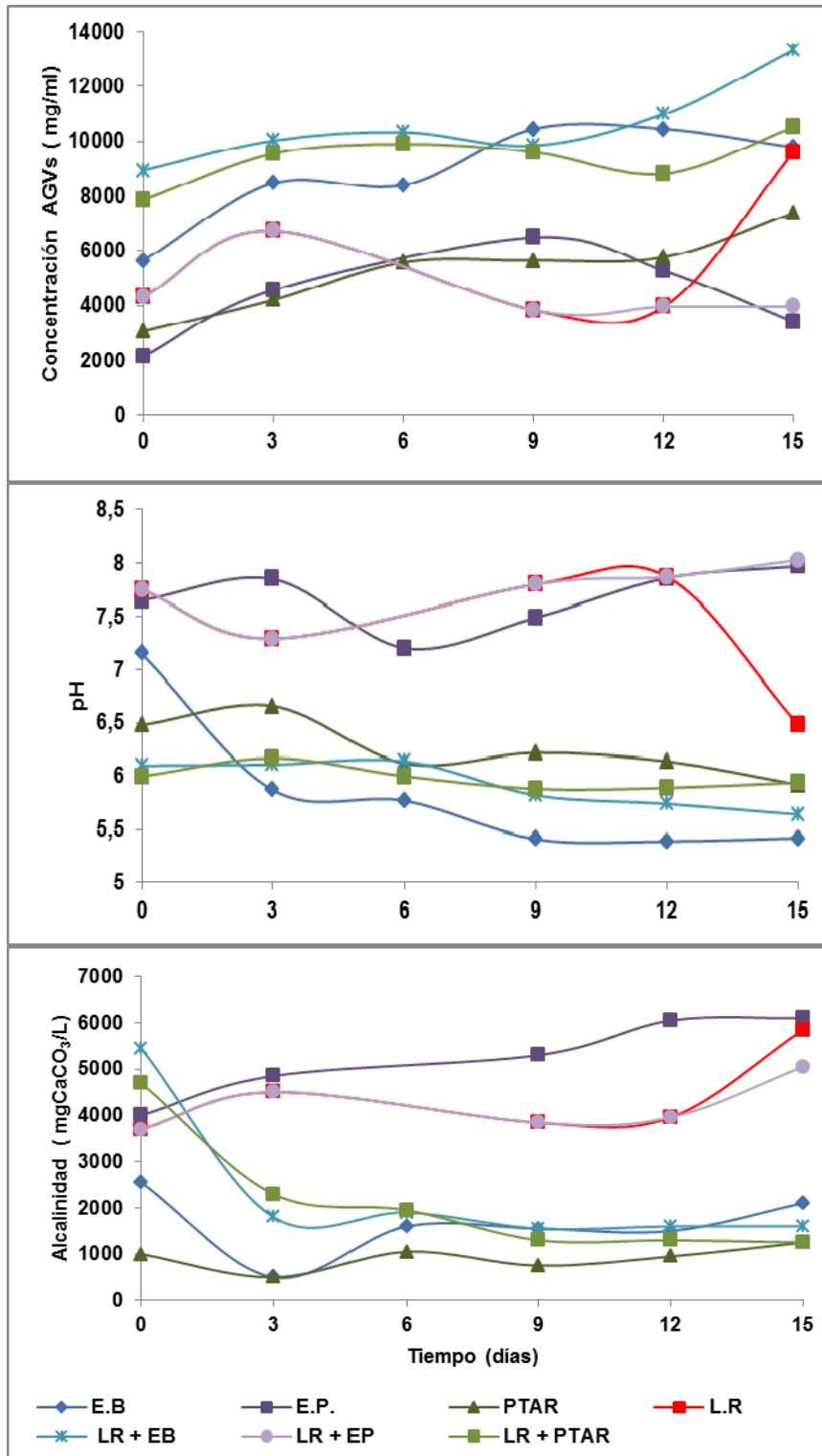


Figura 8. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV.

En la **Figura 9** se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados. El gráfico muestra que existe una diferencia significativa entre los rendimientos de

metano obtenidos por cada consorcio microbiano utilizando pulpa de fique como sustrato, con un Índice de Confianza de 95% y un *valor P* = 0,000. Además se comprobó la distribución normal de los datos utilizando el test de Shapiro Wilks, comprobando que todos los datos mantenían una distribución normal para todas las muestras evaluadas.

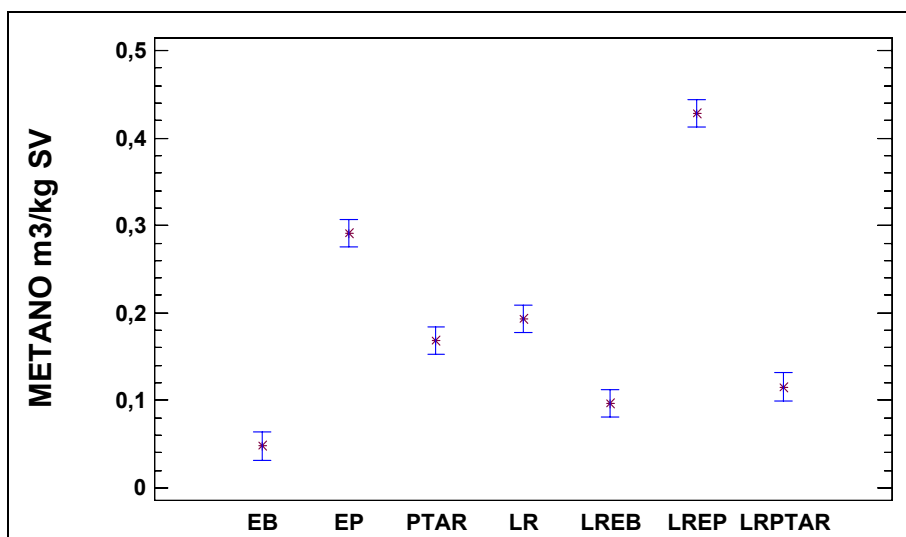


Figura 9. Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Metano utilizando pulpa de fique como sustrato y una concentración de inóculo equivalente a 1,5 gSSV.

5.6 Selección del mejor consorcio productor de biogás utilizando como sustrato los desechos generados a partir del beneficio del fique

Inicialmente, se evaluó el jugo de fique como fuente de microorganismos nativos para realizar la degradación anaerobia de la pulpa de fique. Esto se realizó teniendo en cuenta que los microorganismos recuperados *in situ* (a partir del sustrato a tratar) son más eficaces en estos procesos, debido a que han tenido contacto previo con el sustrato y están adaptados a él.

Sin embargo, los microorganismos nativos aislados del jugo de fique, no presentaron los parámetros propuestos para la selección del inóculo (actividad hidrolítica, actividad metanogénica y afinidad al sustrato). Para comprobar los resultados negativos obtenidos, se evaluaron los grupos tróficos presentes en este inóculo y de esta manera evitar resultados falsos negativos. En la **Tabla 4**

se muestra el número de representantes para cada población trófica expresado en UFC/gr SSV, para el consorcio Jugo de Fique.

A partir de la tabla se pudo inferir que el jugo de fique posee una alta concentración de microorganismos hidrolíticos y fermentativos, debido al alto recuento de los grupos BFG y BFL. También se observa una alta concentración de bacterias sulfatorreductoras. Por otra parte es de resaltar la ausencia de bacterias metanogénicas.

Tabla 4: Caracterización microbiológica del Jugo de Fique

GRUPOS METABÓLICOS	NMP (UFC/g SSV)
Bacterias fermentadoras de glucosa (BFG)	8×10^{12}
Bacterias fermentadoras del Lactato (BFL)	8×10^{10}
Bacterias Anaerobias estrictas (BAS)	Negativo
Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA)	8×10^{13}
Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato (BSRL)	8×10^{13}
Bacterias Metanogénicas del Acetato (BMA)	Negativo
Bacterias MetanogénicasHidrogenofílicas(BMH)	Negativo
Bacterias Metanogénicas del Metanol (BMM)	Negativo

Los resultados obtenidos de esta experimentación demostraron que los microorganismos nativos del jugo de fique no presentaban actividad metanogénica debido a su alto contenido de bacterias sulfatorreductoras. La presencia de elevadas concentraciones de estas bacterias inhibe el crecimiento de bacterias metanogénicas y por consiguiente la producción de metano [4, 5, 10, 30], aunque presenta un número considerable de bacterias hidrolíticas y fermentativas, este solo parámetro no es suficiente para incluirlo dentro del estudio.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio y en otras investigaciones similares, se planteó incluir nuevos inóculos y las co-digestiones resultantes de su combinación con líquido ruminal con el fin de mejorar los rendimientos de metano obtenidos, quedando finalmente una matriz de siete inóculos como está descrito anteriormente en el apartado de

materiales y métodos. A cada uno de estos inóculos se les determinó la actividad hidrolítica, la actividad metanogénica y la afinidad al sustrato.

En la **tabla 5** se muestran los valores de actividad hidrolítica, obtenidos a partir de las cinéticas de producción de azúcares reductores usando celulosa como sustrato, los valores de actividad metanogénica específica obtenidos a partir de la digestión anaeróbica de acetato y los valores de afinidad al sustrato, determinados a partir de la digestión anaeróbica de la pulpa de fique para cada uno de los inóculos. Estos resultados fueron los que se tuvieron en cuenta como parámetros de selección del inóculo.

Tabla 5. Actividad Hidrolítica y Metanogénica y Afinidad al sustrato de cada inóculo

INÓCULO	AH [*] (mg/ml * día)	AME ^{**} (g DQO/ g SVS * día)	CAS ^{***} (m ³ CH ₄ /Kg SV)
E.B.	0,054	0,042	0,044
E.P,	0,084	0,146	0,291
L. PTAR	0,021	0,017	0,165
L.R.	0,095	0,026	0,193
L.R. + E.B.	0,067	0,025	0,094
L.R. + E.P.	0,071	0,144	0,446
L.R. + PTAR	0,009	0,030	0,120

* Actividad Hidrolítica

** Actividad Metanogénica Específica

***Capacidad de Afinidad al sustrato

De acuerdo con los resultados obtenidos el LR presenta la mayor actividad hidrolítica con un valor de 0,095 (mg/ml * día). Lo anterior indica que este consorcio posee enzimas celulolíticas que degradan exitosamente polímeros como la celulosa a azúcares simples [4, 22, 46]. Adicionalmente, LR posee una actividad metanogénica menor en comparación con EP, debido posiblemente a que LR presenta un número reducido de microorganismos metanogénicos. Por otra parte el valor máximo para actividad metanogénica fue 0,250 (g DQO/ g SVS * día) y correspondió al consorcio EP, lo que indica que este consorcio posee una eficiente actividad enzimática para convertir ácidos grasos en metano [10]. Por lo anterior se demostró que el sistema de co-digestión LR+EP

hace de la mezcla un inóculo apropiado para la degradación de sustratos de tipo lignocelulósico como la pulpa de fique. Los consorcios microbianos presentes en LR actúan como aceleradores de la etapa hidrolítica, mientras que los consorcios presentes en EP tienen alta actividad metanogénica. Por consiguiente se puede afirmar que la principal ventaja de la co-digestión está en aprovechar el efecto sinérgico de las mezclas, en comparación con cada inóculo por separado.

5.7 Determinación de los grupos tróficos presentes en el consorcio microbiano seleccionado

En la **Tabla 6** se presenta la concentración de los diferentes grupos tróficos de microorganismos presentes en el consorcio LR+EP, expresada en UFC/gr SSV.

Tabla 6: Caracterización microbiológica de la mezcla LR + EP.

GRUPOS METABÓLICOS	NMP (UFC/g SSV)
Bacterias fermentadoras de glucosa (BFG)	8×10^{11}
Bacterias fermentadoras del Lactato (BFL)	$1,70 \times 10^{09}$
Bacterias Anaerobias estrictas (BAS)	$3,50 \times 10^{09}$
Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA)	$1,75 \times 10^{06}$
Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato (BSRL)	ND
Bacterias Sintróficas del Propionato (BSP)	Negativo
Bacterias Metanogénicas del Acetato (BMA)	$1,25 \times 10^{09}$
Bacterias Metanogénicas hidrogenofílicas (BMH)	$2,50 \times 10^{07}$
Bacterias Metanogénicas del Metanol (BMM)	2×10^{04}

ND: No Determinado

A partir de la tabla anterior podemos inferir que el inóculo seleccionado (LR+EP) presenta un número elevado de bacterias fermentativas e hidrolíticas (BFG, BFL, BAS). Estos grupos de microorganismos fermentativos e hidrolíticos son los encargados del rompimiento de polisacáridos como la celulosa a monómeros de glucosa, además convierten la glucosa en Piruvato e H_2 . [7, 8] Estos productos son aprovechados por otros grupos de bacterias que los

transforman hasta productos como acetato, butirato, propionato y H_2 . Al determinar los grupos de microorganismos sintróficos en el inóculo LR+EP, como Bacterias Sintróficas del Propionato (BSP), Bacterias Sintróficas del acetato (BSA) y Bacterias Sintróficas del butirato (BSB), no se encontraron BSP, lo que nos hace inferir que en el inóculo hay solamente BSA, BSB [4, 5, 8].

La presencia de BSA y BSB es favorable para el bioproceso, ya que estos grupos de bacterias son consumidores de H_2 , lo que incrementa el flujo de electrones dentro del reactor, manteniendo una presión parcial de H_2 baja, aumentando las concentraciones de acetato y disminuyendo la concentración de productos como propionato, lactato y etanol, los cuales desvían la ruta metabólica de los microorganismos [4, 5, 8].

Los grupos BSA y BSB deben mantener una relación sintrófica con las Bacterias Metanogénicas Hidrogenofílicas (BMH), ya que estas también son consumidoras de H_2 y ayudan a reducir las concentraciones y la presión parcial de H_2 . Las BMH junto con las Bacterias Metanogénicas del Metanol (BMM) pertenecen al grupo de las bacterias Homoacetógenas, estas bacterias se diferencian en que las primeras son autótrofas y las segundas son heterótrofas [4, 5, 8]. Otro grupo de bacterias presentes dentro del consorcio son las Bacterias Metanogénicas Acetoclasticas (BMA). Estas bacterias generan 2/3 del metano producido, es decir es la principal vía de degradación anaeróbica de la materia orgánica [4, 5, 8].

Finalmente, otro grupo de bacterias presentes en el consorcio son las Bacterias Sulfato Reductoras del Acetato (BSRAC). La presencia de BSRAC es favorable dentro del reactor si la concentración de sulfato es baja, ya que son bacterias consumidoras de H_2 y ayudan a mantener baja la presión parcial de H_2 , esto favorece el desarrollo de BMA. Sin embargo cuando la concentración de sulfato es alta, la actividad metabólica de las BSRAC aumenta, superando e inhibiendo los demás grupos tróficos presentes. Las BSRAC compiten con las BMH y BMA por sustratos como formato e hidrógeno y con las BSA por compuestos como acetato y butirato, desfavoreciendo la producción de

metano. La concentración de BSRAC halladas en el consorcio LR+EP se encuentra aún dentro de un rango favorable ya que son superadas en gran cantidad por las BMA, lo que indica que no hay competencia por los sustratos entre estas 2 poblaciones [4, 5, 8].

5.8 Estudio del efecto de la relación sustrato/inóculo utilizando el consorcio seleccionado

Teniendo en cuenta que el proceso de digestión anaerobia para la degradación de la pulpa de fique se realiza en un reactor tipo *batch*, se hace necesario evaluar algunas desventajas que se presentan con el uso de esta configuración del reactor como la acumulación de productos intermediarios y la saturación por exceso de sustrato. Para evaluar la acumulación de productos intermediarios en este bioproceso, se debe valorar la producción de AGVs en todas las fermentaciones, ya que si se presenta acumulación de AGVs, se puede ocasionar acidificación dentro del reactor y fracaso del mismo. En cuanto a la saturación por exceso de sustrato, se debe valorar la cantidad tanto de inóculo como de sustrato que se debe agregar al reactor al iniciar la fermentación, para que este problema no se presente. Investigaciones realizadas anteriormente expresan estas concentraciones en términos de relación Inóculo/Sustrato, en donde se tiene en cuenta la cantidad de sólidos volátiles del inóculo por sólidos volátiles del sustrato.

