

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA BIOPRODUCCION DE METANO A PARTIR DE
LOS RESIDUOS DEL PROCESO DE BENEFICIO DEL FIQUE**

**YENNY PAOLA BARRERA ALARCON
MARÍA XIMENA SALAS VILLARREAL**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA**

2008

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA BIOPRODUCCION DE METANO A PARTIR DE
LOS RESIDUOS DEL PROCESO DE BENEFICIO DEL FIQUE**

**YENNY PAOLA BARRERA ALARCON
MARÍA XIMENA SALAS VILLARREAL**

TRABAJO DE GRADO

DIRECTOR: Dr. HUMBERTO ESCALANTE HERNANDEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
2008**

A Dios en especial, eterno colaborador, quiero dedicarle este triunfo,
a mis padres y hermanos que con su apoyo, esfuerzo y amor
Colaboraron en mi superación y en el logro de tan anhelado sueño
en esta nueva etapa.

Yenny Paola.

Con esfuerzo, dedicación y perseverancia termina hoy esa tarea propuesta en la que doy gracias, a Dios, a mis padres Eliseo y Lilia y hermanas, a los profesores y compañeros porque con su ayuda en adelante serviré cabal y profesionalmente.

María Ximena

AGRADECIMIENTOS

Hacemos un pequeño reconocimiento a todas aquellas personas que nos brindaron su colaboración sin esperar nada a cambio.

Universidad Industrial de Santander.

Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente. GIMBA, por permitirnos utilizar sus instalaciones para el desarrollo experimental de nuestro trabajo de grado.

Director del proyecto, PhD. Humberto Escalante Hernández, por su incondicional apoyo y orientación.

Ingeniera Química, Liliana del Pilar Castro, por su paciencia, aporte y colaboración en la elaboración de este trabajo.

Mabel Juliana Quintero.

Andrés Rueda.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	12
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	25
4. CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39
ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Medición de la Actividad Metanogénica por desplazamiento.	22
Figura 2. Montaje de la técnica de la Actividad Metanogénica Específica, por desplazamiento. (Laboratorio Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia y Medio Ambiente. UIS)	28
Figura 3. Curva de actividad metanogénica. Experimento 1 y 1A.	29
Figura 4. Curva de actividad metanogénica. Experimento 2 y 2A.	30
Figura 5. Curva de actividad metanogénica. Experimento 3 y 3A.	31
Figura 6. Curva de actividad metanogénica. Experimento 4 y 4A	32

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales reacciones químicas que ocurren en la digestión anaerobia de la materia orgánica.	17
Tabla 2. Variables del diseño de experimentos.	23
Tabla 3. Diseño de experimentos.	23
Tabla 4. Análisis Bromatológico en base seca del bagazo del fique.	25
Tabla 5. Caracterización físico-química del sustrato.	25
Tabla 6. Composición mineralógica de la pulpa de fique [3].	26
Tabla 7. Grupos microbiales relacionales con el metabolismo bacterial del jugo de fique expresado en NMP / ml.	27
Tabla 8. Grupos microbiales relacionados con el metabolismo bacterial del lodo PTAR expresado en NMP/ ml	27
Tabla 9. Caracterización físico-química del inóculo.	28
Tabla 10. Análisis de Gases y AME.	33
Tabla 11. Porcentaje de la producción de metano en los diferentes experimentos.	35

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CÁLCULO DEL NMP SEGÚN MAC GRADY PARA 5 TUBOS POR DILUCIÓN.	43
ANEXO B. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS DEL JUGO DE FIQUE PRACTICA REALIZADA POR ESTUDIANTES DE BACTERIOLOGÍA.	45
ANEXO C. PREPARACION DEL MEDIO MINERAL PARA ACTIVIDAD METANOGENICA	48

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO PRELIMINAR DE LA BIOPRODUCCION DE METANO A PARTIR DE LOS RESIDUOS DEL PROCESO DE BENEFICIO DEL FIQUE*.

AUTORES: BARRERA ALARCÓN, Yenny Paola
SALAS VILLARREAL, María Ximena**

PALABRAS CLAVES

Bagazo de fique, Digestión anaerobia, Fermentación, Actividad Metanogénica Especifica, Biogás.

DESCRIPCIÓN

En este trabajo se evaluaron los residuos (bagazo) generados durante el beneficio del fique, como sustrato para la producción de biogás, como fuente de energía renovable; mediante un proceso de digestión anaerobia utilizando como inóculo un lodo de PTAR. El bagazo de fique fue suministrado por las plantas de beneficio ubicadas en el municipio de Mogotes Santander, se realizó la caracterización fisicoquímica del bagazo, dentro de los parámetros evaluados están: Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y Análisis Bromatológico. Para la cuantificación de la producción de metano se empleó el Test de AME (Actividad Metanogénica Especifica), mediante la técnica de desplazamiento de líquido utilizando como reactores recipientes de vidrio de 500 ml dentro de un sistema cerrado en ausencia de oxígeno y provista de una corriente continua de nitrógeno; a una temperatura ambiente de 27°C, presión atmosférica y agitación manual discontinua. Del estudio se concluyó que el bagazo del fique es un excelente sustrato para los microorganismos productores de biogás, debido a su alto porcentaje de carbono y nitrógeno necesarios para el crecimiento bacteriano, lo cual se demuestra en la composición de biogás obtenido con un 25,2 % de CH₄, 14,5 % CO₂ y 1,7 % O₂, indicando que hubo crecimiento de suficientes poblaciones metanogénicas en el reactor anaerobio a las condiciones de operación empleadas. La cantidad de inóculo y sustrato de cada experimento son factores importantes que intervienen en el proceso de producción de biogás. En las curvas de actividad metanogénica, la prueba que presentó la máxima producción de biogás contenía mayor proporción sustrato-inóculo (Experimento 4), debido a la alta presencia de microbiota y suficiente materia orgánica en el biodigestor.

* Proyecto de investigación

** FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS, ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA. Director. Ph.D. HUMBERTO ESCALANTE HERNÁNDEZ

ABSTRACT

TITLE: PRELIMINARY STUDY FOR THE OF METHANE BIOPRODUCCION FROM THE WASTE GENERATED IN THE SISAL PRODUCTION.

AUTHORS: BARRERA ALARCÓN, Yenny Paola
SALAS VILLARREAL, María Ximena**

KEYWORDS

Sisal Bagasse, Anaerobic Digestion, Fermentation, Specific Methanogenic Activity, Biogas

DESCRIPTION

In this project were evaluated the residual (bagasse) generated during the sisal production, like substrate for the biogas production, like a renewable energy fountain; through a process of anaerobia digestion using like inoculum a PTAR mud. The sisal bagasse were supplied for the production plants placed in the town of Mogotes, Santader, it was made the physicochemical characterisation of the bagasse, within the parameters that were evaluated are: Chemical Demand of Oxygen (CDO), Volatile Suspended Solids (VSS), Volatile Fat Acids (VFA) and Bromatological Analysis. For the quantification of the methane production was implemented the AME Test (Specific Methanogenic Activity), through the technique of liquid displacement using like reactors glass recipients of 500 ml inside of a close system without oxygen and with a continuous nitrogen current; at a environment temperature of 27°C, at a atmospheric pressure and discontinued agitation. The study conclude that the sisal bagasse is an excellent substrate for the biogas producers micro organisms, because its high percentage of Carbon and Nitrogen necessary for the bacteria growth, which is demonstrated in the biogas composition obtained with a 25,2 % of CH₄, 14,5 % CO₂ and 1,7 % O₂, indicating that there was sufficient growth of methanogenic populations in the anaerobic reactor at the employed operation conditions. The amount of inoculum and substrate of each experiment are relevant factor that are involved in the process of biogas production. In the methanogenic activity draws, the test that presented the maximum biogas production had more proportion of substrate-inoculum (4th experiment), due to the high presence of micro biota and enough organic matter in the digester.