En la **Figura 10** se presentan las cinéticas de producción de metano, utilizando como inóculo la mezcla LR + EP y como sustrato una cantidad variable de pulpa de fique en relación a los sólidos volátiles, esto con el fin de aumentar la cantidad de pulpa de fique aprovechada en el bioproceso. A partir de los resultados obtenidos se puede inferir que la producción de metano es inversamente proporcional a la carga de sólidos volátiles adicionada, ya que al aumentar la cantidad de pulpa adicionada al ensayo, se disminuía la producción de metano, lográndose evidenciar un nivel de saturación. La relación 0,5 (R: 0,5), contenía la mayor carga orgánica 0,5 g SV de inóculo/1 g SV de sustrato y presentó un volumen final de 2.516 ml a los 15 días de

reacción. La relación 1 (R:1) contenía 1 g SV de inóculo/1 g SV de sustrato. Esta relación alcanzó un volumen máximo de metano acumulado de 3.652 ml a los 15 días de reacción. Finalmente la relación 2 (R:2) era la relación con menor carga orgánica, 2 g SV de inóculo/1 g SV de sustrato. Esta relación presentó un volumen acumulado de metano de 2.043 ml.

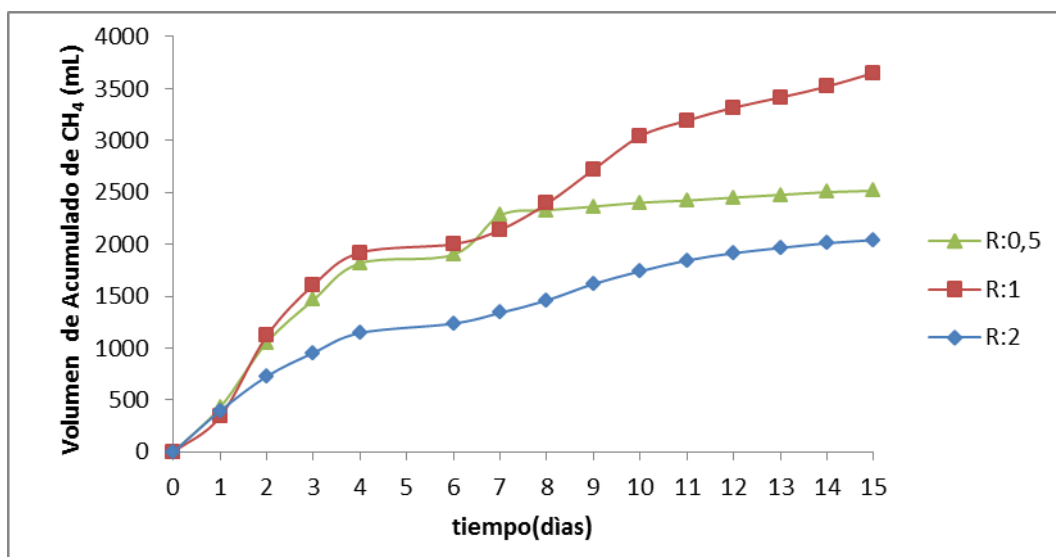


Figura 10. Cinéticas de producción de CH₄ (ml) Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y relaciones inóculo/sustrato de 0,5; 1 y 2 g SV temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.

A partir de los resultados obtenidos en la figura 10 se determinaron los rendimientos acumulados de producto en sustrato, obteniendo valores de 0,566 m³CH₄/Kg SV para R:2, 0,446 m³CH₄/Kg SV para R:1 y 0,171 para R:0,5, siendo R:2 la relación que presentó producciones de metano superiores a las reportada por *Mshandete et al* (0,22 m³CH₄/Kg SV). Es decir que con esta relación se produce una mayor cantidad de metano a partir de una menor cantidad de materia orgánica. La productividad volumétrica de producto acumulada Q_p (ml CH₄/día) también fue mayor para R:2 comparada con las demás relaciones evaluadas. De esta manera, se comprueba nuevamente la capacidad de los microorganismos presentes en el consorcio (LR+EP) para aprovechar la materia orgánica contenida en la pulpa de fique.

Se evidencia un nivel de saturación cuando se aumenta la concentración de sustrato utilizada como en el caso de R: 0,5; que fue la relación con mayor

carga orgánica y la que presentó los rendimientos y las productividades más bajas. Este resultado es similar a los reportados en otras investigaciones usando un lodo anaerobio como inóculo y glucosa como sustrato, en donde una relación Inóculo/Sustrato menor de 0,25 reduce drásticamente la producción de biogás hasta un valor de 0,23 m³/kg SV, debido a que se ocasiona acidificación en el reactor [51].

Por otra parte los rendimientos obtenidos para la relación R:1, la cual contenía 1g SV de inóculo/1g SV de sustrato, son superiores a los reportados por *Raposo et al.*, [52] para la misma relación quienes estudiaron la influencia de la relación Inóculo/Sustrato empleando desechos de maíz como sustrato y lodo anaerobio como inóculo, alcanzando un rendimiento de 211 ml CH₄/g SV adicionado.

Respecto a la concentración de inóculo/sustrato utilizada en la relación R:2, la cual contenía la menor concentración de carga orgánica, *Lópes et al.*, [53], demostraron que una mayor cantidad de inóculo adicionado en función de los sólidos volátiles es fundamental para mejorar los rendimientos de la producción de metano en un proceso de digestión anaerobia.

Adicionalmente se determinaron los porcentajes de metano en el biogás a partir de la digestión anaerobia de la pulpa de fique para cada una de las relaciones evaluadas. Las relaciones R:1 y R:2 mostraron los máximos valores de porcentaje de metano durante todo el tiempo de experimentación, alcanzando producciones de 42,5% y 43,6% respectivamente, lo que indica que cualquiera de estas dos relaciones inóculo sustrato es susceptible de ser usada para la degradación anaerobia de la pulpa de fique, ya que generan un alto porcentaje de metano en el biogás y por tanto un biogás de mejor calidad a diferencia de la relación R:0,5.

En la **Figura 11** se presentan los resultados obtenidos para los análisis de la concentración de AGVs, pH y alcalinidad para cada una de las relaciones evaluadas. En cuanto a los AGVs se comprobó nuevamente que valores

superiores a 8.000 mg/L de AGVs inhiben la producción de metano, causando disminución del pH y por tanto acidificación dentro del reactor. Este es el caso de la relación R:0.5, que presenta valores de AGVs 5.040 y 15.400 mg/L y por tanto presenta disminución del pH de 7,9 a 6,45y como consecuencia de ello se acidifica el reactor ocasionando significativas pérdidas en los rendimientos del proceso. El pH es una de las variables más importantes en el proceso de producción de metano debido a que los microorganismos dependen de esta condición ambiental para desarrollar su actividad metabólica [4]. Las relaciones R:1 y R:2 mantuvieron el pH en un rango óptimo de 7 a 8,2 durante todo el tiempo de reacción. La estabilidad del pH para estas relaciones puede ser atribuida a la capacidad buffer del sistema [51], la cual está dada por la alcalinidad. En cuanto a la alcalinidad R:0,5 presentó los mayores valores (4.300-10.300 mg CaCO₃/ml) esto demuestra la habilidad de los microorganismos para ejercer un efecto tampón sobre el bioproceso, neutralizando la acidez causada por los altos valores de AGVs y compensando el efecto negativo ocasionado por el descenso del pH, en comparación con las demás relaciones.

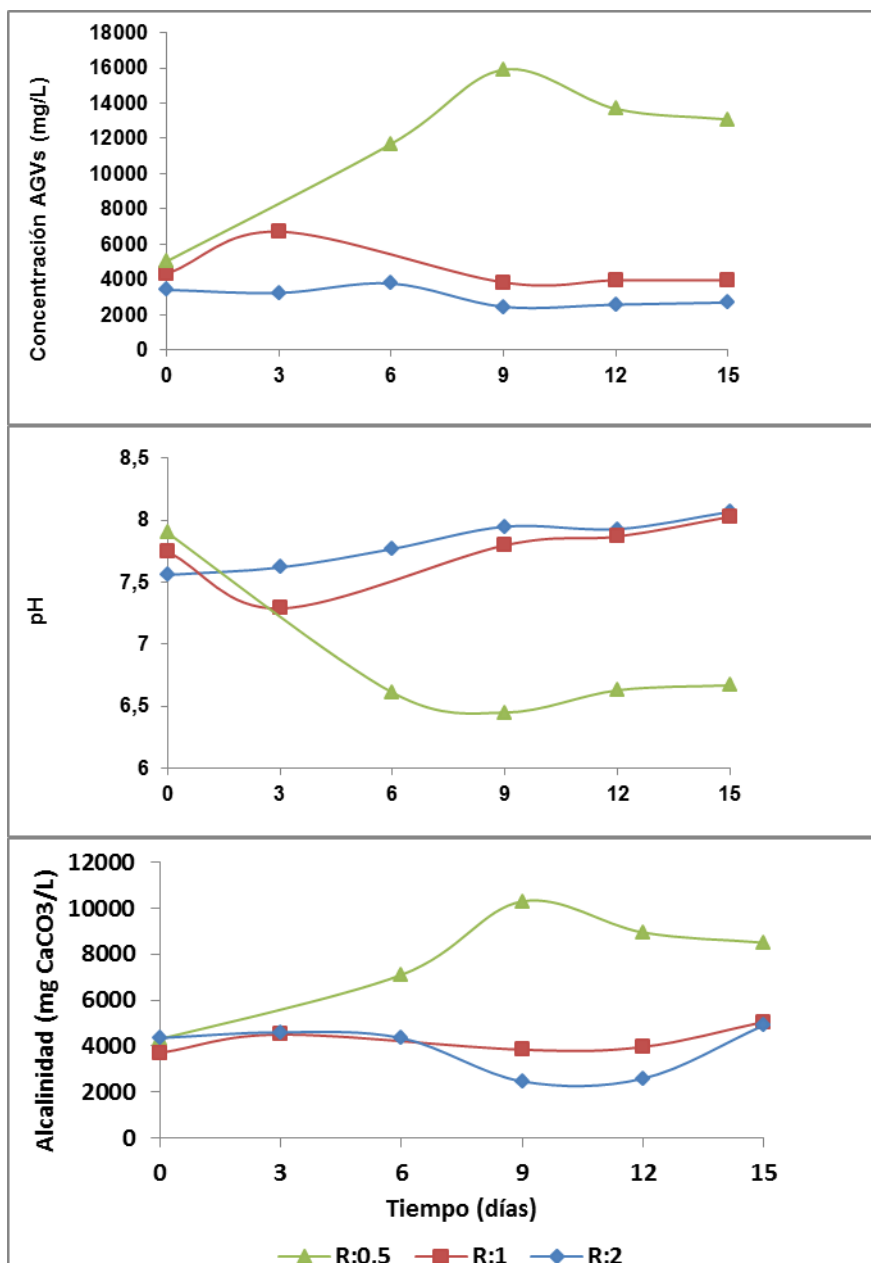


Figura 11. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad Ensayos realizados utilizando pulpa de fique como sustrato y relaciones inóculo/sustrato de 0,5; 1 y 2 g SV temperatura 39 °C, sin ajuste de pH, sin agitación.

En relación con el análisis estadístico, en la **Figura 12** se muestra la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados. Se evidencia una diferencia significativa entre los rendimientos de metano obtenidos por el consorcio microbiano para cada de las relaciones evaluadas, con un Índice de Confianza de 95% y un *valor P* = 0,000. El análisis estadístico se correlaciona con los resultados anteriores, debido a que la relación R:2 presenta los mayores valores de rendimiento y

productividad acumulados. Además se comprobó la distribución normal de los datos utilizando el test de Shapiro Wilks, comprobando que todos los datos mantenían una distribución normal para todas las muestras evaluadas.

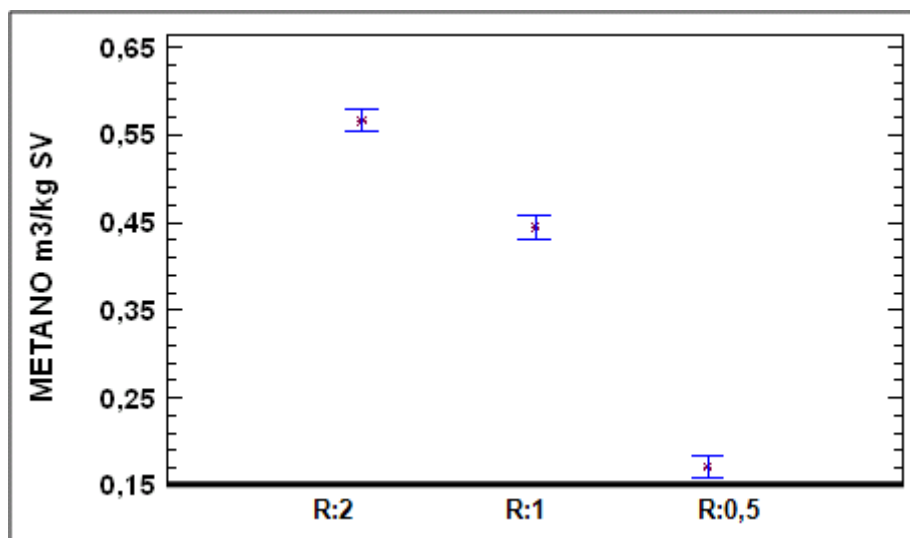


Figura 12. Distribución de medias y medianas para las cinéticas de producción de Metano utilizando relaciones inóculo/sustrato de 0,5; 1 y 2 g SV.

5.9 Estudio del efecto del pH sobre la digestión anaerobia de la pulpa de fique utilizando el consorcio seleccionado

En la **Figura 13** se presentan las cinéticas de producción de metano (ml CH₄/día), utilizando como inóculo la mezcla LR + EP y una carga orgánica de 2 g SV de inóculo/2 g SV de sustrato, a diferentes valores de pH, con el fin de establecer el mejor valor para el proceso de degradación anaerobia de la pulpa de fique. Al evaluar la producción de metano a pH 6 se evidencia una disminución drástica en el volumen de metano generado, en comparación con el volumen de metano producido a pH 7,7. El volumen acumulado de metano para las fermentaciones fue de 3.317 ml para la fermentación a pH 7,7 y 1.118 ml para la fermentación a pH 6. En cuanto al porcentaje de metano determinado para cada uno de los ensayos la diferencia fue menor. Sin embargo el mayor valor fue de 40,1% y correspondió a la fermentación a pH 7.7.

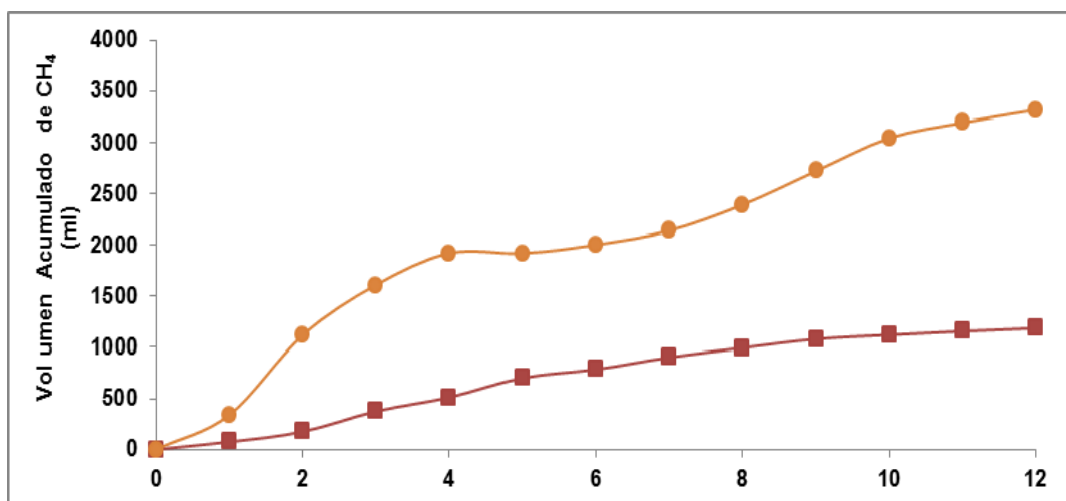


Figura 13. Cinética de producción de metano (ml CH₄/día). Ensayos realizados en reactores de 500 ml utilizando pulpa de fique como sustrato y una relación inóculo/sustrato 2 g SV, temperatura 39 °C, sin agitación.

A partir de los resultados obtenidos en la figura 13 se determinaron los rendimientos acumulados de producto en sustrato, obteniendo valores de 0,446 m³CH₄/Kg SV para la fermentación a pH 7,7 y 0,145 m³CH₄/Kg SV para la fermentación a pH 6. De esta manera se demostró el efecto negativo que causan los valores de pH ácidos sobre la estabilización de los reactores, debido a que se altera la capacidad tampón del mismo. Además los valores de pH ácido alteran las poblaciones tróficas presentes en el consorcio [50, 54]. La productividad volumétrica acumulada de producto Q_p (ml CH₄/día) también fue mayor a pH 7,7 comparada con la obtenida a pH 6.

En la **Figura 14** se presentan los resultados obtenidos para los análisis de la concentración de AGVs, pH y alcalinidad para cada una de las fermentaciones realizadas. En cuanto a los AGVs la fermentación a pH 6 presentó valores superiores a 8.000 mg/L inhibiendo la producción de metano, lo que a su vez ocasionó disminución del pH de 6,4 a 5,5 y por tanto acidificación dentro del reactor. Con respecto a la alcalinidad la fermentación a pH 6 presentó valores bajos (450-1.350 mg CaCO₃/ml) comparada con la fermentación a pH 7,7; esto sumado al efecto negativo que posee la disminución del pH, alteró la capacidad tamponante del sistema, impidiendo

que los microorganismos pudieran realizar sus funciones metabólicas normales[4, 46, 50].

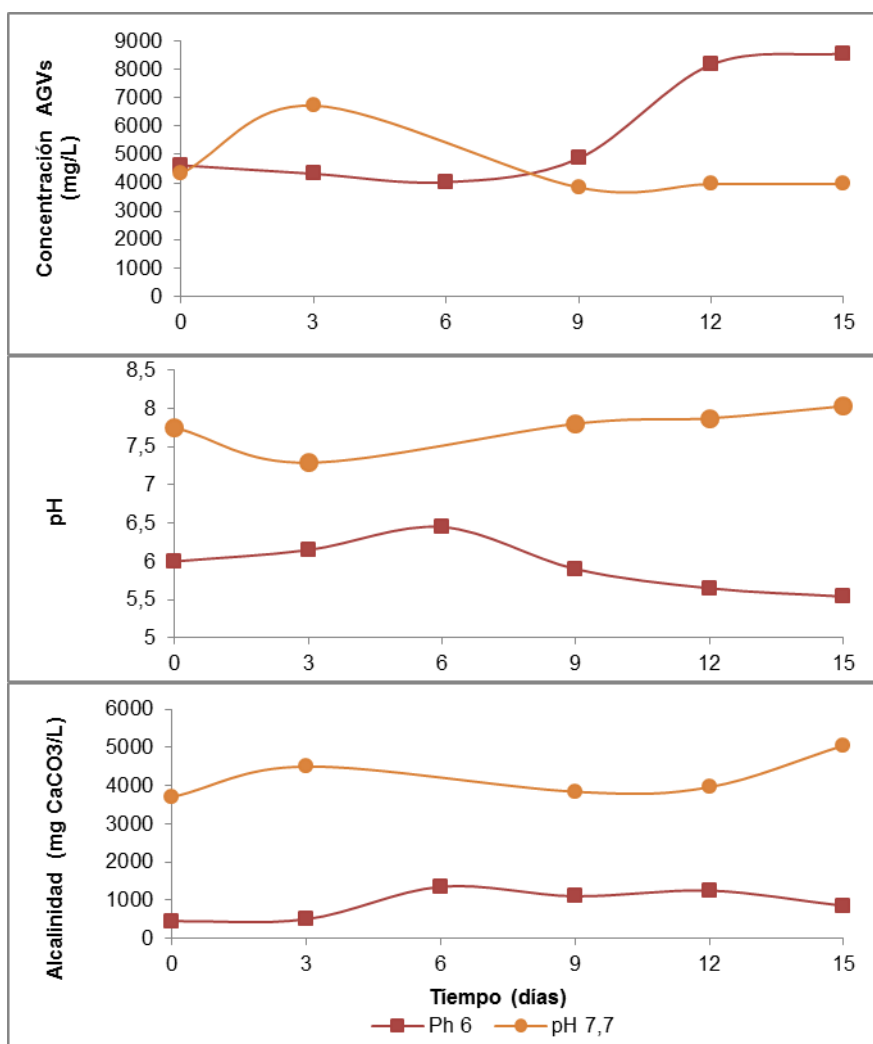


Figura 14. Cinética de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para cada una de las fermentaciones. Ensayos realizados a diferentes valores de pH utilizando pulpa de fique como sustrato y una relación inóculo/sustrato 2 g SV, temperatura 39 °C, sin agitación.

En relación con el análisis estadístico, en la **Figura 15** se muestra la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis de los resultados. Se evidencia una diferencia significativa entre los rendimientos de metano obtenidos por el consorcio microbiano para cada uno de los pH evaluados, con un Índice de Confianza de 95% y un *valor P* = 0,000. El análisis estadístico valida los resultados obtenidos en las gráficas anteriores, ya que los mejores rendimientos se obtuvieron sin modificar el pH. Por esta razón esta variable fue excluida del diseño de experimentos para el estudio de las

condiciones de operación. Además se comprobó la distribución normal de los datos utilizando el test de Shapiro Wilks, comprobando que todos los datos mantenían una distribución normal para todas las muestras evaluadas.

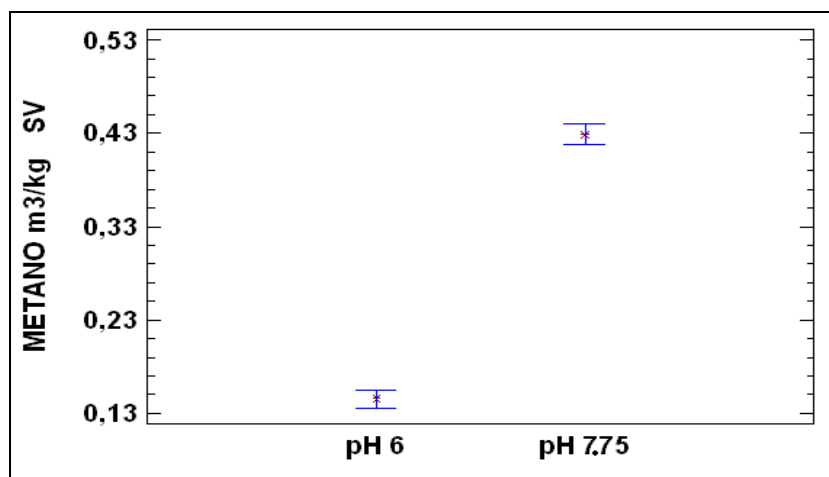


Figura 15. Distribución de medias y medianas para las cinéticas producción de Metano a diferentes valores de pH, utilizando una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

5.10 Estudio del efecto de la temperatura, agitación y aireación sobre la digestión anaerobia de la pulpa de fique utilizando el consorcio seleccionado

En la **Tabla 7** se muestra el diseño de experimentos para el estudio del efecto de las siguientes condiciones ambientales durante la fermentación: temperatura, agitación y aireación. En cada caso se evaluaron dos niveles. En el caso de la temperatura, se realizaron experimentos a temperatura ambiente y a 39 °C. En el caso de agitación el numero 1 corresponde a los reactores que estaban agitados continuamente a 150 rpm, mientras que el numero 0 corresponde a reactores no agitados. En el caso de la aireación, el numero 1 corresponde a reactores aireados durante 9 horas y posteriormente colocados en anaerobiosis y 0 corresponde a los reactores no aireados

Tabla 7. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de diferentes condiciones ambientales: temperatura, agitación y aireación sobre la producción de biogás

EXPERIMENTO	TEMPERATURA	AGITACION	TIEMPO DE AIREACION
R1	T ambiente	1	1
R2	T ambiente	1	0
R3	T ambiente	0	1
R4	T ambiente	0	0
R5	39° C	1	1
R6	39° C	1	0
R7	39° C	0	1
R8	39° C	0	0

En la **Figura 16** se presentan la cinética de producción de metano (ml CH₄/día) y la cinética de concentración de azúcares reductores (mg/ml) para los reactores R4 (temperatura ambiente, sin agitación y sin aireación) y R8 (39 °C, sin agitación y sin aireación). Estos experimentos se realizaron utilizando como inóculo la mezcla LR + EP y una carga orgánica de 2 g SV de inóculo/1 g SV de sustrato. En cuanto al volumen de metano, el máximo valor fue 2.270 ml obtenidos por R4 a los 15 días de reacción, comparado con 1.965 ml obtenidos por R8 durante el mismo tiempo de reacción. En cuanto a los porcentajes de metano determinados para cada uno de los ensayos, los mayores valores obtenidos fueron 42,5% para R4 y 39,5% para R8. De acuerdo con la cinética de concentración de azúcares reductores, el consumo de los mismos se vio favorecido en una condición de temperatura a 39 °C en comparación con la fermentación realizada a temperatura ambiente. Estos resultados demuestran que mayores temperaturas aumentan la actividad metabólica de los microorganismos metanogénicos y por tanto son más eficientes para degradar sustratos [4, 5, 24].

A partir de los resultados obtenidos de la figura 16, se calcularon los rendimientos acumulados de sustrato en producto (m³CH₄/Kg) y las productividades volumétricas de producto acumuladas Q_p (ml CH₄/día) para ambos experimentos. Estos valores fueron superiores para R4 (0,630

m³CH₄/kg SV y 189 ml CH₄/día, respectivamente) comparado con los obtenidos para R8 (0,545 m³ CH₄/kg SV y 164 ml CH₄/día, respectivamente).

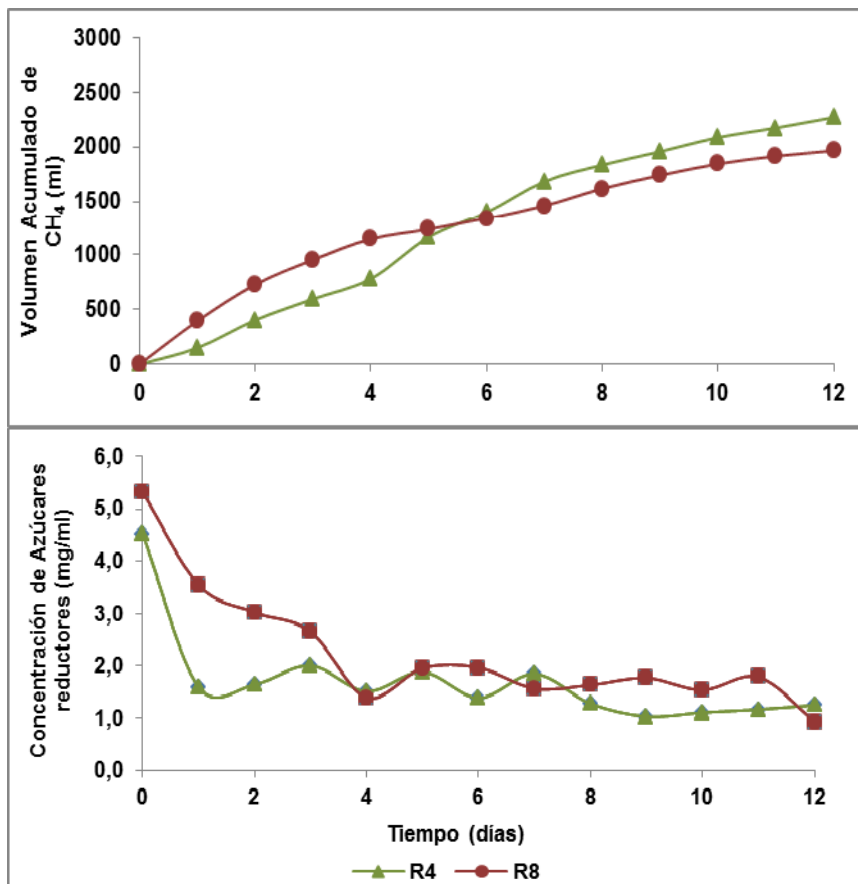


Figura 16. Cinética de producción de metano ml (CH₄/día) y cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, sin agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 17** se presentan los resultados obtenidos para los análisis de la concentración de AGVs, pH y Alcalinidad para los ensayos R4 y R8. De los resultados obtenidos se puede inferir que todos valores se encuentran dentro de los rangos óptimos para el proceso de digestión anaerobia, a excepción de los altos valores de AGVs presentados por R8, entre 4.320 y 11.400 mg/L, lo que podría explicar los bajos rendimientos en cuanto a la producción de metano [4, 46, 50].

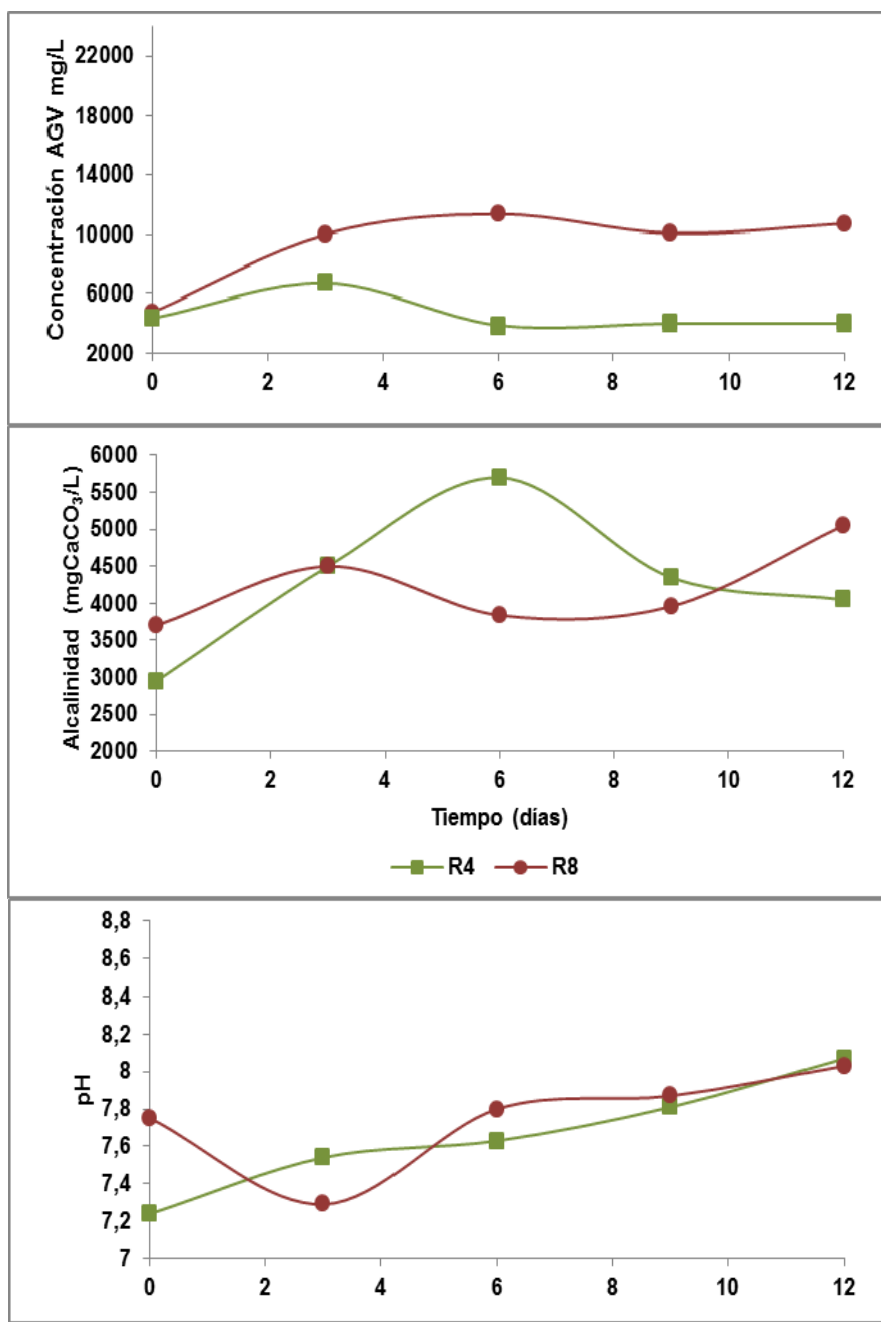


Figura 17. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, sin agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 18** se presentan la cinética de producción de metano (ml CH₄/día) y la cinética de concentración de azúcares reductores (mg/ml) para los reactores R2 (temperatura ambiente, con agitación y sin aireación) y R6 (39 °C, con agitación y sin aireación). Estos experimentos se realizaron utilizando como inóculo la mezcla LR + EP y una carga orgánica de 2 g SV de inóculo/1 g SV de sustrato. En esta figura se evidencia que no hay diferencias significativas

entre los dos ensayos, ya que los experimentos a ambas temperaturas presentan una tendencia similar para el volumen generado de metano. En cuanto a los porcentajes de metano determinados para cada uno de los ensayos, los mayores valores obtenidos fueron 42,1% para R2 y 43,8% para R6. La cinética de azúcares reductores, muestra que durante el primer día se presenta un alto consumo de azúcares y después de este tiempo la concentración permanece constante para ambos ensayos hasta el final de la digestión.