** ABILITY OF PHYSIOCHEMICAL ENGINEERINGS, SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING.
Director. PhD. HUMBERTO ESCALANTE HERNÁNDEZ

1. INTRODUCCION

La planta de fique (Género *Furcraea sp.*) pertenece a la familia *Agavaceae*, es tropical y crece en la mayoría de climas del país. Se utiliza para extraer su fibra, llamada “cabuya” utilizada industrialmente para elaborar hamacas, redes, empaques, artesanías, sogas, cordeles, agromantos y geotextiles. [1]

En Santander, que es el segundo departamento productor de fique a nivel nacional [2], 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. [3]

El beneficio del fique se realiza en tres (3) fases: a) *La preparación o alistamiento*, en la cual se cortan las hojas y se desorillan para eliminar las espinas; b) *Extracción de fibra*: las hojas se pasan por la desfibradora para extraer la fibra, la cual constituye el 3 al 5% del peso de la hoja, siendo la pulpa el 95 al 97%; c) *Procesamiento de la fibra*: contempla las etapas de fermentación, lavado, secado y empaquetamiento de la fibra para su posterior comercialización.[4]

Cada kilo de fique extraído produce aproximadamente 8 litros de jugo. La producción anual de fibra de fique en el Departamento de Santander genera aproximadamente 3,33 Kg de biomasa residual al mes, que equivalen a 0,111 Kg diarios [5].

La pulpa del desfibrado está conformada por un 30% de fibrillas y un 70% de pulpa vegetal. Los residuos están constituidos por jugos y bagazo. El bagazo contiene celulosa, compuestos orgánicos, sacarosa, glucosa y fructuosa, [1] los cuales se convierten en excelente sustrato para microorganismos productores de

biogás. En el proceso productivo, el bagazo y el jugo son descartados directamente al medio, o en algunos casos los agricultores los utilizan como abono. Sin embargo, su acumulación sobre el suelo los convierte en contaminantes del medio ambiente y de las corrientes de agua por lixiviación.

En Colombia el lavado de la cabuya del fique después del desfibrado, se efectúa en las quebradas utilizando 4 Kg. de agua en un período de 30 minutos; al colocar el fique en la corriente de agua suelta un tinte verde con espuma y un fuerte olor a celulosa. [6].

En la mayoría de países en desarrollo los residuos orgánicos se producen en grandes cantidades, y mediante digestión anaeróbica se produce biogás que puede abastecer en parte la demanda de energía [7]. En el caso del proceso de beneficio del fique el jugo y bagazo residual pueden ser utilizados para producir nuevos materiales de alto valor agregado relacionados con producción de principios activos farmacéuticos, agentes tensoactivos, bioinsecticidas, papel y producción de Biogás. [8,9].

Con respecto a la producción de biogás en Tanzania se han realizado grandes avances, encaminados a optimizar la producción de biometano, dentro de los que se destaca, La co-digestión anaerobia de pulpa de fique y desechos de pescado, por ser una alternativa viable para la obtención de energía con un rendimiento de 60-65% [10].

Asimismo la literatura ha reportado que los pre-tratamientos aerobio-mesofílicos aumentan el rendimiento del proceso anaerobio en un 26%, y el decrecimiento en el tamaño de partícula refuerza la digestión anaerobia aumentando la producción de biogás. [11,7].

En los procesos de digestión anaerobia las condiciones de operación son determinantes para la biometanización, a nivel mundial se han adelantado

investigaciones, que han demostrado que el pH y la alcalinidad constituyen dos parámetros decisivos en la viabilidad de la degradación microbológica debido a que permite establecer y mantener el balance en las reacciones enzimáticas y bioquímicas [12].

En Colombia se destaca la producción de papel a partir de la fibra de fique, obtención de hormonas sintéticas y anticonceptivos [13]. Unido a lo anterior, el nivel de desarrollo tecnológico e investigativo adelantado por parte de los actores de la cadena es mínimo, dado que no se ven interesados en el desarrollo de nuevos productos, se siguen elaborando los tradicionales sin agregarles ningún tipo de alto valor [13].

El biometano del desecho de la fibra de fique es de gran interés como una energía renovable que podría ser usado en estufas (preparación de alimentos), motores de explosión (necesarios para el desfibrado), generación de energía eléctrica [7].

En las plantas de beneficio del fique el biogás producido, a partir de los residuos orgánicos, por una parte disminuye el impacto ambiental y por otra generará un beneficio al reducir las emanaciones de gases originados por la combustión de la gasolina o el ACPM utilizados para el funcionamiento de la máquina desfibradora. Por lo anterior es importante investigar la posibilidad de usar desechos de fibra de fique como materia de alimento para digestores anaeróbicos.

La digestión anaeróbica de la materia orgánica es un proceso en ausencia de oxígeno, que se desarrolla a través de una serie de reacciones bioquímicas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, en las que intervienen diferentes grupos bacterianos que trabajan en simbiosis. a) En la hidrólisis las bacterias celulolíticas actúan sobre los polímeros orgánicos u otros materiales complejos, desdoblándolos enzimáticamente en los correspondientes monómeros, b) la acidogénesis consiste en la fermentación ácida de monómeros que generan

productos intermedios, principalmente acetatos, propionatos y butiratos, y en menor proporción dióxido de carbono e hidrogeno; c) seguidamente Las bacterias acetogénicas productoras de hidrogeno, producen ácido acético junto con dióxido de carbono e hidrogeno; d) finalmente las bacterias anaeróbicas actúan sobre los productos resultantes de las etapas anteriores y las transforma en metano. Las bacterias metanogénicas denominadas *arqueobacterias* son anaerobias estrictas, no crecen a concentraciones de oxígeno mayores de 1ppm y pierden viabilidad cuando se les expone a concentraciones de 10ppm; el uso de los sustratos es muy restringido, pues la mayoría solo puede usar como fuente de energía la reducción del CO₂ con H₂ [5].

En la tabla 1 se consignan las principales reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el proceso de digestión anaerobia con los correspondientes cambios de energía libre [14].

Tabla 1. Principales reacciones químicas que ocurren en la digestión anaerobia de la materia orgánica.

TIPO DE REACCIÓN	ECUACIÓN	ΔG°
Fermentación de Glucosa a acetato	Glucosa + 4H ₂ O → CH ₃ COO ⁻ + 4H ⁺ + 4H ₂	-207
Fermentación de la glucosa a Butirato	Glucosa + 2H ₂ O → C ₄ H ₇ O ₂ + 2HCO ₃ ⁻ + 3H ⁺ + 2H ₂	-135
Fermentación del Butirato a acetato e H ₂	Butirato + 2H ₂ O → 2CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + H ₂	+48,2
Fermentación del propionato a acetato	Propionato + 3H ₂ → CH ₃ COO ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + H ₂	+76.2
Acetogénesis a partir del H ₂ y CO ₂	4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → CH ₃ COO ⁻ + 2H ₂ O	-105
Metanogénesis a partir del CO ₂ y H ₂	4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → CH ₄ + 3H ₂ O	-136
Metanogénesis a partir del acetato	Acetato + H ₂ O → CH ₄ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	-31

ΔG° : Condiciones estándar: solutos 1 molar, gases 1 atmósfera.