A partir de los resultados obtenidos de la figura 28, se calcularon los rendimientos acumulados de sustrato en producto ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{Kg}$) y las productividades volumétricas de producto acumuladas Q_p ($\text{ml CH}_4/\text{día}$) para ambos experimentos. Estos valores fueron ligeramente superiores para R6 ($0,695 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ y $209 \text{ ml CH}_4/\text{día}$, respectivamente) comparado con los obtenidos para R2 ($0,676 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ y $203 \text{ ml CH}_4/\text{día}$, respectivamente). R6 presentó los rendimientos y las productividades más altas en comparación con los demás ensayos incluidos en este diseño experimental, debido a que este ensayo combinaba dos variables como la temperatura de $39 \text{ }^\circ\text{C}$ y la agitación continua, las cuales según *Stroot et al.*, y *Kaparaju et al.*, son variables que ejercen un efecto positivo sobre el proceso de digestión anaerobia, ya que favorecen la actividad enzimática y metabólica de los microorganismos metanogénicos y además mantienen homogéneamente mezclado el sistema [18, 21, 55].

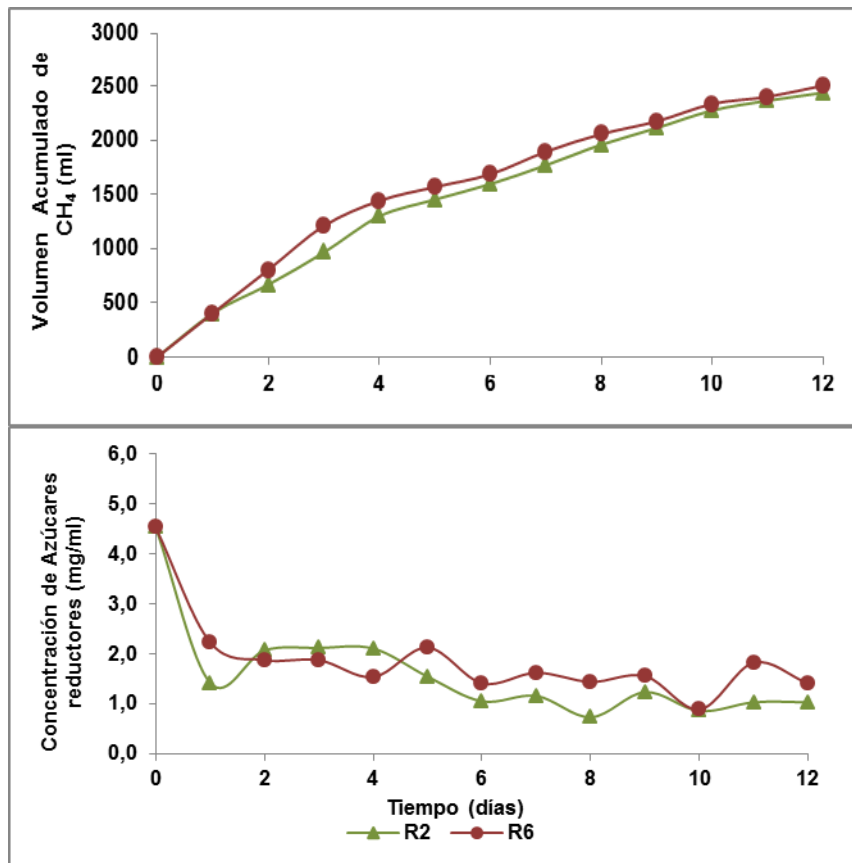


Figura 18. Cinética de producción de metano (ml CH₄/día) y cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 19** se presentan los resultados obtenidos para los análisis de AGVs, pH y Alcalinidad para los ensayos R2 y R6. A partir de la figura se evidencia un aumento significativo en los valores de AGVs de 3.840 a 18.420 mg/L para R2 y de 5.580 a 12.360 mg/L R6, esto posiblemente ocurrió debido a que la agitación aumenta la actividad metabólica de los microorganismos dentro de los reactores. Las concentraciones de AGVs obtenidas ocasionan inhibición de los microorganismos metanogénicos, ya que cuando la concentración de AGVs sobrepasa los 8.000 mg/L, la producción de metano en cuanto al volumen y porcentaje disminuyen considerablemente, pero no hay un daño total en los reactores debido a los altos valores de alcalinidad que también presentan estos ensayos, los cuales ejercen un efecto tampón para compensar la acidez [50, 54].

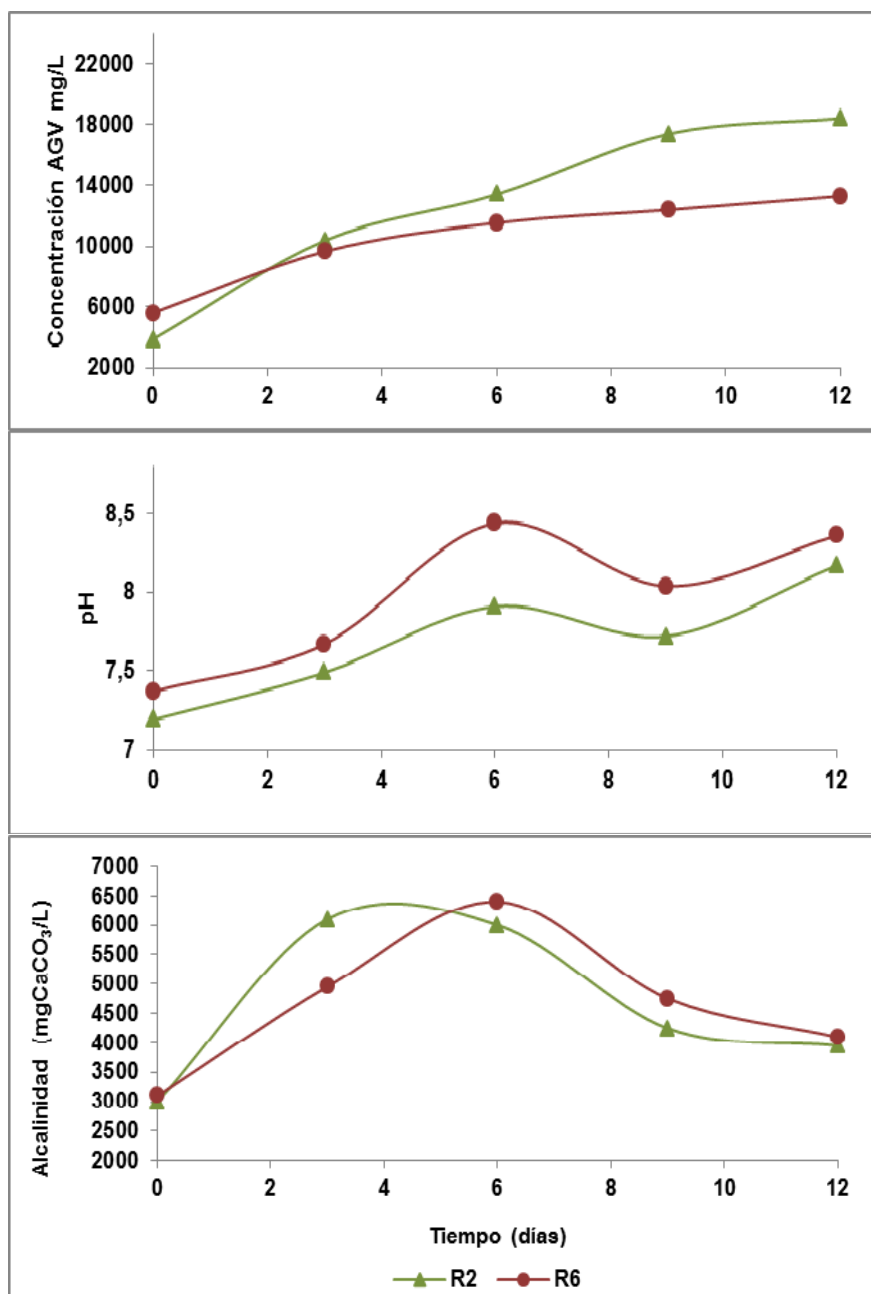


Figura 19. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y sin aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 20** se presentan la cinética de producción de metano (ml CH₄/día) y la cinética de concentración de azúcares reductores (mg/ml) para los reactores R3 (temperatura ambiente, con aireación y sin agitación) y R7 (39 °C, con aireación y sin agitación). Estos experimentos se realizaron utilizando como inóculo la mezcla LR + EP y una carga orgánica de 2 g SV de inóculo/2 g SV de sustrato. En esta figura se evidencia que no hay diferencias significativas

entre los dos ensayos, ya que los experimentos a ambas temperaturas presentan una tendencia similar para la producción de volumen de metano. En cuanto a los porcentajes de metano determinados para cada uno de los ensayos, los mayores valores obtenidos fueron 36,8% para R3 y 42,7% para R7. Similares resultados se obtuvieron para la cinética de azúcares reductores, en donde ambos experimentos mostraron un comportamiento análogo hasta el final de la digestión. Estos resultados demuestran que la aireación no es necesaria para la activación de los microorganismos hidrolíticos presentes en el consorcio como lo sugieren investigaciones anteriores [3, 56].

A partir de los resultados obtenidos de la figura 20, se calcularon los rendimientos acumulados de sustrato en producto ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{Kg}$) y las productividades volumétricas de producto acumuladas Q_p ($\text{ml CH}_4/\text{día}$) para los experimentos R3 y R7. Estos valores fueron superiores para R7 ($0,569 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ y $171 \text{ ml CH}_4/\text{día}$, respectivamente) comparado con los obtenidos para R3 ($0,489 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ y $147 \text{ ml CH}_4/\text{día}$, respectivamente). R3 presentó los rendimientos y las productividades más bajas en comparación con los demás ensayos incluidos en este diseño experimental, lo que se debió posiblemente a la baja temperatura, a la falta de agitación y además a la presencia del oxígeno y no de CO_2 o H_2 como aceptor de electrones ocasionada por la aireación.

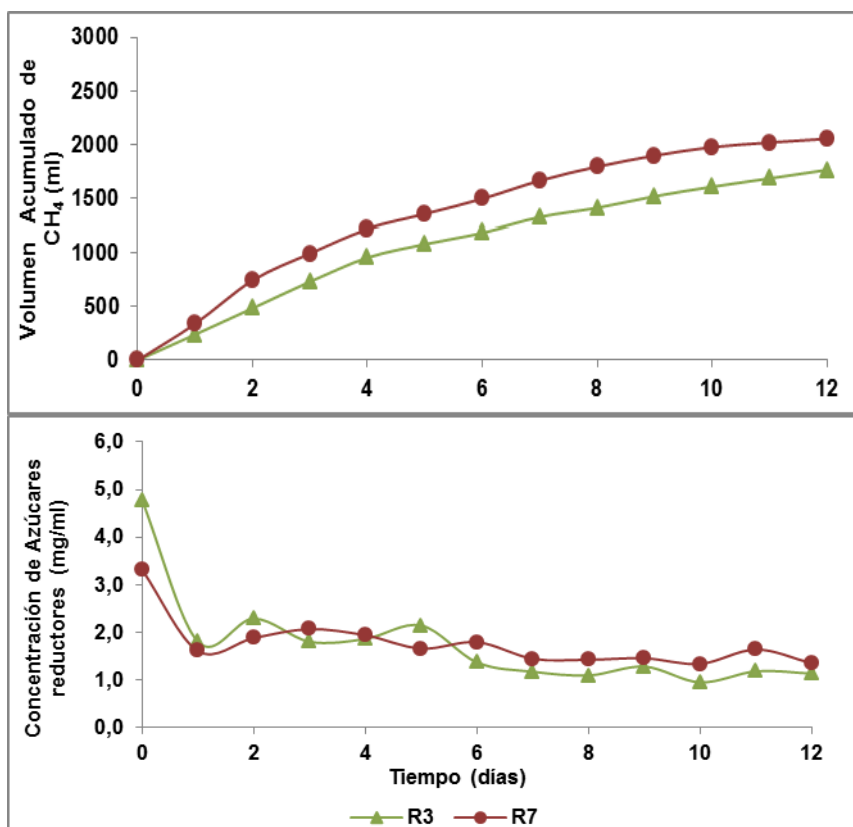


Figura 20. Cinética de producción de metano (ml CH₄/día) y cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con aireación y sin agitación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 21** se muestran los resultados para los análisis de AGVs, pH, Alcalinidad para las fermentaciones realizadas en un sistema aireado. En cuanto a los AGVs, se evidencia un aumento de 3.900 a 21.900 mg/L para el ensayo a temperatura ambiente y de 5.820 a 18.000mg/L para el ensayo a 39°C. Estas concentraciones de AGV ocasionan inhibición de los microorganismos metanogénicos, ya que la concentración de AGVs sobrepasa los 8.000 mg/L, el volumen y el porcentaje de metano disminuyen considerablemente, pero no hay un daño total de los reactores debido al efecto tamponante que ejerce la alcalinidad [50, 54, 57].

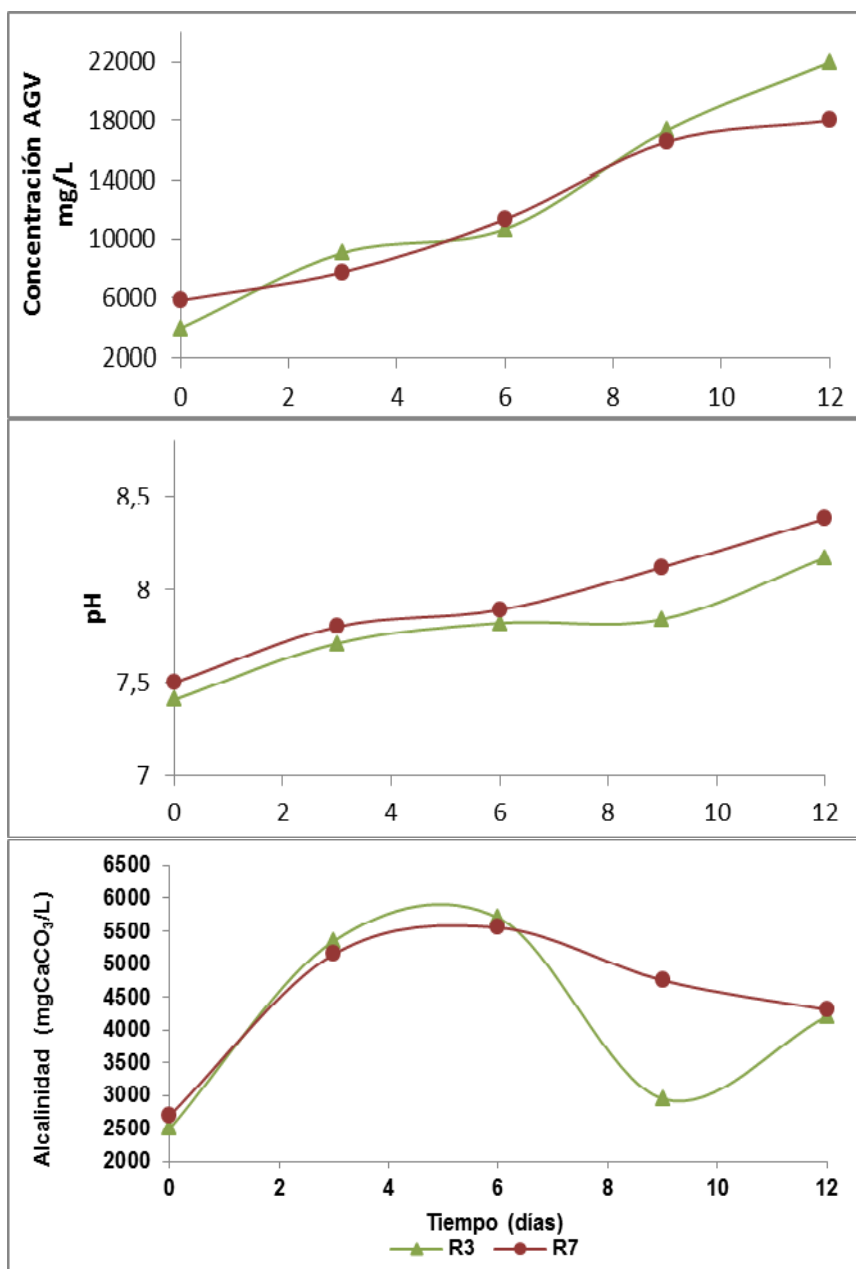


Figura 21. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con aireación y sin agitación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 22** se presentan la cinética de producción de metano (ml CH₄/día) y la cinética de concentración de azúcares reductores (mg/ml) para los reactores R1 (temperatura ambiente, con agitación y con aireación) y R5 (39 °C, con agitación y con aireación). Estos experimentos se realizaron utilizando como inóculo la mezcla LR + EP y una carga orgánica de 2 g SV de inóculo/1 g SV de sustrato. En esta figura se evidencia que no hay diferencias significativas entre los dos ensayos, ya que los experimentos a ambas

temperaturas presentan una tendencia similar para el volumen de metano. En cuanto a los porcentajes de metano determinados para cada uno de los ensayos, los mayores valores obtenidos fueron 34% para R1 y 41,8% para R5. La cinética de azúcares reductores, muestra que durante el primer día se presenta un alto consumo de azúcares y después de este tiempo la concentración permanece constante para ambos ensayos hasta el final de la digestión.