Como subproducto de la digestión anaerobia se obtiene un gas denominado biogás [15] cuya composición es Metano y dióxido de Carbono, con la presencia

adicional de Nitrógeno, Hidrógeno, Amoníaco y Sulfuro de Hidrógeno, según sea la naturaleza del residuo a tratar [1].

El biogás es el producto de una fermentación anaeróbica [2]. La fermentación es un proceso microbiológico, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman nuevos productos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Existen dos tipos de reacciones de fermentación: las que se producen en presencia de oxígeno, *fermentaciones aerobias* y en ausencia de oxígeno, *fermentaciones anaeróbicas las cuales* involucran un número de microorganismos de distinto tipo que se dividen en tres grandes grupos (*fermentativos, acetogénicos y metanogénicos*) [3].

La capacidad de la biomasa o sustrato para transformar la materia orgánica en metano puede ser cuantificada a través de la actividad Metanogénica específica (AME), esta se define como la masa de sustrato en forma de DQO que es convertida a metano por unidad de masa de biomasa y por unidad de tiempo [14]

La determinación de la actividad metanogénica es una prueba de biodegradabilidad de gran utilidad para el control del proceso de tratamiento en un reactor anaerobio. El ensayo no solo resulta aplicable para la selección del inóculo sino también para la puesta en marcha y el seguimiento del proceso.

Existen diferentes metodologías para realizar el ensayo de actividad metanogénica, las cuales se diferencian por la forma como se mide la cantidad de metano producido y como se realiza la adición del sustrato [16].

El objetivo de este trabajo fue plantear la viabilidad de utilizar los residuos (bagazo) generados durante el beneficio del fique, como sustrato para la producción de biogás; mediante un proceso de digestión anaerobia utilizando

como inóculo un lodo de PTAR, variando la relación sustrato/inóculo y manteniendo constantes las condiciones de operación (temperatura ambiente de 27°C, pH igual a 7, presión atmosférica y ciclos de agitación).

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Considerando una serie de parámetros que permitieran garantizar cierto grado de selectividad, incrementando la tasa de crecimiento y desempeño de los microorganismos [18], se escogió como sustrato la pulpa de fique, por su biodegradabilidad y alto contenido de materia orgánica. El bagazo de fique (pulpa semisólida) fue suministrado por las plantas de beneficio ubicadas en el municipio de Mogotes, finca Guayabetal. Se delimitó la zona de desfibrado en un cuadrado de 6m de lado, y se realizó la toma de muestras en 10 puntos diferentes de la planta, los cuales fueron seleccionados al azar. Las muestras se tomaron a una profundidad de 8cm aproximadamente. Cada muestra se empacó en una bolsa plástica con cierre hermético, evitando la entrada de aire. Este muestreo se realizó teniendo en cuenta el protocolo de toma de muestras de campo realizado previamente por estudiantes de práctica de bacteriología [19,20].

A las muestras de bagazo de fique se les realizó una caracterización físico-química con el propósito de conocer su composición y determinar el contenido de materia orgánica fácilmente biodegradable, por los microorganismos productores de biogás. Dentro de los parámetros evaluados se encuentra la determinación de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Ácidos Grasos Volátiles (AGV), Análisis Bromatológicos y Demanda Química de Oxígeno (DQO), así mismo la composición mineralógica de la pulpa de fique.

La evaluación de las reacciones bioquímicas presentes en el proceso de digestión anaerobia y la determinación de la capacidad de aprovechamiento de diferentes compuestos orgánicos (propionato, lactato, acetato, entre otros) como fuente de energía por los microorganismos, se llevó a cabo mediante la técnica del número más probable (NMP), la cual se basó en realizar diluciones seriadas del inóculo y la adición de las mismas en medio mineral (compuesto por: solución mineral de

balch sin sulfatos, solución oligoelementos sin sulfatos, K_2HPO_4 , solución de resazurina, extracto de levadura, peptona, cisteína, $NaHCO_3$, Na_2S y solución diluida de vitaminas de Balch (ver Anexo 3)), este medio proporciona los macronutrientes (fosforo, azufre, potasio, magnesio, calcio, hierro y sodio) y micronutrientes (cobre, manganeso, molibdeno, hierro y zinc) esenciales para los procesos bioquímicos con diferentes fuentes de carbono. La positividad de la prueba se identificó de acuerdo a las características bioquímicas de cada grupo bacterial y realizando los cálculos del NMP con base en la tabla de recuentos de bacterias (ver anexo 1).

Inicialmente se seleccionó el jugo de fique como posible cultivo de arranque de la digestión anaerobia. Para estimar la microbiota presente en el jugo se desarrolló la técnica (NMP), demostrando que el jugo no es un inóculo apropiado para este tipo de procesos. Este procedimiento se llevo a cabo tomando 5 muestras al azar del muestreo realizado. (Ver anexo 2).

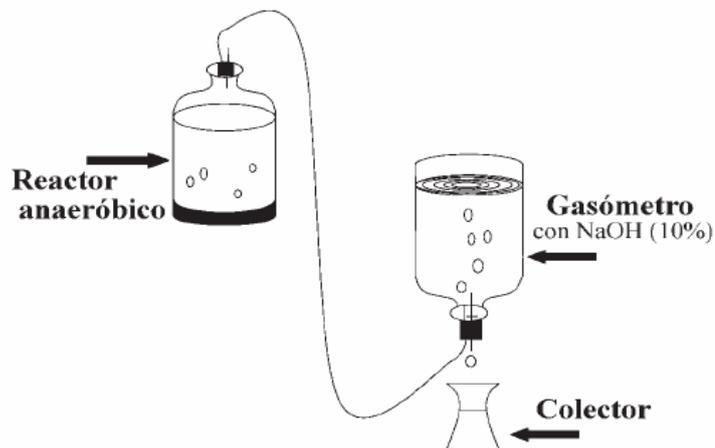
El inóculo seleccionado fue un lodo de PTAR, el cual esta siendo utilizado por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) para la digestión de residuos de plaza de mercado en un reactor semicontinuo metanogénico [17]. Posteriormente se muestran los grupos microbiales relacionados con el metabolismo y las características fisicoquímicas del inóculo.

Para el estudio de la producción de biogás es necesario realizar pruebas de Actividad Metanogénica Específica AME (por medio del ensayo de biodegradabilidad); las cuales indican el rendimiento de los residuos del fique frente a determinado inóculo.

El método utilizado para evaluar la biodegradabilidad anaerobia de los residuos en el presente estudio, consiste en medir a lo largo del tiempo la producción de metano generado dentro de unos reactores que contienen medio mineral, la muestra problema que contiene materia orgánica (sustrato) y lodo metanogénico

(inoculo). Esta técnica permite evaluar diferentes variables en un periodo relativamente corto (30-45 días) y medir indirectamente la producción de metano por la cual se lleva a cabo la reacción para la producción de biogás [17]. Además, es el primer modelo experimental que se aproxima al proceso que ocurrirá en el biodigestor; Sin embargo, no predice la cinética de la reacción, indispensable para el conocimiento de la estabilidad del sistema y el diseño del biorreactor [16]. La figura 1 muestra el montaje de la técnica utilizada [14].

Figura 1. Medición de la Actividad Metanogénica por desplazamiento.



Uno de los objetivos principales de este estudio fue seleccionar la mejor relación sustrato / inóculo, para lo cual se realizó una revisión bibliográfica y pruebas preliminares. Se planteó un diseño factorial de experimentos 2^2 , tomando como variables: la relación $R = \text{Cantidad de pulpa} / \text{Cantidad Medio mineral (ml)}$.