A partir de los resultados obtenidos de la figura 24, se calcularon los rendimientos acumulados de sustrato en producto ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{Kg}$) y las productividades volumétricas de producto acumuladas Q_p ($\text{ml CH}_4/\text{día}$) para los experimentos R1 y R5. Estos valores fueron similares ambos ensayos. R1 presentó un rendimiento de $0,620 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ y una productividad de $186 \text{ ml CH}_4/\text{día}$; mientras R5 presentó un rendimiento de $0,617 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ y una productividad de $185 \text{ ml CH}_4/\text{día}$. Como los ensayos fueron llevados a cabo en iguales condiciones de agitación y aireación y la única variable fue la temperatura, esto hace concluir que la temperatura no es una variable importante para este bioproceso, porque se obtienen rendimientos y productividades similares utilizando una u otra temperatura.

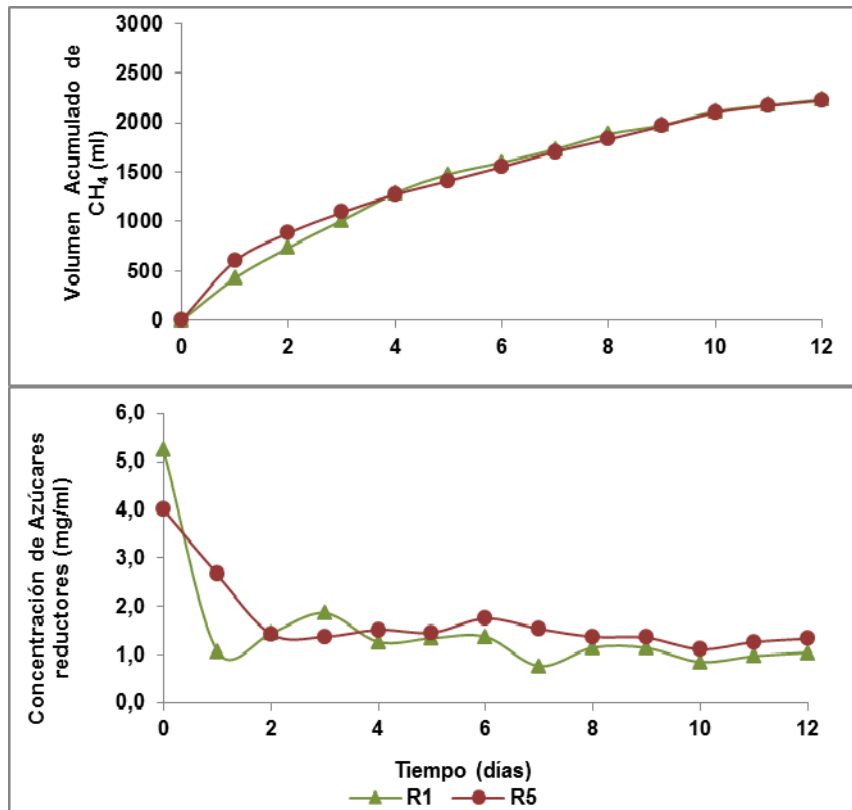


Figura 22. Cinéticas de producción de metano (ml CH₄/día) y porcentaje cinética de consumo de azúcares reductores (mg/ml) a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y con aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **Figura 23** se muestran los resultados para los análisis de AGVs, pH, alcalinidad para las fermentaciones realizadas en un sistema aireado y agitado. En cuanto a los AGVs, se evidencia un aumento de 4.080 a 17.160 mg/L para el ensayo a temperatura ambiente y de 6.600 a 14.100 mg/L para el ensayo a 39°C. Estas concentraciones de AGV ocasionan inhibición de los microorganismos metanogénicos, ya que la concentración de AGVs sobrepasa los 8.000 mg/L, el volumen y el porcentaje de metano disminuyen considerablemente, pero no hay un daño total de los reactores debido al efecto tamponante que ejerce la alcalinidad [50, 54, 57].

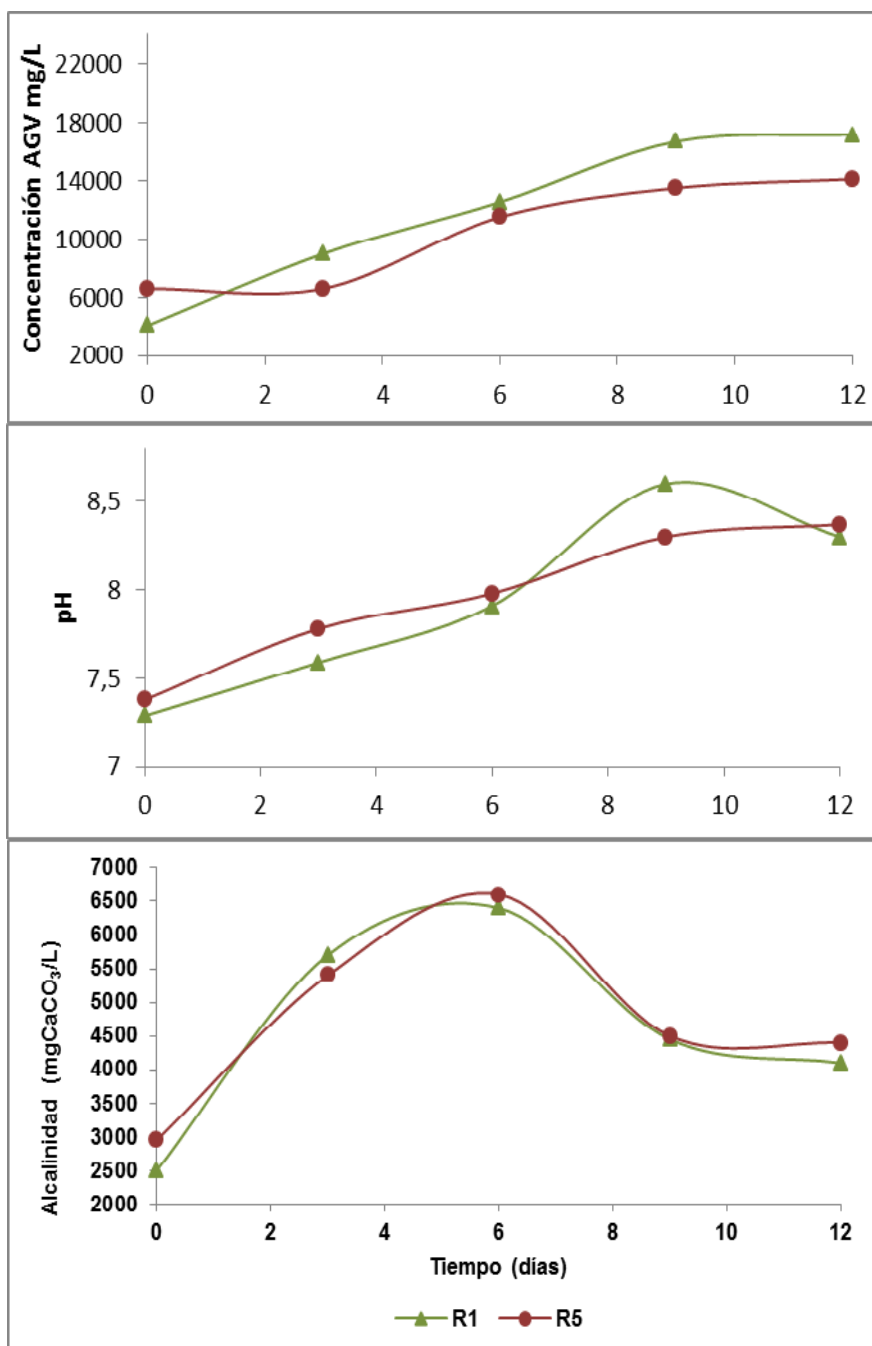


Figura 23. Cinéticas de producción de AGVs, pH y Alcalinidad para la Producción de biogás a partir de bagazo de fique. Ensayo realizado utilizando temperatura ambiente y 39 °C, con agitación y con aireación y una relación inóculo/sustrato 2 g SV.

En la **tabla 8** se presenta un consolidado de los resultados obtenidos de rendimiento y productividad acumulada de cada uno de los ensayos realizados para evaluar el efecto de las condiciones ambientales (temperatura, agitación y aireación) sobre la producción de biogás a partir de los residuos generados del beneficio del fique.

Tabla 8. Rendimientos y Productividades Acumuladas para cada uno de los ensayos del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de diferentes condiciones ambientales: temperatura, agitación y aireación sobre la producción de biogás

Experimento	Rendimiento Acumulado ($X_{s/p} = \text{m}^3 \text{CH}_4/\text{Kg SV}$)	Productividad Acumulada ($Q_p = \text{ml CH}_4 \cdot \text{día}$)
R1	0,620	186
R2	0,676	203
R3	0,489	147
R4	0,630	189
R5	0,617	185
R6	0,695	209
R7	0,569	171
R8	0,545	164

A partir de estos resultados, se puede concluir que los mejores rendimientos y productividades acumuladas de metano se obtienen en un sistema que combine como condiciones ambientales una temperatura de 39 °C, agitación y que no presente aireación, como se evidencia con el experimento R6. Los rendimientos y las productividades más bajas fueron obtenidas por los ensayos que presentaron una temperatura de ambiente, aireación y que no presentaron agitación, como se evidencia con el experimento R3.

En cuanto al análisis estadístico en la **Figura 24** se muestra la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis de los resultados del diseño de experimentos para el estudio de las diferentes variables de cultivo. Se evidencia una diferencia significativa entre las productividades volumétricas acumuladas de producto, obtenidas por el consorcio microbiano para cada una de las condiciones evaluadas, con un Índice de Confianza de 95% y un *valor P* = 0,0001. También se comprobó la distribución normal de los datos utilizando el test de Shapiro Wilks. El análisis estadístico valida los resultados obtenidos en las gráficas anteriores, ya que los los mayores volúmenes de metano se obtuvieron en el sistema que combinaba agitación con 39 °C (R6). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por *Lettinga et al.*, [50] y *Fezzani et al.*, [58]. quienes evaluaron los

efectos de de la temperatura mesofílica para el proceso de digestion anaerobia, concluyendo que las digetiones llevada a cabo a temperaturas cercanas a los 37 °C presentan altas tasas de rendimiento y productividad comparado con los reactores operados a temperaturas mas bajas. De igual forma las menores producciones de metano en cuanto a volumen fueron presentadas por el sistema que combinaba aireación ytemperatura ambiente (R3) estos resultados contradicen lo reportado por *Mshandete et al.*, [3] y *Sánchez et al.*, [56] quienes reportaron aumentos en la producción de metano realizando pretratamientos aeróbicos para mejorar la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia que es considerada por muchos autores la etapa limitante del bioproceso.

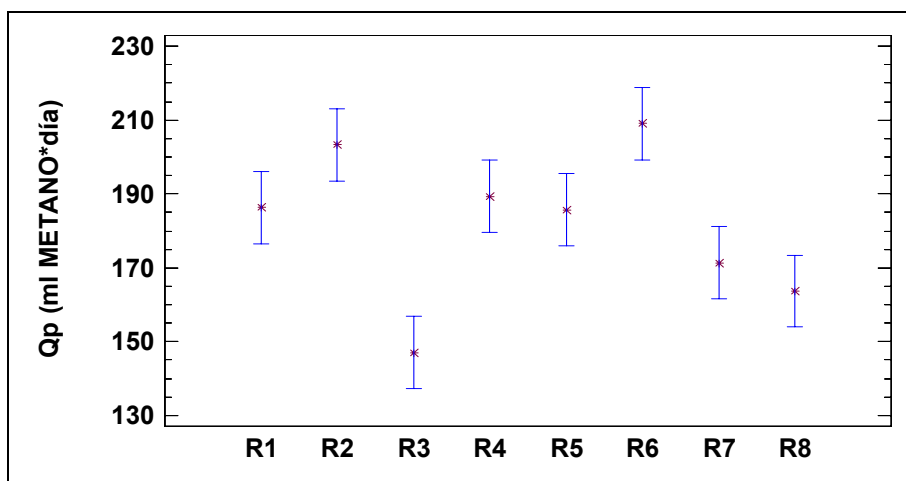


Figura 24. Distribución de medias y medianas para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto (Qp ml de Metano*día) a diferentes condiciones de cultivo.

En la **Figura 25** se presenta un análisis de pareto estandarizado para las productividades volumétricas acumuladas de producto. En este gráfico se muestran los efectos que presentan cada una de las condiciones de cultivo evaluadas sobre la Productividad. El nivel de significancia de los efectos fue alcanzado por las variables agitación y aireación, la primera con una efecto positivo y la segunda con un efecto negativo sobre la productividad. La variable temperatura y las combinaciones de cada una de las 3 variables evaluadas, no tuvieron efectos significativos sobre la Productividad de metano.

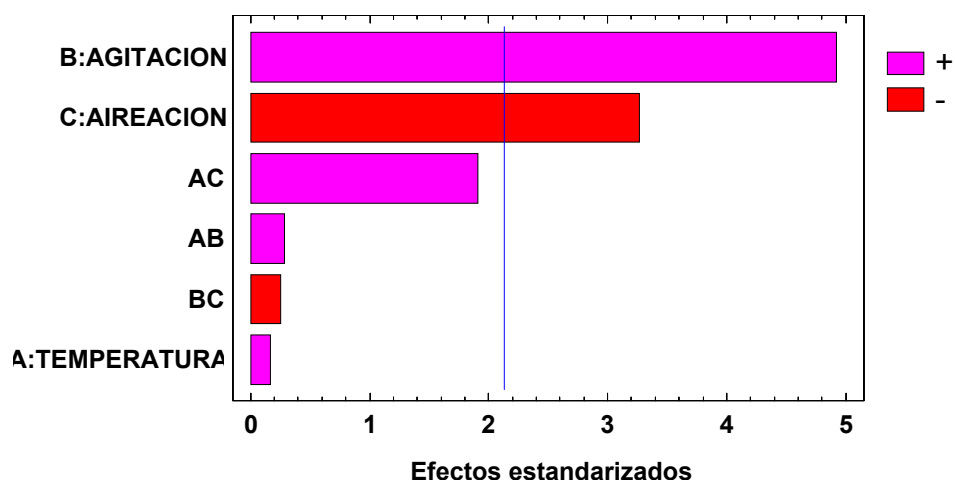


Figura 25. Pareto para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto (Q_p ml de Metano*día) a diferentes condiciones de cultivo.

En la **Figura 26** se presentan los Efectos Principales para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto. Esta figura muestra cuales son las variables que más efecto presentan sobre la productividad de metano. La temperatura, no presenta efecto significativo sobre la productividad, a diferencia de la agitación que presenta un efecto positivo y la aireación que presenta un efecto negativo para el proceso. Lo anterior significa que a más agitación y menor aireación en el sistema, hay mayor productividad de metano. Esto se puede explicar porque la agitación favorece los fenómenos de transferencia de masa, permitiendo que los microorganismos tengan más accesibilidad al sustrato y lo puedan degradar mejor [18, 21, 55]. En el caso de la aireación, se demuestra que no es necesaria para este tipo de consorcio microbiano, ya que contrario a los resultados esperados, inhibe a los microorganismos metanogénicos [4, 5].

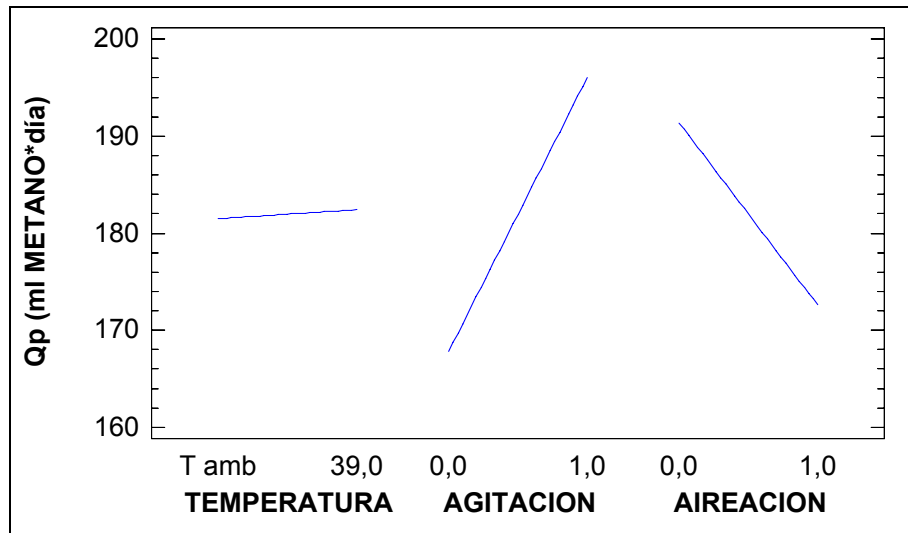


Figura 26. Efectos Principales para las Productividades Volumétricas Acumuladas de Producto (Qp ml de Metano*día) a diferentes condiciones de cultivo.

En cuanto al análisis estadístico realizado con base en los rendimientos obtenidos, en la **Figura 27** se muestra la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico del diseño de experimentos para el estudio de las diferentes variables de cultivo. Se evidencia una diferencia significativa entre los Rendimientos de Producto en Sustrato Acumulados, obtenidos por el consorcio microbiano para cada una de las condiciones evaluadas, con un Índice de Confianza de 95% y un *valor P* = 0,0002. También se comprobó la distribución normal de los datos utilizando el test de Shapiro Wilks. El análisis estadístico valida los resultados obtenidos en las gráficas y análisis anteriores. Los mayores volúmenes de metano se obtuvieron en el sistema que presentó las mayores productividades (R5). De igual forma las menores producciones de volumen de metano fueron presentadas por el sistema con menores productividades (R3).

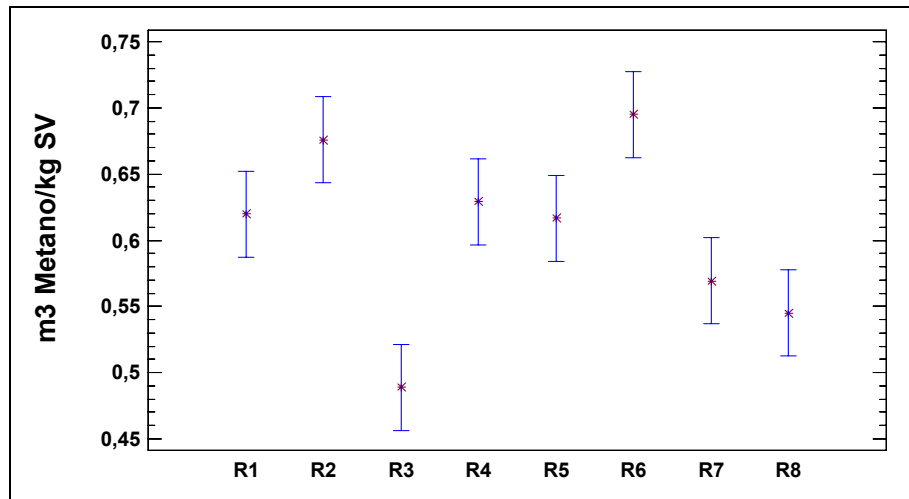


Figura 27. Gráfico de medias y medianas para los Rendimientos Acumulados de Producto en sustrato (m^3 Metano /kg SV) a diferentes condiciones de cultivo.

En la **Figura 28** se presenta un análisis de Pareto estandarizado para los Rendimientos de Producto en Sustrato Acumulados. En este gráfico se muestran los efectos que presentan cada una de las condiciones de cultivo evaluadas sobre el Rendimiento. El nivel de significancia de los efectos fue alcanzado nuevamente por las variables agitación y aireación, similar a lo observado en el análisis de productividad, la primera con un efecto positivo y la segunda con un efecto negativo. La variable temperatura y las combinaciones de cada una de las 3 variables evaluadas, no tuvieron efectos significativos sobre los Rendimientos de metano.

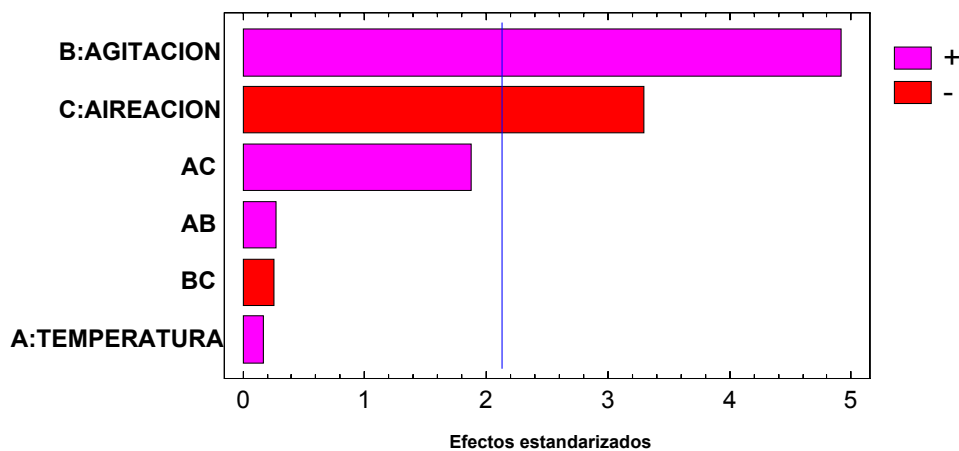


Figura 28. Pareto para los Rendimientos Acumulados de Producto en sustrato (m^3 Metano /kg SV) a diferentes condiciones de cultivo.

En la **Figura 29** se presentan los Efectos Principales para los Rendimientos de Producto en Sustrato Acumulados. Esta figura muestra cuales son las variables que más efecto presentan sobre los Rendimientos de metano. La temperatura, no presenta efecto significativo sobre el rendimiento, a diferencia de la agitación que presenta un efecto positivo y la aireación que presenta un efecto negativo, lo que indica, que a mayor agitación en el sistema, hay mayor rendimiento de metano [18, 21, 55]. En cuanto a la aireación, esta presenta un efecto negativo para el proceso, lo que significa que a mayor aireación menor rendimiento de metano [4, 5], debido a que disminuyen el CO₂ y el H₂ como aceptores de electrones a expensas de que aumenta el oxígeno y esto afecta principalmente a los microorganismos metanogénicos. Lo anterior se correlaciona con los resultados obtenidos y para el análisis estadístico de la Productividad Volumétrica de Producto Acumulada.

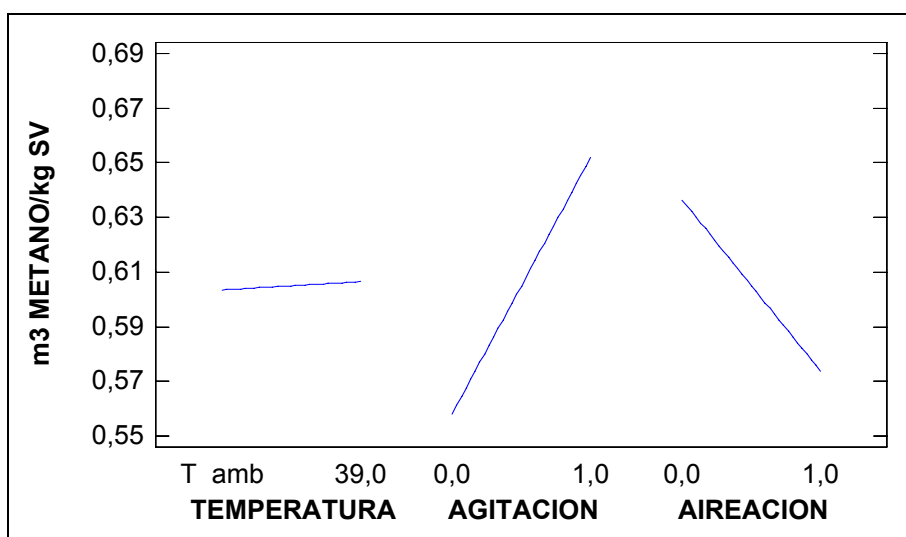


Figura 29. Efectos Principales para los Rendimientos Acumulados de Producto en sustrato (m³ Metano /kg SV) a diferentes condiciones de cultivo.

Finalmente con base en los análisis estadísticos realizados a los resultados del diseño experimental, se pueden mejorar las variables del proceso para obtener los mayores rendimientos y productividades de metano. En la **Tabla 9** se muestran los resultados obtenidos para este análisis de las variables con el fin de realizar la determinación de las mejores condiciones de cultivo. El análisis muestra que los mayores valores de metano se obtienen en un sistema

que combine 39 °C, agitación y aireación, pero se pueden obtener valores óptimos de rendimiento en un sistema que combine temperatura ambiente, agitación y que no presente aireación.

Tabla 9. Análisis estadístico de las variables para aumentar los rendimientos y las productividades de metano.

FACTOR	INFERIOR	SUPERIOR	MEJOR
Temperatura (°C)	25	39	25
Agitación (rpm)	0	120	120
Tiempo de Aireación	0	9 h	0

6. CONCLUSIONES

El uso de sustratos modelos como celulosa y acetato para evaluar la producción de metano, fue una metodología efectiva para predecir el comportamiento de los diferentes inóculos durante la degradación anaerobia de la pulpa de fique.

La co-digestión estiércol porcino-líquido ruminal es un inóculo adecuado para la degradación de sustratos como el bagazo de fique. Estos consorcios exhiben eficientes actividades hidrolíticas y metanogénicas. Así como buena afinidad al sustrato.

La determinación de los valores de la actividad hidrolítica, actividad metanogénica y afinidad al sustrato de los inóculos, fueron parámetros adecuados para realizar la selección del inóculo, ya que nos permitieron identificar eficientemente el consorcio con mayor potencial para la degradación de la pulpa de fique.

Las actividades metabólicas eficientes mostradas por inóculo LR+EP están dadas por la distribución adecuada de los grupos tróficos presentes en el consorcio.

La relación inóculo/sustrato adecuada para este bioproceso es de 2 g SSV de inóculo/1 g SSV sustrato. Lo anterior se puede inferir teniendo en cuenta que con las demás relaciones estudiadas se evidencian problemas de saturación.

El uso del diseño experimental para el estudio de las condiciones de cultivo para el proceso de obtención de metano a partir de los residuos del fique, permitió establecer que las condiciones óptimas para el proceso se presentan a una temperatura de 25 °C, utilizando un sistema agitado no aireado. Además se demostró que la temperatura es una variable indiferente en el bioproceso.

Se determinó que para el proceso de producción de biogás a partir de sustratos generados del beneficio del fique no es necesario realizar un control de los valores de pH, ya que los mejores rendimientos acumulados de producto en sustrato ($Y_{p/s}$) se obtuvieron en fermentaciones realizadas sin modificación de esta variable.

Finalmente, este trabajo de investigación muestra que es viable la producción de metano a partir del bagazo de fique, con lo cual sería posible resolver el problema de acumulación y contaminación generada por los residuos, y desarrollar un proceso generador de energía a partir de recursos renovables.

7. RECOMENDACIONES

Con el objetivo de aumentar la biodegradabilidad del material orgánica contenida en el bagazo de fique se recomienda evaluar diferentes pretratamientos al material como pre-hidrólisis o disminución del tamaño de partícula, ya que de esta manera se pueden solubilizar mejor los polisacáridos y eliminar algunos inhibidores como la lignina. Adicionalmente a esto se puede evaluar la digestión anaerobia de la pulpa de fique mezclándola con otros sustratos como la melaza, la cual al poseer altas concentraciones de azúcares libres podría aumentar la energía de activación requerida por las enzimas microbianas, haciendo de esta manera menor el tiempo de estabilización de los reactores.

Si se desea aumentar los rendimientos de producción de metano, sería recomendable evaluar la separación de las etapas hidrolítica y acidogénica de la etapa metanogénica, ya que de esta manera se pueden favorecer los grupos tróficos que actúan en cada una de ellas y ha sido una técnica de mucho estudio por otros investigadores.

Otra forma de favorecer los grupos tróficos presentes en los consorcios a utilizar para la digestión anaerobia sería la adición de macro o micronutrientes necesarios para el correcto desarrollo de estos microorganismos. Sería recomendable evaluar cuáles serían los más importantes a adicionar al medio de reacción teniendo en cuenta que no se incrementen en gran medida los costos del proceso.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR. Guía Ambiental del Subsector Fiquero. 2nd Edición.. Bogotá D.C., Colombia, 2006, pp. 21-58.
2. P. Barrera, X. Salas, L. Castro, C. Ortiz, H. Escalante, Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso de beneficio del fique, *Revista Ion*. 22(1) (2009) 53-61.
3. A. Mshandete, L. Björnsson, A. Kivaisia, M. Rubindamayugia, B. Mattiasson, Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment, *Water Res*. 39 (2005) 1569–1575.
4. S. Khanal, *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications*, First Edition. Blackwell Publishing. Hawaii, USA, 2008, pp 29-63. ISSN: 978-0-813-82346-1 on line.
5. J. Bullock, B. Kristlansen, *Basic Biotechnology.*, in: Hawakes, F., Hawakes, D., *Anaerobic Digestion*. Academic Press, First Edition. London, United Kingdom, 1989, pp 337-358.
6. I. Valdez-Vazquez, H. Poggi-Varaldo, Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew Sust Energ Rev*. 13 (2009) 1000-1013.
7. E. Salminen, J. Rintala, Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste, *Bioresource Technol*. 86 (2002) 13-26.

8. M. Díaz-Báez, S. Espitia, F. Molina, *Digestión Anaerobia: Una aproximación a la tecnología*. First Edition. Universidad Nacional de Colombia Editorial. Bogotá D.C., Colombia 2002.
9. W. Silva, V. Duarte, S. Prasad, Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste, *Bioresource Technol.* 94 (2004) 261-266.
10. M. Madigan, J. Martinko, J. Parker, *BROCK Biología de los Microorganismos*. Eighth Edition, Prentice Hall Iberia., Madrid, España, 2004, pp 501-517.
11. C. Sullivan, P. Burrell, W. Clarke, L. Blackall, Comparison of cellulose solubilisation rates in rumen and landfill leachate inoculated reactors, *Bioresource Technol.* 97 (2006) 2356–2363.
12. A. Mshandete, A. Kivaisia, M. Rubindamayugia, B. Mattiasson, Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes, *Bioresource Technol.* 95 (2004) 19–24.
13. Z. Hu, H. Yu, Anaerobic digestion of cattail by rumen cultures, *Waste Manage.* 26 (2006) 1222–1228.
14. W. Hu, J. Liu, J. Ye, Y. Wu, Y. Guo, Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro, *Anim Feed Sci .* 120 (2005) 333–339.
15. T. Amon, V. Kryvoruchko, W. Zollitsch, K. Mayer, L. Gruber, Biogás production from maize and dairy cattle manure—Influence of biomass composition on the methane yield, *Agr Ecosyst Environ.* 118 (2007) 173–182.
16. P. Panichnumsin, A. Nopharatana, B. Ahring, P. Chaiprasert, Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure, *Biomass and Bioenergy*. 2010. Article in press.