Para el análisis estadístico del diseño de experimentos se utilizó el software STATGRAPHICS. La estadística presentada consiste en un análisis de varianza que mide la variabilidad del porcentaje de metano y los efectos principales. Para

llevar a cabo un análisis estadístico confiable es necesario tener una réplica de cada experimento, de esta forma la cantidad de grados de libertad es suficiente para calcular las funciones de distribución estadística (F,p) y los efectos de las interacciones de mayor orden. En la tabla 2 se presenta los niveles de experimentación seleccionados para las variables de estudio.

Tabla 2. Variables del diseño de experimentos.

VARIABLES	NIVELES	
	BAJO	ALTO
Relación de alimento	0,1125	0,225
Inóculo de lodo PTAR (ml)	75	100

En la tabla 3 se presenta la matriz para el diseño de los experimentos

Tabla 3. Diseño de experimentos.

No. Experimento	R	Volumen (ml) de Inóculo
1	0,1125	75
2	0,1125	100
3	0,225	75
4	0,225	100

En la experimentación se utilizaron como reactores botellas de vidrio de 500 ml, dentro de un sistema cerrado en ausencia de oxígeno y provisto de una corriente continua de nitrógeno, cada botella fue llenada, con 200 ml de medio mineral y sustrato, los cuales fueron esterilizados en autoclave (marca Webeco Karl Kolb), para lograr la completa reducción del medio; posteriormente se adicionaron las cantidades de inóculo teniendo en cuenta el diseño de experimentos. Todos los experimentos se efectuaron por duplicado (la réplica se denomina con el número de experimento y la letra A), fueron trabajados a las mismas condiciones

(temperatura ambiente de 27°C, presión atmosférica, agitación manual y pH igual a 7). Cada reactor estaba comunicado con la botella de desplazamiento de líquido por una red de mangueras de plástico y agujas [14]. El biogás producido en el reactor se burbujea en una solución alcalina (NaOH) con fenolftaleína como indicador y pH mayor que 12, en la cual el CO₂ es absorbido y el volumen de gas metano desplaza un volumen igual de la solución alcalina. El volumen de solución alcalina desplazada fuera de la botella es equivalente al volumen de biogás generado por el sistema [22]. La soda (NaOH) desplazada fue colectada en unos recipientes a los cuales se les midió el volumen constantemente. La variable respuesta del proceso es la producción diaria de gas, la cual se monitoreo a partir de los datos obtenidos y se calculó AME, definida como:

$$AME = \frac{P*24}{FC*V*SSV}; \quad (1)$$

Donde:

AME = Actividad Metanogenica Especifica. (gDQO-CH₄/gSSV.d)

P = Pendiente correspondiente a la curva de AME de cada experimento, en ml/hora

FC = Factor de conversión de DQO a CH₄ en ml de CH / g DQO (este valor depende de la temperatura y la presión a la que se trabajó [14].

V = Volumen de lodo utilizado en el ensayo en litros.

SSV = Concentración de SSV en el lodo (g/ml).

Con el fin de comprobar la producción de metano en cada reactor se hizo uso de un analizador de gases marca BACHARACH modelo GA-94, que cuenta con una celda infrarroja de longitud de onda dual y una celda electroquímica, estos experimentos fueron analizados una vez que se consumía todo el volumen de NaOH correspondientes a 500 ml contenidos en botellas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

En la tablas 4, 5 y 6 se presenta la caracterización bromatológica, físico-química del sustrato y su composición mineralógica respectivamente.

Tabla 4. Análisis Bromatológico en base seca del bagazo del fique.

PARAMETRO	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA	MÉTODO DE ANALISIS/NORMA
Ceniza	%	9,94	Gravimétrico
Proteína	%	9,33	Kjeldahl/ NTC 1556
Grasa	%	4,73	Soxhlet/ NTC 668
Fibra	%	33,72	Gravimétrico/ NTC 668
E.N.N	%	42,25	-
Valor calórico	Kcal/100gr	220,9	-

Tabla 5. Caracterización físico-química del sustrato.

PARAMETRO	UNIDAD	TÉCNICA	VALOR
AGV	meq/l	Standard Methods (APHA)	32,02
SSV	mg/l	Standard Methods (APHA)	62,0818
DENSIDAD	g/ml	Desplazamiento de líquido	1,111
DQO	mg/l O2	Reflujo cerrado	22577,8
MATERIA ORGÁNICA	% C	Colorimétrico	37.9

Tabla 6. Composición mineralógica de la pulpa de fique [3].

ELEMENTOS	PULPA
Nitrógeno	1.32%
Fósforo	0.49%
Potasio	7.56%
Calcio	3.58%
Magnesio	0.72%
Sodio	0.40%
Hierro	52.20 ppm
Cobre	8.10 ppm
Manganeso	45.60 ppm
Zinc	35.00 ppm

Con relación al muestreo se determinó que el punto de donde se tome la muestra dentro de la zona delimitada no tiene significancia debido a que el comportamiento de todas las muestras es similar; las propiedades físicas y químicas de la pulpa son las mismas porque no varían las condiciones a las que se encuentran expuestos estos desechos. Por esta razón el trabajo experimental y la caracterización se realizaron con una sola muestra de pulpa de fique, la cual contiene los nutrientes y minerales (compuestos orgánicos, aminoácidos como proteínas, ácidos grasos, carbono) necesarios para suplir los requerimientos básicos de las bacterias metanogénicas para generar energía [27].

Las bacterias metanogénicas para su metabolismo requieren un compuesto orgánico como fuente de carbono, la composición mineralógica, el análisis Bromatológico y el porcentaje de materia orgánica demuestran que la pulpa de fique es un excelente sustrato para los microorganismos productores de Biogás, debido a que posee un alto contenido de carbono y nitrógeno necesario para el crecimiento bacteriano y para incrementar la eficiencia en el bioproceso.

En la tabla 7 y 8 se muestra el recuento de grupos microbiales aplicando la técnica del NMP, realizadas al jugo de fique y al lodo PTAR, respectivamente.

Tabla 7. Grupos microbiales relacionales con el metabolismo bacterial del jugo de fique expresado en NMP / ml.

Grupo metabólico	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Bacterias Anaerobias Estrictas BAS	15×10^{10}	17.5×10^8	85×10^8	8×10^{13}	45×10^{11}
Bacterias Fermentadoras de Lactosa BFL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bacterias Fermentadoras de Glucosa BFG	17.5×10^9	17.5×10^9	8×10^{11}	8×10^{12}	17.5×10^8
Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato BSRAC	47.5×10^8	15×10^8	7×10^9	8×10^{13}	8×10^{13}
Bacterias Sintróficas del Propionato BSP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 8. Grupos microbiales relacionados con el metabolismo bacterial del lodo PTAR expresado en NMP/ ml

GRUPOS METABÓLICOS	REACTOR METANOGENICO
Bacterias fermentadoras de glucosa (BFG)	ND
Bacterias fermentadoras del Lactato (BFL)	ND
Bacterias Acetogénicas del Propionato (BAP)	26×10^5
Bacterias Acetogénicas del Formato (BAF)	26×10^5
Bacterias Acetogénicas del Etanol (BAE)	11×10^5
Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA)	29×10^4
Bacterias Sulfatorreductoras del Lactato (BSRL)	74×10^4
Bacterias Metanogénicas del Acetato (BMA)	46×10^5
Bacterias Metanogénicas del Formato (BMF)	46×10^5
Bacterias Metanogénicas del Metanol (BMM)	11×10^5

ND: No se determinó.