- 17.I. Buendía, F. Fernández, J. Villaseñor, L. Rodríguez, Feasibility of anaerobic co-digestion as a treatment option of meat industry wastes, *Bioresource Technol.* 100 (2009) 1903–1909.
- 18.P. Stroot, K. McMahon, R. Mackie, L. Raskin, Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions: Digester performance, *Water Res.* 35 (7) (2001) 1804–1816.
- 19.K. McMahon, P. Stroot, R. Mackie, L. Raskin, Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions: Microbial population dynamics, *Water Res* 35 (7) (2001) 1817–1827.
- 20.B. Magbanua, T. Adams, P. Johnston, Anaerobic codigestion of hog and poultry waste, *Bioresource Technol.* 76 (2001) 165-168.
- 21.J. Álvarez, L. Otero, J. Lema, A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes, *Bioresource Technol.* 101 (2010) 1153–1158.
- 22.Z. Hu, G. Wang, H. Yu, Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values, *Biochem Eng J.* 21 (2004) 59-62.
- 23.G. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal Chem.* 31 (3) (1959) 426-428.
- 24.G. Lettinga, S. Rebac, G. Zeeman, Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment, *Trends in Biotechnology* . 19: 9 (2001) 363-370.
- 25.Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR. Acuerdo para el Fomento de la Producción y la Competitividad del Subsector del Fique. First Edición. Bogotá D.C., Colombia, 2004.
- 26.A. Echavarría, Residuos de fique y caña, útiles en producción de plásticos. [cited]. 2008.

27. ECOFIBRAS Ltda, Fondo para la Acción Ambiental (FPAA), Corporación Autónoma Regional de Santander (CAS). Proyecto proceso de descontaminación de lavado de fibras naturales y aguas residuales en la zona de carga hídrica del río Mogoticos, fuente abastecedora del acueducto de San Gil. 2004.
28. A. Santos, H. Jiménez, A. Cano, Efecto in vitro de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales, *Revista CORPOICA*. 6: 1 (2005) 20 - 25.
29. A. Hendriks, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol.* 100 (2009) 10-18.
30. L. Barton. Sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology - Handbooks 8*: New York. USA. 1995. ISBN: 0-306-44857-2.
31. D. Boone. W, Whitman, P. Rouvière, Diversity and taxonomy of methanogens. *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Chapman and Hall Inc. New York, USA. 1993, p. 35–80.
32. J. Bélaich. M, Bruschi. J, Garcia. Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer. 54 Symposium Federation of European Microbiological Societies. 1989. Marseille, France. ISBN: 0-306-43517-9.
33. J. Osorio, H. Ciro, H. González, Evaluation of a biodigester system in series for cold climate, *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 60: 2 (2007) 4145-4162.
34. A. Cardona, O. Sanchez, J. Ramírez, L. Alzate, Biodegradation of organic solid wastes from market places, *Revista Colombiana de Biotecnología*. VI:2 (2004) 78-89 .

- 35.I. Moreno, G. Buitrón. Influencia del Origen del Inoculo en la Prueba de Biodegradabilidad Anaerobia. XIII Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, Guanajuato, México. 2002.
- 36.A. Campos, Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante Codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Departamento de Medio Ambiente y Ciencias del suelo. Lleida, España. Universidad de Lleida, 2001.
- 37.L. Carrillo. Rumen y Biogás. En: _____Microbiología Agrícola. Primera Edición. s.l ed. 2003. p. 1-16. 38.
- 38.H. Chanakya, J. Modak, K. Jagadish, Fermentation properties of agro-residues, leaf biomass and urban market garbage in a solid phase biogás fermenter, Biomass and Bioenergy. 16 (1999). 417-429.
- 39.I. Bohn, B. Mattiasson, The energy balance in farm scale anaerobic digestion of crop residues at 11–37 8C, Process Biochemistry. 42 (2007) 57–64.
- 40.J. Pineda, Enriquecimiento proteico de los desperdicios de fique para la alimentación animal. Seminario sobre Fibras Naturales. 1998.
- 41.B, Rincón. R, Borja. J, Gonzales. M, Portillo. C. Jimenez, Performance and microbial communities of a continuous stirred tank anaerobic reactor treating two-phases olive mill solid wastes at low organic loading rates, Biotechnology. 121 (2006) 534-543.
- 42.S. Estrada, Análisis económico y ventajas comparativas en el procesamiento y aplicación del abono proveniente de los jugos y el bagazo de fique. Seminario sobre Fibras Naturales. Rionegro-Antioquia. 1998:

- 43.C. Sandoval, M. Carreño, E. Castillo, Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment, *Waste Management*. 29 (2009). 704–711.
- 44.APHA - American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Edition 20th. Washington, USA, 1998.
- 45.G. Demirer, S. Chen, Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure, *Process Biochem*. 40 (2005) 3542–3549.
- 46.A. Mshandete, L. Björnsson, A. Kivaisia, M. Rubindamayugia, B. Mattiasson, Effect of particle size on biogás yield from sisal fibre waste, *Renew Energ*. 31 (2006) 2385–2392.
- 47.P. Sosnowski, S. Ledakowicz, Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste,. *Advances in Environmental Research*. 7 (2003) 609–616.
- 48.J. Field, *Curso de arranque y operación de reactores anaerobios con flujo ascendente y manto de lodos UASB (Workshop about startup and operation of reactor and upflow anaerobic sludge blanket UASB)*. Universidad del Valle Editorial. Cali, Colombia. Sección B, 1987, pp.1-34.
- 49.L. Björnsson, T. Jantsch, B. Mattiasson, Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion, *Wat. Res*. 35:12 (2001) 2833–2840.
- 50.R. Carrhá, A. Cornelius, G. Zeeman, G. Lettinga, The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems, *Bioresource Technol*. 97 (2006) 1105–1118.
- 51.T. Chen, Effects of ph and substrate:inoculum ratio on batch methane fermentation, *Bioresource Technology*. 56(1996) 179-186

- 52.F, Raposo. I, Siegert. S, Heaven. R. Borja, Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests, *Process Biochemistry*. 41 (2006) 1444–1450.
- 53.W. Silva-Lopes, V. Duarte, S. Prasad, Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technol* 94 (2004) 261-266.
- 54.Y. Chen, J. Cheng, K. Creamer, Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresource Technol*. 99 (2008) 4044–4064.
- 55.Kaparaju P, B.I., Ellegaard L, Angelidakia I, Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology* 2008. 99: p. 4919–4928.
- 56.E. Sanchez, R. Borja, L. Travieso, F. Raposo, M, Colmenarejo, Aerobic degradation kinetic of the effluent derived from the anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue, *International Biodeterioration & Biodegradation* 60 (2007) 60–67.
- 57.Q. Wang, H. Ogawa, Y. Kato, Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion, *Biomass and Bioenergy*. 16 (1999) 407-416.
- 58.B. Fezzani, Optimisation of the mesophilic anaerobic co- digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste in a batch digester, *Desalination*. 228 (2008) 159-167.

ANEXO 1

Medio de cultivo Actividad Hidrolítica

Para 1.000 ml:

- Soln mineral de Balch sin sulfuros	50 ml
- Soln oligoelementos sin sulfuros	10 ml
- K_2HPO_4	0,3 g
- Soln de resarzurina (0,1 %)	1,0 ml
- Extracto de Levadura	0,1 g
- Peptona Tripticasa	0,1 g

Se completa el volumen a 1 L se ajusta el pH a 7,0 con NaOH 1N, agregar 10% en volumen de agua destilada adicional, hervir hasta llegar al volumen de 1 L y enfriar bajo atmósfera de N_2 .

Cuando esté a temperatura ambiente agregar:

- $NaHCO_3$	2,0 g
- Cisteína	0,5 g

Dosificar bajo corriente de nitrógeno. Se gasea el frasco donde se va a servir con N_2 y se agrega el medio. Servir 250 ml en botellas de 500 ml, agregar una concentración de Celulosa de 10 g/L, hacer el intercambio gaseoso de fase N_2/CO_2 (80% - 20%) por 1 minuto, se debe retirar primero la aguja con la cual se está gaseando para que no haya una sobre expresión y luego la aguja de desalojo, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, antes de utilizarlo agregar:

- Na_2S (2,0%)	6 ml
- Soln diluida de vitaminas de Balch	6 ml

ANEXO 2

Medio de cultivo Actividad Metanogénica Específica

Para 1.000 ml:

- Sln mineral de Balch sin sulfuros	50 ml
- Sln oligoelementos sin sulfuros	10 ml
- K ₂ HPO ₄	0,3 g
- Sln de resarzurina (0,1 %)	1,0 ml
- Extracto de Levadura	0,1 g
- Peptona Trypticase	0,1 g

Se completa el volumen a 1 L se ajusta el pH a 7,0 con NaOH 1N, agregar 10% en volumen de agua destilada adicional, hervir hasta llegar al volumen de 1 L y enfriar bajo atmósfera de N₂.

Cuando esté a temperatura ambiente agregar:

- NaHCO ₃	2,0 g
- Cisteína	0,5 g

Dosificar bajo corriente de nitrógeno. Se gasea el frasco donde se va a servir con N₂ y se agrega el medio. Servir 250 ml en botellas de 500 ml, hacer el intercambio gaseoso de fase N₂/CO₂ (80% - 20%) por 1 minuto, se debe retirar primero la aguja con la cual se está gaseando para que no haya una sobre expresión y luego la aguja de desalojo, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, antes de utilizarlo agregar:

- Na ₂ S (2,0%)	6 ml
- Sln diluida de vitaminas de Balch	6 ml
- Solución de Ácido Acético 100g/L	18 ml

ANEXO 3

Medio de cultivo Caracterización Microbiológica

Medio de cultivo para recuento de bacterias anaerobias estrictas (BAS)

Para 1.000 ml.

- SIn mineral de Balch sin sulfuros	50,0 ml
- K ₂ HPO ₄	0,30 g
- Fe(SO ₄). 7H ₂ O (0,2%)	1,0 ml
- SIn oligoelementos sin sulfuros	10,0 ml
- NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,50 ml
- Azul de bromotimol (1,0%)	1,0 ml
- Extracto de Levadura	2,0 g
- Peptona Trypticasa	2,0 g
- Glucosa	10,0 g

Se completa con agua destilada a 1.000 ml, se ajusta el pH con NaOH 1N, agregar 10% en volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 Litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- NaHCO ₃	5,0 g
- Cisteína	0,5 g

Servir 5 ml en tubos Hungate, hacer cambio de fase N₂/CO₂ (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, antes de utilizarlo agregar:

- Na ₂ S . 9H ₂ O (2,0%)	0,05 ml/ 5ml
- SIn diluida de vitaminas de Balch	0,05 ml/ 5ml

Después del autoclavado el pH debe ser 7,1.

Medio de cultivo para recuento de bacterias fermentadoras de lactosa y glucosa (BFG Y BFL)

Para 1.000 ml.

- Soln mineral de Balch sin sulfuros	50,0 ml
- Soln oligoelementos sin sulfuros	10,0 ml
- K_2HPO_4	0,30 g
- $Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0,2%)	1,0 ml
- $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,5 g/L)	1,0 ml
- Azul de bromotimol (1,0%)	1,0 ml
- Extracto de Levadura	2,0 g
- Peptona Trypticasa	2,0 g
- Selenito de sodio (1,73 g/L)	1,0 ml

Para las BFG tomar 500 ml del medio anterior y agregar 5 g de Glucosa. Ajustar el pH a 7,1 hervir y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- $NaHCO_3$ (10%)	2,5 g
- Cisteína. HCl	0,25 g

Para las BFL tomar los 500 ml de medio restantes y agregar 3,6 ml de Lactato de sodio (60% en peso) o 2,6 ml de ácido láctico. Ajustar el pH a 7,25; hervir y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- $NaHCO_3$ (10%)	2,5 g
- Cisteína. HCl	0,25 g

Servir 5 ml en tubos hungate, bajo atmósfera de Nitrógeno, hacer cambio de fase N_2 / CO_2 (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, antes de utilizarlo agregar:

- $Na_2S \cdot 9H_2O$ (2,0%)	0,05 ml/ 5ml
- Soln diluida de vitaminas de Balch	0,05 ml/ 5ml

Medio de cultivo para recuento de bacterias sulfatoreductoras del lactato y del acetato (BSRLAC Y BSRAC)

Para 1.000 ml:

- K ₂ HPO ₄	0,2 g
- NH ₄ Cl	0,5 g
- NaCl	1,2 g
- FeCl ₂ . 4H ₂ O	0,36 g
- MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,4 g
- CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,15 g
- Extracto de Levadura	1,0 g
- Sln oligoelementos P. W sin sulfuros	1,0 ml
- Sln de resazurina (0,1)	1,0 ml

Para las BSRAC tomar 500 ml del medio anterior y agregar 1,5 g de acetato de sodio (3H₂O). Ajustar el pH a 6,7. Hervir y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar 2,5 g NaHCO₃ (10%)

Para las BSRLAC tomar los 500 ml de medio restante y agregar 4,25 ml de Lactato de sodio (60% en peso). Ajustar el pH a 6,8; hervir y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar 2,5 g NaHCO₃ (10%)

Servir 5 ml en tubos Hungate, bajo atmósfera de Nitrógeno, hacer cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, antes de utilizarlo agregar:

- Cisteína HCl (2,5%)	0,1 ml/ 5 ml
- Sln diluida de vitaminas P.W de Balch	0,05 ml/ 5ml

Medio de cultivo para recuento de bacterias sintróficas del propionato y del butirato (BSP Y BSB)

Para 1.000 ml.

- Sin mineral de Balch sin sulfuros	50,0 ml
- Sin oligoelementos sin sulfuros	10,0 ml
- K_2HPO_4	0,30 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2%)	1,0 ml
- Selenito de sodio (1,75 g/L)	1,0 ml
- $NiCl_2$ (0,05%)	0,5 ml
- Extracto de Levadura	0,1 g
- Peptona Trypticasa	0,1 g
- Sin de resazurina (0,1)	1,0 ml

Para las BSP tomar 500 ml del medio anterior y agregar 0,5 g de propionato de sodio ($C_3H_5O_2Na$). Para las BSB tomar los 500 ml de medio restante y agregar 0,5g de Butirato de sodio ($C_4H_7O_2Na$) o 4,5 ml de ácido butírico 1M.

Se completa con agua destilada a 1.000 ml, agregar 10% en volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 Litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- $NaHCO_3$ (10%)	5,0 g
- Cisteína - HCl	0,5 g

Servir 5 ml en tubos hungate, hacer cambio de fase N_2 / CO_2 (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi.

Antes de utilizarlo agregar:

- $Na_2S \cdot 9H_2O$ (2,0%)	0,05 ml/ 5ml
- Sin diluida de vitaminas de Balch	0,05 ml/ 5ml

Medio de cultivo para recuento de bacterias metanogénicas acetoclasticas (BMA)

Para 1.000 ml.

- SIn mineral de Balch sin sulfuros	50,0 ml
- K ₂ HPO ₄	0,30 g
- SIn oligoelementos sin sulfuros	10,0 ml
- FeSO ₄ . 7H ₂ O (0,2%)	1,0 ml
- Selenito de sodio (1,75 g/L)	1,0 ml
- Extracto de Levadura	0,5 g
- Peptona Trypticasa	0,1 g
- SIn de resazurina (0,1)	1,0 ml
- Acetato de sodio	8,0 g

Para el aislamiento de bacterias metanogénicas del metanol, se utiliza este medio adicionando 0,63 ml de metanol a cambio de acetato.

Se completa con agua destilada a 1.000 ml, se ajusta el pH a 7,1 o 7,2 agregar 10% en volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 Litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- NaHCO ₃ (10%)	5,0 g
- Cisteína - HCl	0,5 g

Servir 5 ml en tubos Hungate, hacer cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi. Antes de utilizarlo agregar:

- Na ₂ S . 9H ₂ O (2,0%)	0,05 ml/ 5ml
- SIn diluida de vitaminas de Balch	0,05 ml/ 5ml

Medio de cultivo para recuento de bacterias metanogénicas hidrogenofílicas (BMH₂)

Para 1.000 ml.

- Sln mineral de Balch sin sulfuros	50,0 ml
- Sln oligoelementos sin sulfuros	10,0 ml
- K ₂ HPO ₄	0,30 g
- NiCl ₂ · 6H ₂ O (0,5 g/L)	0,5 ml
- Selenito de sodio (1,73 g/L)	1,0 ml
- FeCl ₂ · 4H ₂ O (0,2%)	1,0 ml
- Sln de resarzurina (0,1)	1,0 ml

El medio no contiene SO₄ con el fin de evitar el crecimiento de bacterias autotróficas, cuando se requiere el medio para aislar bacterias hidrogenofílicas, con el fin de evitar la contaminación del cultivo, no se agregan vitaminas, extracto de levadura, Peptona Tripticasa, ni jugo de rumen.

Cuando se requiere medio para identificar crecimiento de bacterias hidrogenofílicas se agregan:

- Extracto de Levadura	0,5 g
- Peptona Tripticasa	0,1 g

Se completa con agua destilada a 1000 ml, se ajusta el ph con NaOH 1M entre 7,2 y 7,4, agregar 10% en volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 Litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- NaHCO ₃	5,0 g
- Cisteina	0,5 g

Servir 5 ml en tubos Hungate, hacer cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi.

Antes de utilizarlo agregar:

- | | |
|--|--------------|
| - Na ₂ S · 9H ₂ O (2,0%) | 0,05 ml/ 5ml |
| - Sln diluida de vitaminas de Balch | 0,05 ml/ 5ml |

Renovar el cambio de fase N₂ /CO₂ 2 o 3 días después de inocular.

Preparación de Soluciones

Solución mineral de Balch

Para 1.000 ml.

	Con Sulfatos	Sin sulfatos*
KH_2PO_4	6,0 g	6,0 g
$(\text{NH}_2)_2 \text{SO}_4$	6,0 g	
NH_4Cl		5,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		2,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,6 g	
$\text{CaCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,16 g	0,16 g
NaCl	12,0 g	12,0 g

* Para evitar la inhibición por la presencia de bacterias Sulfato – Reductoras.

Diluir en 1 L de agua destilada, preparada en anaerobiosis, almacenada y refrigerada.

Solución de oligoelementos

Para 1.000 ml.

	Con Sulfatos	Sin sulfatos*
AcidoNitrilotriacético**	1,5 g	1,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3,0 g	
MgCl ₂ . 6H ₂ O		2,5 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,5 g	
MnCl ₂ . 4H ₂ O		0,6 g
NaCl	1,0 g	1,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	
FeCl ₂ .4H ₂ O		0,1 g
CoCl ₂ . 6H ₂ O		0,1 g
CoSO ₄ . 6H ₂ O	0,1 g	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,1 g	0,1 g
ZnCl ₂		0,1 g
ZnSO ₄	0,1 g	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g	
CuCl ₂ . 2H ₂ O		0,01 g
ALK(SO ₄) ₂	0,01 g	
ALCl ₂		0,01 g
H ₃ BO ₃	0,01 g	0,01 g
NaMoO ₂ .2 H ₂ O	0,01 g	0,01 g

* Para evitar la inhibición por la presencia de bacterias Sulfato – Reductoras.

** Se disuelven 1,5 g de nitrilotriacético con KOH 10N o 1N hasta ph 6,5

La solución se prepara en aerobiosis. Después de adicionar todo, ajustar el pH a 7,0 con KOH 1N, almacenar en el refrigerador a 4°C.

Solución diluida de vitaminas de Balch

Para 1.000 ml.

Biotina (vit H)	2,0 mg
Acido p – aminobenzoico (PABA)	5,0 mg
Cianocobalamina	0,1 mg
Tiamina HCl (vit B ₁)	5,0 mg
D. L. Pantotenato de Ca	5,0 mg
Acido nicotínico	5,0 mg
Piridoxina – HCl (vit B ₆)	10,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Riboflavina (vit B ₂)	5,0 mg
Acidolipoico (thioico)	5,0 mg

Esterilizar por filtración de membrana de 0,22 mm en anaerobiosis. Almacenar protegido de la luz en refrigerador a 4° C. Se preparan en frascos de 60 ml con cambio de fase de N₂ /CO₂ y estériles.

Solución de sulfito de sodio

Para 20 ml:

- Na₂S . 9H₂O 0,4 g

Se disuelven en 20 ml de agua anóxica

Realizar el cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) y después esterilizar. Se almacena a temperatura ambiente

Agua anóxica

Se toma el volumen a preparar más un 10% de agua destilada, se hierve hasta evaporar el 10% en exceso, luego se enfría bajo atmósfera de nitrógeno.

Previamente se pesan los compuestos a diluir y se agrega la cantidad de agua anóxica necesaria, se realiza el cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) durante 1 o 2 minutos y se lleva al autoclave durante 15 minutos a 121°C a 15 psi.

Solución de Cisteína – HCl (2,5% en peso)

Volumen 100 ml.

Cisteína HCl (sigma) 2,5 g

Se disuelven en 100 ml de agua anóxica

Realizar el cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) y después esterilizar.

Uso: 0,1 ml/ 5 ml

Solución de NaHCO₃ (10% en peso)

Volumen 50 ml.

NaHCO₃ 5 g

Se disuelven en 50 ml de agua anóxica

Realizar el cambio de fase N₂ /CO₂ (80% - 20%) y después esterilizar.

Uso: 0, 25 ml/ 5 ml

Solución de NiCl₂ (0,5 g/L)

Volumen 50 ml.

NiCl₂ . 6H₂O 0,025 g

Se disuelven en 50 ml de agua anóxica.

Realizar el cambio de fase N₂/CO₂ (80% - 20%) y después esterilizar.

Uso: 1 ml/ litro de medio.

Solución de FeSO₄ (0,2%)

Volumen 50 ml.

Fe(SO₄). 7H₂O 0,1 g

Se disuelven en 50 ml de agua anóxica.

Realizar el cambio de fase N₂/CO₂ (80% - 20%) y después esterilizar.

Uso: 1 ml/ litro de medio.

Solución de azul de Bromotimol (0,1%)

Volumen 100 ml.

Azul de Bromotimol 0,1 g

Se disuelven en 100 ml de NaOH 1N.

Uso: 1 ml/ litro de medio.

Solución de agua reducida

Volumen 1.000 ml.

K₂ HPO₄ 0,3 g

Sln mineral de Balch sin sulfuros 50 ml

Sln de resazurina (0,1) 1,0 ml

Se completa el volumen de 1.000 ml y se agrega un 10% adicional del volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 Litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- NaHCO_3 5,0 g
- CisteínaHCl 0,5 g

Servir según necesidad 4,5 ml, 9,0 ml, 13,5 ml en tubos Hungate, hacer cambio de fase N_2 / CO_2 (80% - 20%) durante un minuto, llevar a autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, antes de utilizarlo agregar:

- $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (2,0%) 0,05 ml/ 5ml

Solución de Ácido Acético para AGV:

Volumen 1.000 ml

- Ácido Acético 100 g

Ajustar el pH 7,0 con NaOH. Aforar a 500 ml con agua destilada estéril.

ANEXO 4

Tabla estadística para el cálculo del NMP según Mac Grady para 5 tubos por dilución

Combinación de tubos positivos para tres diluciones consecutivas	Número de bacterias	Combinación de tubos positivos para tres diluciones consecutivas	Número de bacterias	Combinación de tubos positivos para tres diluciones consecutivas	Número de bacterias
000	0.0	231	1.4	451	5
001	0.2	240	1.4	500	2.5
002	0.4	300	0.8	501	3
010	0.2	301	1.1	502	4
011	0.4	302	1.4	503	6
012	0.6	310	1.1	504	7.5
020	0.4	311	1.4	510	3.5
021	0.6	312	1.7	511	4.5
030	0.6	313	2	513	8.5
100	0.2	320	1.4	520	5
101	0.4	321	1.7	521	7
102	0.6	322	2	522	9.5
103	0.8	330	1.7	523	12
110	0.4	331	2	524	15
111	0.6	340	2	525	17.5
112	0.8	341	2.5	530	8
120	0.6	400	1.3	531	11
121	0.8	401	1.7	532	14
122	1	402	2	533	17.5
130	0.8	403	2.5	534	20
131	1	410	1.7	535	25
140	1.1	411	2	540	13
200	0.5	412	2.5	541	17
201	0.7	420	2	542	25
203	1.2	421	2.5	543	30
210	0.7	422	2.3	544	35
211	0.9	430	2.5	545	45
212	1.2	431	3	550	25
220	0.9	432	4	551	35
221	1.2	440	3.5	552	60
222	1.4	441	4	553	90
230	1.2	450	4	554	160

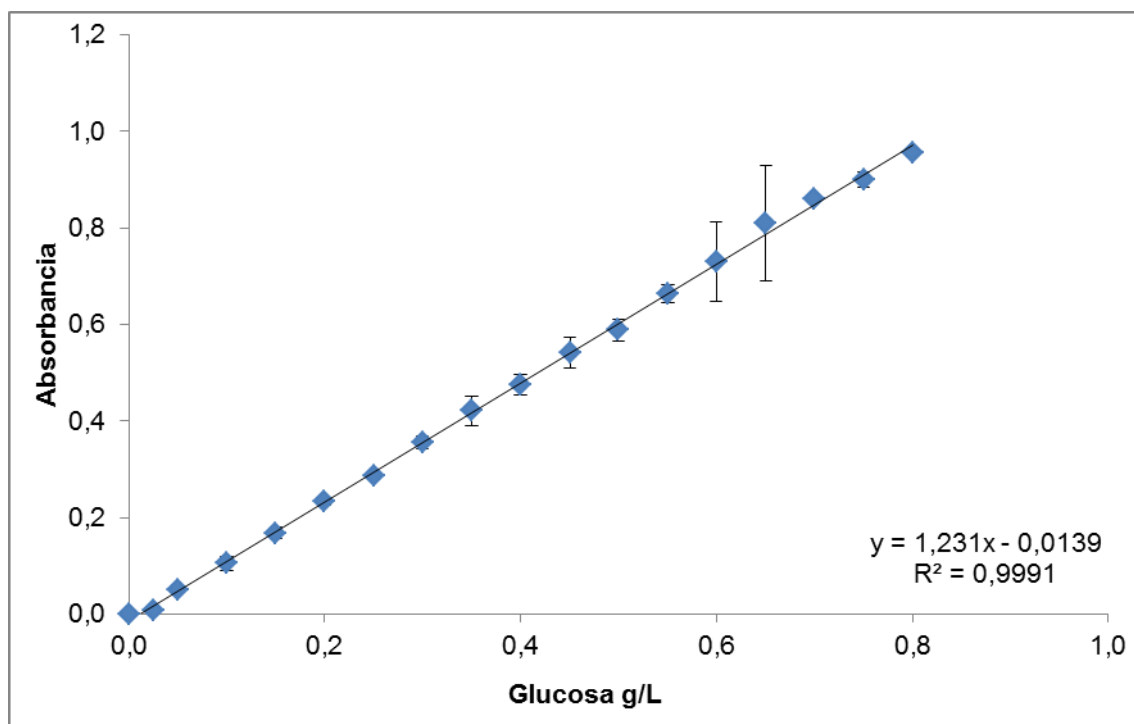
ANEXO 5

Diseño experimental 2³ para la variables Temperatura, Agitación y Aireación

BLOQUE	TEMPERATURA	AGITACIÓN	TIEMPO DE AIREACIÓN
3	Ambiente	0 rpm	0 h
3	39 °C	120 rpm	0 h
3	Ambiente	120 rpm	9 h
3	Ambiente	120 rpm	0 h
3	39 °C	0 rpm	0 h
3	39 °C	0 rpm	9 h
3	Ambiente	0 rpm	9 h
3	39 °C	120 rpm	9 h

ANEXO 6

Curva de calibración para la determinación de la concentración de Azúcares Reductores (AR) por el método del ácido 3,5- Di-nitro-salicílico (DNS)



ANEXO 7

Cálculo de la Actividad Hidrolítica

Las condiciones de reacción se y metodología se presentan en el numeral 4.2.1. Luego de realizar la determinación de glucosa, mediante el método DNS descrito en el numeral 4.3.3, se obtiene:

Azúcares Reductores (mg/ml)	Tiempo (días)
0,3439	0
0,3456	2
0,3970	4
0,3984	6

En este caso la mezcla de reacción contiene 10 g/L celulosa, 1,5 g SSV de inóculo y se aforó con medio mineral *Balch* hasta completar un volumen de operación de 400 ml.

La actividad hidrolítica fue considerada como la pendiente (m) de la curva generada por concentración de azúcares reductores (mg/ml) versus el tiempo de reacción, ya que m corresponde a la velocidad de reacción.

$$\text{Actividad hidrolítica (mg/ml*día): } \frac{Y_1 - Y_2}{X_1 - X_2}$$

Por lo tanto:

Actividad hidrolítica = 0,294 (mg/ml*día).

ANEXO 8

Cálculo de la Actividad Metanogénica

Las condiciones de reacción se y metodología se presentan en el numeral 4.2.2. Luego de realizar la determinación volumen de metano producido, mediante el método de desplazamiento alcalino descrito en el numeral 4.3.4, se obtiene:

Volumen acumulado de metano (ml)	Tiempo (días)
0	0
11,0	2
28,6	4
41,3	6

En este caso la mezcla de reacción contienen 10 %de acetato de sodio, 1,5 g SSV de inóculo y se aforó con medio mineral *Balch* hasta completar un volumen de operación de 400 ml. El cálculo de la actividad metanogénica específica se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Dónde:

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

P = Máxima pendiente de la cinética de producción de metano para cada experimento (ml/d)

FC = Factor de conversión de g DQO (430 ml CH₄ húmedo/g DQO a 39 °C)

V = Volumen del inóculo utilizado en el ensayo (L)

SSV= Concentración de Sólidos Suspendingidos Volátiles en el inóculo (g/L)

Por lo tanto:

Actividad metanogénica= 0,013 (g DQO/ g SSV * día).

ANEXO 9

Cálculo de la Afinidad al sustrato

Las condiciones de reacción se y metodología se presentan en el numeral 4.2.3. Luego de realizar la determinación volumen de metano producido, mediante el método de desplazamiento alcalino descrito en el numeral 4.3.4, se obtiene:

Volumen acumulado de metano (ml)	Tiempo (días)
0	0
132	2
160	4
162	6

En este caso la mezcla de reacción contiene 300 ml de inóculo y el equivalente a 1 g SV de pulpa de fique como sustrato (120 g de fique). El cálculo de la Capacidad de Afinidad al sustrato se realizó como el rendimiento acumulado de producto en sustrato durante todo el tiempo de fermentación, expresado en $\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{Kg}$ de SV de pulpa de fique.

Para el ejemplo:

La sumatoria de los volúmenes = 454 ml = $0,00045 \text{ m}^3$ de metano.

Si a esta fermentación se le adicionaron 120 gramos de fique equivalentes a 0,020 g SV adicionados, el rendimiento acumulado de esta fermentación es igual a $0,023 \text{ m}^3 \text{CH}_4/\text{Kg}$ de SV de pulpa de fique.

ANEXO 10

**Ecuaciones utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos
Q_p acumulada y Y_{s/p} acumulados calculados para las fermentaciones**

PARÁMETROS CINÉTICOS	ECUACIÓN	UNIDADES
Q _p acumulada	$\frac{\Delta P}{\Delta t}$	ml CH ₄ /día
Y _{s/p} acumulados	$\frac{\Delta P}{\Delta S}$	m ³ CH ₄ /Kg de SV

Dónde:

Q_p acumulada : Productividad Volumétrica acumulada

Y_{s/p} acumulado : Rendimiento de producto en sustrato acumulado

P : Producto formado

t : tiempo de reacción

S : Concentración de sustrato en g SV