Como se deduce de las tablas 7 y 8, el jugo de fique contiene una mayor concentración de bacterias sulfatorreductoras, comparadas con las presentes en

el lodo PTAR, la presencia de estas bacterias en altas proporciones inhiben el crecimiento de bacterias metanogénicas y por consiguiente la producción de metano. Por esta razón se utilizó como inóculo el lodo PTAR. La tabla 9 muestra la caracterización fisicoquímica del inóculo.

Tabla 9. Caracterización físico-química del inóculo.

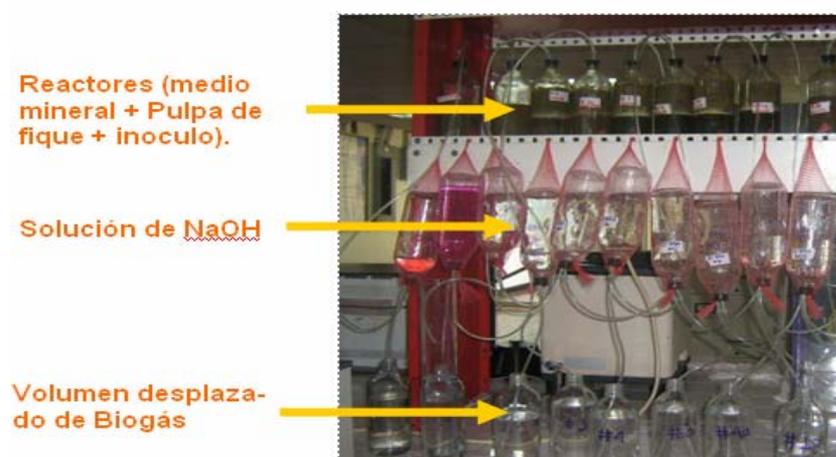
PARAMETRO	UNIDAD	MÉTODO	RESULTADO
SSV	g/ml	Standard Methods (APHA)	1
pH	-	Método Directo	7,7
DQO	mg/ml O ₂	Reflujo cerrado	80

Las características fisicoquímicas del inóculo son apropiadas para llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia, su alta concentración de consorcios microbianos lo hace un excelente inóculo para la bioproducción de metano.

Producción de Biogás.

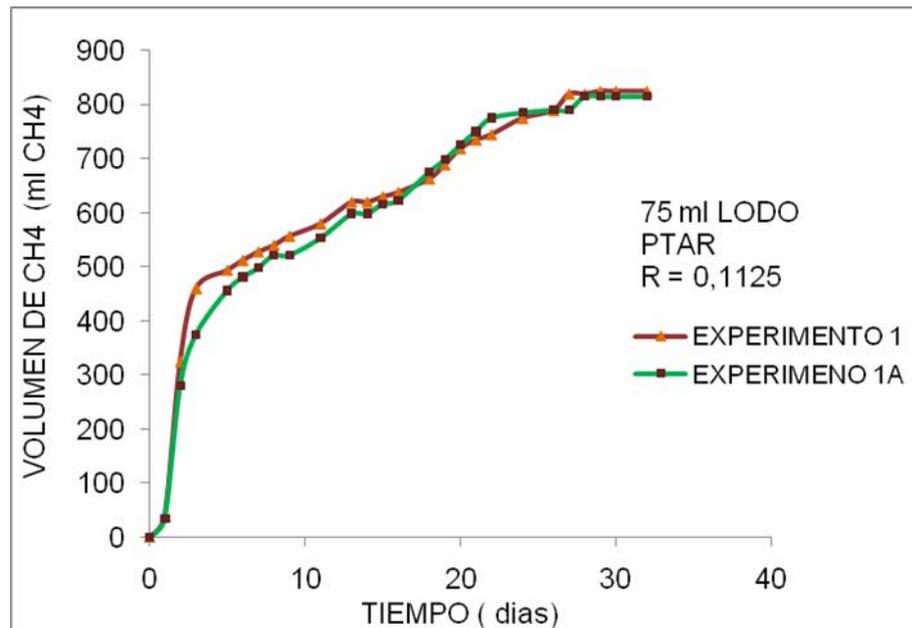
En la figura 2 se muestra el montaje de la Actividad Metanogénica Específica.

Figura 2. Montaje de la técnica de la Actividad Metanogénica Específica, por desplazamiento. (Laboratorio Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia y Medio Ambiente. UIS)



A continuación se hace la representación gráfica de cada uno de los experimentos que se realizaron, con su correspondiente réplica.

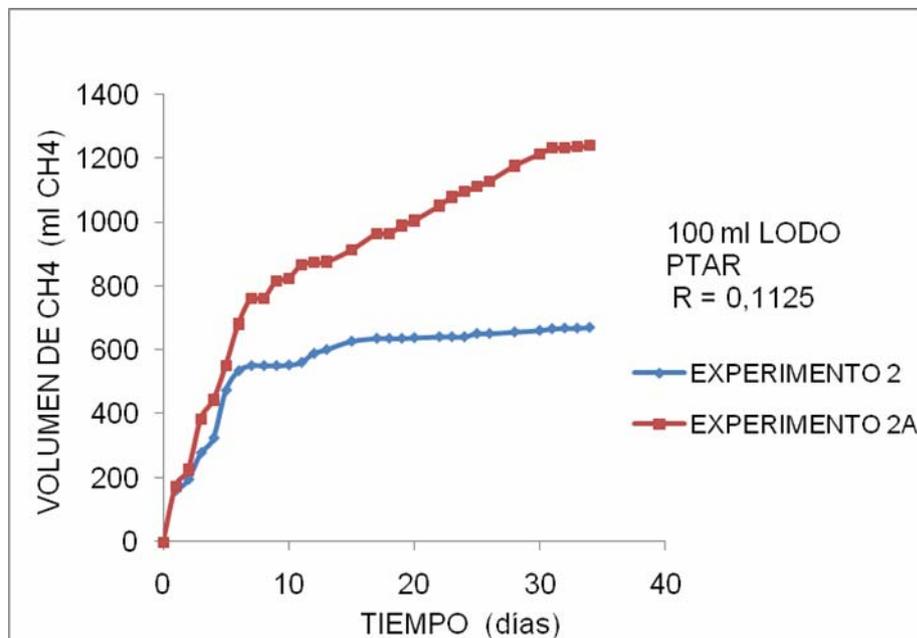
Figura 3. Curva de actividad metanogénica. Experimento 1 y 1A.



Como se observa en la figura 3 el comportamiento del experimento 1 con su réplica es similar; esto se comprueba matemáticamente con los valores de AME. La producción de metano correspondiente a los primeros días es mínima, debido al tiempo que requiere el inóculo en adaptarse al sustrato y medio proporcionado. Posteriormente, la producción se incrementó alcanzando su máximo valor a los 32 días de la operación del reactor.

Este experimento presentó la menor producción de metano respecto a las demás pruebas, esto podría explicarse por la deficiencia enzimática de las bacterias para la digestión de la pulpa de fique, sugiriendo un tiempo de digestión más prolongado que el de los otros experimentos.

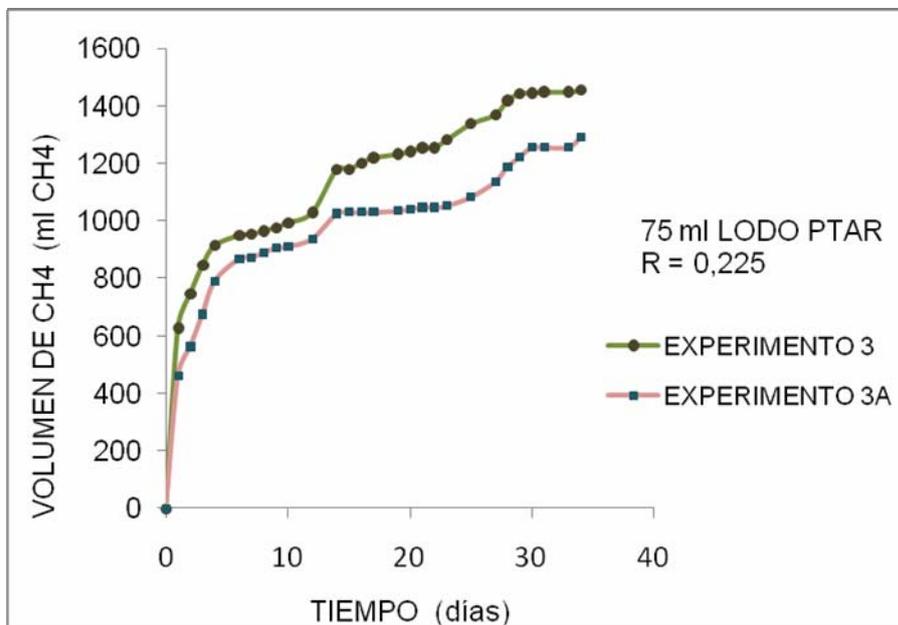
Figura 4. Curva de actividad metanogénica. Experimento 2 y 2A.



En la figura 4 se observa que a pesar de tener las mismas condiciones iniciales en la prueba, existen grandes diferencias en el comportamiento de degradación de la materia orgánica, se aprecia que el experimento 2 varía notablemente respecto a su réplica, posiblemente por una inhibición en el crecimiento microbiano, o un error de tipo procedimental en el montaje del ensayo. Por lo tanto la diferencia entre las actividades generadas por los reactores varía notablemente.

Como se aprecia en la curva de actividad metanogénica para los primeros días de reacción la producción de metano fue lenta, sin embargo, a lo largo del proceso incrementó hasta el día 31, momento en el cual se llega a su máxima producción.

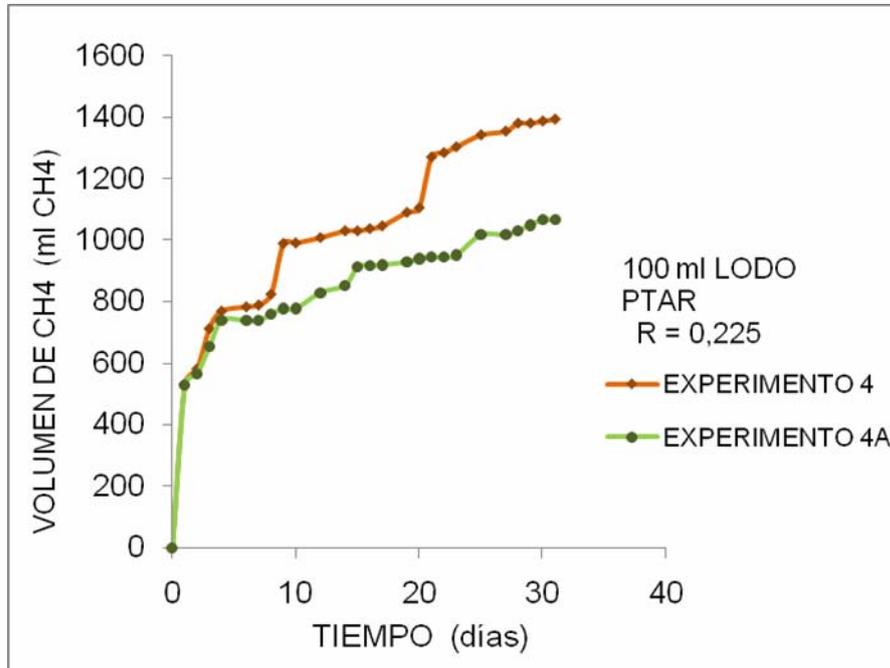
Figura 5. Curva de actividad metanogénica. Experimento 3 y 3A.



El experimento 3 y su réplica presentan una tendencia similar, como se refleja en los porcentajes obtenidos de metano para ambos casos. Como se puede observar en la figura 5, la diferencia en volúmenes es inherente al proceso debido a que los microorganismos son seres vivos y su metabolismo es diferente.

De la figura 5, se deduce que para los primeros días de reacción la producción de metano es lenta, el día 33 se alcanza la mayor producción. A pesar que este experimento tenía el máximo valor de R no fue suficiente para obtener un alto porcentaje de producción de metano (Tabla 10), debido a la baja concentración de bacterias en el inóculo.

Figura 6. Curva de actividad metanogénica. Experimento 4 y 4A



Este ensayo presenta un alto valor de Actividad Metanogénica Específica, lo que indica la presencia de poblaciones metanogénicas productoras de Biogás, comprobándose en el alto porcentaje de producción de Metano (25,2%).

La relación en el alimento y la cantidad de inóculo de cada experimento son factores importantes que intervienen en el proceso de producción de biogás. Como se observa en las curvas de actividad metanogénica, la prueba que presentó la máxima producción de biogás contenía mayor proporción R-inóculo (Experimento 4), debido a la alta presencia de microbiota y suficiente materia orgánica en el biodigestor. Cuando la concentración inicial de la relación en el alimento se reduce, la inhibición se incrementa, como se observa en la prueba 2 que corresponde a igual cantidad de inóculo y menor proporción en la relación del alimento, disminuyendo la producción de metano. Lo anterior indica que la deficiencia en la digestión anaerobia no solo es función de la concentración de un

compuesto tóxico, sino también de la concentración de consorcios microbianos presentes en el inoculo.

En todos los ensayos la tendencia de las graficas se asemeja a la de una función exponencial, observando que la respuesta del lodo al sustrato es inmediata, la fase de adaptación consta de unas pocas horas que no se logran apreciar en las curvas, lo que favorecería el período de arranque de un reactor anaerobio en caso de usar este lodo como inóculo. Así mismo, las actividades que se generan en cada experimento son semejantes, a excepción del reactor 2.

Al comparar las curvas de actividad metanogénica obtenidas en cada uno de los experimentos con datos reportados en la literatura, se observó que la tendencia es similar [23], y siempre hay un crecimiento proporcional entre el aumento de volumen de metano respecto al tiempo.

En la tabla 10 se reportan los resultados obtenidos del análisis de gases y AME para cada experimento:

Tabla 10. Análisis de Gases y AME.

EXPERIMENTO	DÍAS DE REACCIÓN	%CH ₄	%CO ₂	%O ₂	AME
1	11	1	21,6	3	0,01627
	28	3	20	2,1	
1A	11	0,8	25	3,7	0,01726
	29	2,8	21	2,2	
2	9	0,9	19,4	2,7	0,00674
	33	5,3	18	1,5	
2A	4	1,2	10,5	2,6	0,01813
	33	7,7	10	1,3	
3	2	0	32,7	3,8	0,01946
	6	0,4	17,7	3,2	

	33	5,9	33	1,4	
3A	2	0	33,4	4	0,01874
	17	0,9	37,3	3,2	
	33	6,2	40,2	1,6	
4	2	0,3	40,7	3,2	0,02210
	13	0,8	14,7	2,5	
	33	25,2	14,5	1,7	
4A	2	0,2	41,7	3,3	0,01212
	28	4,5	37	2,6	
	33	19,2	32,5	0,3	

El experimento 3 presentó la mayor AME demostrando así la respuesta positiva del inóculo respecto a la degradación de la pulpa de fique.

De acuerdo a los resultados obtenidos el experimento que mayor porcentaje de biogás produjo fue el 4, con una composición de: 25,2 % de CH₄, 14,5 % CO₂ y 1,7 % O₂.

Se observa que el porcentaje de oxígeno es alto para este tipo de procesos, esto se debe a que las condiciones de la atmósfera inerte no fueron controladas correctamente durante los ensayos y a errores de tipo personal en la manipulación de los experimentos, lo cual afectó la AME del lodo y por consiguiente una disminución en el producto final: metano.

La tabla 11 muestra el promedio de los porcentajes de metano obtenidos mediante el uso del analizador de gases en cada uno de los experimentos.

Tabla 11. Porcentaje de la producción de metano en los diferentes experimentos.

EXPERIMENTO	% CH ₄
1	2,9
2	6,5
3	6,05
4	22,2

Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos del diseño de experimentos, se realizó mediante el software STATGRAPHICS un diagrama de paretto, que se dispone a continuación:

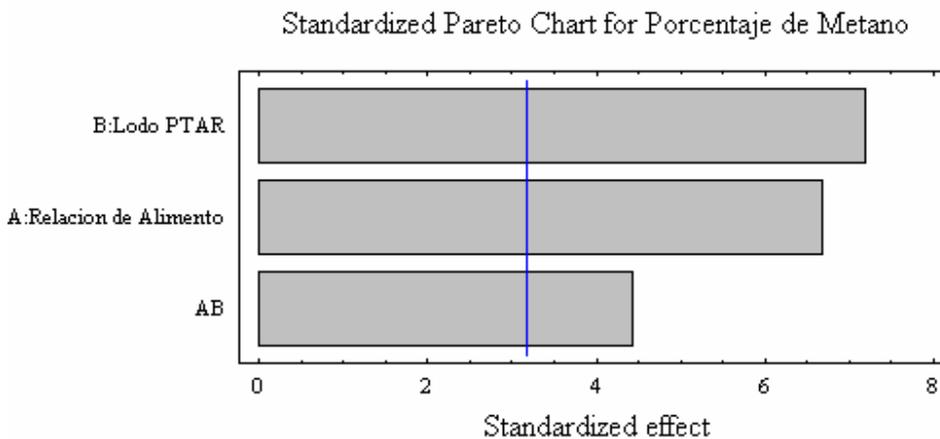


Figura 7. Diagrama de paretto de efectos estandarizados

Se observa que la línea vertical representa el límite de significancia de los efectos en los ensayos. A la derecha se encuentran aquellos efectos que son relevantes en el modelo estadístico y a la izquierda los de importancia despreciable. El diagrama de paretto estudia independientemente cada factor que interviene en la experimentación e indica que no se puede despreciar ningún efecto debido a que todos son inherentes al proceso de fermentación; siendo el más representativo el

lodo PTAR, lo que significa una deficiencia en la capacidad enzimática y una baja Actividad Metanogénica en el consorcio microbiano. El efecto AB corresponde a la mezcla de relación de alimento y lodo PTAR y es significativo porque es inherente al proceso, sin embargo no es el más importante en la bioproducción de metano.

4. CONCLUSIONES

Se descartó la utilización del jugo de fique como inóculo para la producción del biogás, ya que aún cuando este presenta concentración de bacterias anaerobias, también posee alto contenido de bacterias sulfatorreductoras, que inhiben el crecimiento de las bacterias metanogénicas y por consiguiente la producción de metano.

La prueba de Actividad Metanogénica Especifica (AME) demostró que el bagazo, generado durante el beneficio del fique, puede ser utilizado como sustrato en la digestión anaerobia para la producción de biogás, debido a que se obtuvo el 25,2 % de CH₄, 14,5 % CO₂ y 1,7 % O₂, lo cual indica que hubo crecimiento de suficientes poblaciones metanogénicas en el reactor anaerobio a las condiciones de operación empleadas.

La composición de biogás obtenido de la digestión anaerobia de la pulpa de fique, depende principalmente de la relación inóculo/sustrato y de las condiciones de operación. La máxima producción de biogás se obtuvo a una temperatura de 27°C, pH igual a 7, presión atmosférica y agitación manual discontinua.

RECOMENDACIONES

- Crear una atmosfera constante de nitrógeno que evite la entrada de oxígeno a los reactores, además se debe tener cuidado en el montaje de la Actividad Metanogénica Específica, debido a que en éste se presentan errores de tipo personal en su manipulación.
- Mejorar condiciones de operación para proceso de fermentación anaerobia.
- Monitorear periódicamente la actividad metanogénica para detectar el deterioro del lodo debido a toxicidad, deficiencia de nutrientes, acumulación de sólidos suspendidos, etc.

BIBLIOGRAFIA

1. Equipo técnico del proyecto “Prospectiva Tecnológica de la Cadena Productiva Agroindustrial del Fique del Departamento de Santander” Bucaramanga, 2005.
2. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Acuerdo para el fomento de la producción nacional de fique y mejora de su competitividad. Secretaría General de la Cadena Productiva del Fique. 2003.
3. Acuerdo Fomento de la Producción Nacional de Fique y Mejora de su Competitividad. Secretaría Técnica de la Cadena. Octubre 2003.
4. Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Fomento Económico. Comité Cadena Productiva del Fique. Departamento del Cauca.2002.
5. Acuerdo para el Fomento de la Producción y la Competitividad del Subsector del Fique, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CORPOICA y IICA. 2004.
6. MAZUMDAR, Consolidation of information. Biogas Handbook. Pilot Edition. Paris, 1982. p 195.
7. MSHANDETE Anthony; BJOINSSON Lovisa; KIVAISI, A. K; MST RUBINDAMAYUGI; BO Mattiasson. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. Renewable Energy. 2006. (31) 2385-2392.
8. R.P.J.M, Raven; KH Gregersen. 2007. Plants in Denmark: Successes and Setbacks. Renewable and Sustainable Energy Review. (11) 116-132.
9. www.unperiodico.unal.edu.co
10. MSHANDETE Anthony; BJOINSSON Lovisa; KIVAISI, A. K; MST RUBINDAMAYUGI; BO Mattiasson. Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes.2004.
11. MSHANDETE Anthony; BJOINSSON Lovisa; KIVAISI, A. K; MST RUBINDAMAYUGI; BO Mattiasson. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. 2005.

12. E.C. Gutiérrez, N. Fernández, J. Sepúlveda, E. Blanco, Z. Mármol. TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS DE FORMACIÓN. La Universidad del Zulia. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
13. www.consumer.es. EROSKI
14. DIAZ, M., ESPITIA, V., P, MOLINA. 2002. Digestion Anaerobia. Una aproximación a la tecnología. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Bogota.
15. FORERO MANCERA, William Leandro y ZÚÑIGA PELÁEZ, Juan Manuel. Evaluación de la Actividad Metanogénica de lodos. Universidad Nacional de Colombia, 2003. Tesis de Pregrado
16. SOTO M., MÉNDEZ R. y LEMA J.M., (1993). Methanogenic and non-Methanogenic activity test. Teorical basis and experimental set up. Universidad de Santiago de Compostela, España.
17. SANDOVAL L, Claudia; CARREÑO, Mariela; CASTILLO M, Edgar; VERGARA, Marisol. Caracterización Microbiológica de los lodos que intervienen en la Digestión Anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.
18. Digestión Anaerobia, Una Alternativa para el Tratamiento de Residuos Sólidos Urbanos. CENTRO DE ESTUDIOS E INVESTIGACIONES AMBIENTALES CEIAM.
19. Guía de prácticas de Microbiología, Departamento de microbiología. Universidad Complutense de Madrid 2004-2005.
20. COYNE M. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Primera Edición. Editorial Paraninfo. Madrid 2000.
21. FERRÉ Joan. El Diseño Factorial Completo 2². Grupo de Quimiometría y Cualimetría. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Universidad Rovira Virgili. Tarragona.

22. FORERO MANCERA, William Leandro y ZÚÑIGA PELÁEZ, Juan Manuel. Evaluación de la Actividad Metanogénica de lodos. Universidad Nacional de Colombia, 2003. Tesis de Pregrado.
23. Wilton Silva Lopes, Valderi Duarte Leite, Shiva Prasad. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. 2004.
24. Sigrid Kusch , Hans Oechsner, Thomas Jungbluth. Biogas production with horse dung in solid-phase digestion systems. 2007
25. Cun-fang Liu a, Xing-zhong Yuan a, Guang-ming Zeng a, Wen-wei Li a, Jing Li b. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. 2007
26. Sigrid Kusch, Hans Oechsner, Thomas Jungbluth. Biogas production with horse dung in solid-phase digestion systems. 2007.
27. MADIGAN, M., MARTINKO J., PARKER J., BROCK. Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Pearson Educación S.A. Madrid, 2004. Pág. 112-113.

ANEXOS

ANEXO A. 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	23	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 B. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES GRUPOS
MICROBIANOS DEL JUGO DE FIQUE PRACTICA REALIZADA POR
ESTUDIANTES DE BACTERIOLOGÍA.**

**ESTIMACION DEL NÚMERO DE REPRESENTANTES DE CADA POBLACION
PRESENTES EN EL JUGO DE FIQUE.**

Objetivo: Estimar el número de representantes, diferenciados por grupos metabólicos.

Este procedimiento se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP) descrita en el *Standar Methods APHA* diferenciando los siguientes grupos según el medio de cultivo

- Bacteria fermentativas
- Bacterias Sulfato reductoras
- Bacterias sintróficas
- Bacterias Metanogénicas

A su vez para cada población se cuantificó el número de representantes con diferentes sustratos.

Los medios que se trabajaron para esta técnica fueron:

- Medio de cultivo para recuento de bacterias anaerobias estrictas (BAS)
- Medio de cultivo para recuento de bacterias fermentadoras de lactosa (BFL)
- Medio de cultivo para recuento de bacterias fermentadoras de glucosa (BFG)
- Medio de cultivo para recuento de bacterias sulfatoreductoras del acetato (BSRAC)
- Medio de cultivo para recuento de bacterias sintróficas del propionato (BSP)

La técnica se basa en realizar diluciones seriadas de la muestra en el medio correspondiente, en tubos con tapones de caucho y al vacío, haciendo replicas por

ensayo. La positividad de los tubos se identificó de acuerdo a las características de cada grupo bacterial y realizando los cálculos del NMP con base en las tablas.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Medios de cultivo.
- Agua reducida.
- Tubos con tapones de caucho y al vacío.
- Cámara de Atmósfera de Nitrógeno.
- Incubadora a 35° C.
- Medidor de metano.
- Jeringas.

PROCEDIMIENTO

La muestra se introdujo en la cámara de Atmósfera de Nitrógeno. para realizar las diluciones, primero la muestra se homogenizó, y luego se tomó 1 ml de esta para diluirla en 9 ml de agua reducida. Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas, agregando 1ml de la dilución anterior en 9 ml de agua reducida, utilizando una jeringa purgada con nitrógeno previamente y trabajando con las normas de asepsia para evitar la contaminación de las diluciones, hasta llegar a la dilución 10^8 .

La inoculación de los tubos se realizó con jeringas bajo flujo de nitrógeno, con los cuidados necesarios, para evitar la contaminación de los medios, los medios se inocularon con 0.2 ml por tubo de la dilución correspondiente y se inocularon 5 tubos por dilución, mas dos blancos control sin inculo por medio.

La incubación se realizó a 35° C durante el periodo recomendado para cada grupo trófico.

RESULTADOS

El NMP se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$NMP/gSSV = \text{No de bacterias} * \text{máxima dilución positiva} * 5000/ gSSV$$

Se realizó un muestreo aleatorio del que se obtuvo 5 muestras con los siguientes resultados:

Grupo metabólico	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
BAS	15×10^{10}	17.5×10^8	85×10^8	8×10^{13}	45×10^{11}
BFL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BFG	17.5×10^9	17.5×10^9	8×10^{11}	8×10^{12}	17.5×10^8
BSRAC	47.5×10^8	15×10^8	7×10^9	8×10^{13}	8×10^{13}
BSP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

DISCUSION

Las muestras 1,2 y 3 se trabajaron al mismo tiempo y las 4 y 5 se sembraron una semana después, lo que podría explicar las diferencias en el comportamiento de los grupos de estos inóculos, ya que en las muestras 4 y 5 se observan un mayor numero de que podrían estar relacionadas con el notorio incremento de las BAS, lo que nos indica que las muestras deben trabajarse en el menor tiempo posible.

La no formación de metano a partir de propionato en la ruta metabólica, puede estar influenciado por la alta concentración de bacterias sulfatoreductoras, ya que grandes concentraciones de estas inhiben el crecimiento de bacterias metanogénicas, obteniendo como producto final H₂S.

ANEXO C. PREPARACION DEL MEDIO MINERAL PARA ACTIVIDAD METANOGENICA

MATERIALES Y REACTIVOS.

- Botellas de suero de 500 ml.
- Sistema de mangueras y agujas para comunicar la botella utilizada como reactor con la botella utilizada para medir la producción de metano por desplazamiento de líquido.
- Solución de NaOH con fenoftaleina como indicador de pH.
- Medio de cultivo.
- Solución de nutrientes.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO ANAEROBIO.

Para 1000 ml.

- Solución mineral de Balch sin sulfatos 50 ml
- Solución oligoelementos sin sulfatos 10 ml
- K_2HPO_4 0.3 g
- Solución de resazurina (0.1%) 1.0 ml
- Extracto de levadura 0.1 g
- Bio-tripcase (peptona tripsica de caseina)..... 0.1 g

Para 1 litro.

- Se completa volumen a 1 litro y se ajusta pH a 7.0 con NaOH 1 N.
- Se agrega 10% en volumen de agua adicional.
- Hervir hasta llegar al volumen de 1 litro para remover el O_2 presente.
- Enfriar bajo un flujo de N_2 libre de oxígeno, para prevenir la difusión de

oxígeno en el medio.

Cuando este a temperatura ambiente agregar:

- NaHCO_3 2.0 g
- Cisteina 0.5 g

- Dosificar bajo corriente de nitrógeno.
- Gasear el frasco donde se va a servir el medio con N_2 .
- Servir 200 ml de medio en botellas de suero de 500 ml.
- Hacer intercambio de fase N_2 - CO_2 por un minuto. Tapar y grafar bien las botellas.
- Llevar a autoclave durante 15 minutos (121°C . 15 psi).

PREPARACION DE SOLUCIONES.

Solución mineral de Balch sin sulfatos.

- KH_2PO_4 6.0 g
- NH_4Cl 5.0 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.1 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.16 g
- NaCl 12.0 g

- Diluir en 1 litro de agua destilada.
- Almacenar en refrigerador a 4°C .

Solución Oligoelementos sin sulfatos.

- Acido nitrilotriacético 1.5 g

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g
- NaCl 1.0 g
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g
- ZnCl_2 0.1 g
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g
- AlCl_3 0.01 g
- H_3BO_3 0.01 g
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g

Solución de Resazurina.

- Resazurina 0.05 g
- Agua destilada 50 ml

Disolver en 50 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente, proteger de la luz con papel aluminio.