

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO-BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
PROYECTO: DIVERSIDAD MICROBIANA

**EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS PARA OPTIMIZAR EL PROCESO
HIDROLÍTICO ANAEROBIO DE DESECHOS ORGANICOS COMPLEJOS EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOGAS**

ELABORADO POR:

Lic. Victor Hugo Cavero Olguin

ASESORES:

Maria Teresa Alvarez Aliaga Ph.D.

Luis Enrique Terrazas Siles Ph.D.

Alberto Giménez Turba Ph.D.

Prof. Bo Mattiasson

LA PAZ – BOLIVIA

2009



TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo II. ANTECEDENTES.....	3
Capítulo III. JUSTIFICACIÓN.....	5
Capítulo IV. MARCO TEÓRICO.....	8
1. DESECHOS ORGÁNICOS COMPLEJOS (DOC).....	8
2. TRATAMIENTO DE DESECHOS ORGÁNICOS COMPLEJOS.....	12
2.1 Métodos físicos.....	12
2.2 Métodos físico químicos.....	13
2.3 Métodos Químicos.....	13
2.3.1 Pre tratamiento ácido.....	14
2.3.2 Pre tratamiento alcalino.....	14
2.4 Métodos biológicos – Enfoque del proceso de Digestión Anaeróbica..	14
2.4.1 Hidrólisis.....	16
2.4.2 Acidogénesis.....	18
2.4.3 Acetogénesis.....	18
2.4.4 Metanogénesis.....	19
2.5 Digestión anaeróbica frente a digestión aeróbica.....	19
2.6 Estrategias biológicas para mejorar la digestión anaeróbica.....	20
2.6.1 Adición de enzimas.....	20
2.6.2 Bioaugmentación.....	21
2.6.3 Codigestión.....	21
2.7 Condiciones de cultivo.....	22
2.7.1 Influencia del pH.....	22
2.7.2 Influencia de la temperatura.....	23
2.7.3 Nutrientes.....	23
2.7.4 Toxicidad.....	24



Capítulo V. OBJETIVOS.....	25
1 OBJETIVO GENERAL.....	25
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
Capítulo VI. METODOLOGÍA.....	26
1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
1.1 Material Biológico.....	26
1.1.1 Substratos.....	26
Basura Vegetal (BV).....	28
Cascarilla de Arroz (CA).....	28
Aserrín (AS).....	28
1.1.2 Consorcios microbianos.....	28
1.1.2.1 Consorcios hidrolíticos.....	29
Consortio ISA.....	29
Consortio TACANA.....	29
Consortio OSCAR.....	29
1.1.2.2 Consorcios metanogénicos.....	30
Consortio PIG.....	30
Consortio LLAMA.....	31
Consortio MALLASA.....	31
2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	31
2.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	31
2.2 Determinación de la producción de Ácidos Grasos Volátiles	
(AGVs).....	31
2.3 Determinación de la actividad enzimática.....	32
2.4. Determinación de metano por cromatografía de gases.....	35
2.5 Determinación de la alcalinidad – pH.....	35
3 DISEÑO METODOLÓGICO.....	36
3.1 Determinación de la cantidad de Desecho Orgánico Complejo	
(DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido....	36
Dsecación y homogeneización de la basura vegetal.....	36



	Pre tratamiento ácido.....	36
	Homologación de los valores de DQO con el equivalente de glucosa en el medio de cultivo.....	37
3.2	Aislamiento, cultivo y activación de los consorcios hidrolíticos.....	39
3.3	Determinación del efecto de la temperatura de incubación y del tipo de DOC y consorcio microbiano en la producción de AGVs y en la alcalinidad del medio.....	39
3.4	Determinación del efecto de la proporción de los DOC.....	39
3.5	Ensayo de codigestión.....	40
3.6	Activación de consorcios metanogénicos.....	41
3.7	Optimización del cultivo metanogénico.....	41
Capítulo VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
1	Determinación de la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido.....	42
2	Aislamiento, cultivo y activación de consorcios anaerobios hidrolítico.....	43
2.1	Determinación del proceso hidrolítico a través de la actividad enzimática.....	43
3	Establecimiento de las condiciones del proceso hidrolítico a través del análisis de la producción de AGVs y la alcalinidad del medio en función al consorcio, substrato y temperatura de incubación.....	45
	Análisis de la producción final de AGVs.....	45
	Análisis de la alcalinidad.....	50
4	Determinación del efecto de la proporción de desecho orgánico complejo y consorcio hidrolítico sobre la producción de ácidos grasos volátiles, con la finalidad de determinar la condición adecuada de saturación de substrato.....	53



	Diferentes proporciones de BV con los consorcios ISA, OSCAR y TACANA.....	53
	Diferentes proporciones de CA con el consorcio OSCAR.....	57
5	Estudio de condiciones de codigestión de sustratos utilizando cascarilla de arroz y basura vegetal mezclados en diferentes proporciones...	61
6	Activación y cultivo de consorcios metanogénicos.....	67
7	Optimización de condiciones de cultivo metanogénico.....	67
	Capítulo VIII CONCLUSIONES.....	75
	Capítulo IX Artículo científico a ser publicado en el Segundo volumen de la revista BIOFARBO ed. 2010: EVALUATION OF BIOLOGICAL STRATEGIES TO OPTIMIZE THE HYDROLITIC ANAEROBIC PROCESS OF ORGANIC COMPLEX WASTES IN THE BIOGAS PRODUCTION	
	Capítulo X BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	
	Capítulo XI ANEXOS	



RESUMEN

Se estudió la producción de biogás mediante digestión anaeróbica usando desechos orgánicos complejos y consorcios microbianos ambientales. Diferentes estrategias fueron aplicadas y evaluadas especialmente en la etapa de la digestión anaeróbica con la finalidad de producir ácidos grasos volátiles (AGVs) mismos que más tarde fueron utilizados en la etapa metanogénica. Basura vegetal (BV), cascarilla de arroz (CA) y aserrín (AS) fueron primeramente evaluados en cuanto a su contenido de lignina para ser degradados en la digestión anaeróbica. Parámetros como la temperatura, pH y consorcio fueron usados para optimizar el proceso hidrolítico. Otros parámetros como la actividad enzimática fueron examinados en experimentos de codigestión usando BV y CA de los que los AGVs producidos fueron usados para generar metano en los cultivos metanogénicos. Los resultados mostraron que es posible el uso de BV y CA en uno solo con la finalidad de sacar ventaja de ambos. Parámetros como rendimiento (Y_p/s), productividad volumétrica (Q_p), consumo volumétrico (Q_s) y producción máxima fueron examinados con la finalidad de visualizar sus capacidades en una plena producción a gran escala. La etapa metanogénica mostró que de entre tres consorcios cultivados, solo uno pareció ser estable en cuanto a las condiciones iniciales en el medio de cultivo mostrando una producción de metano de hasta 60 %. El uso de BV y CA puede prevenir la falta de uno de ellos o la mala clasificación de la BV y aun así tener producción de metano.

ABSTRACT

Biogas production through anaerobic digestion using organic complex wastes and environmental microbial consortia was studied. Different strategies were applied and evaluated specially in the anaerobic digestion stage with the aim of producing volatile fatty acids which later on were fed into the methanogenic stage. Vegetal wastes, rice husks, and wood chips were first evaluated onto their lignin content for being degraded in the anaerobic digestion. Parameters like temperature, pH and consortia were used to optimise the hydrolytic process. Other parameters like the enzymatic activity was tested in co-digestion experiments using vegetal wastes and rice husks from which volatile fatty acids produced were used to generate methane in the methanogenic cultures. Results showed that it's feasible the use of vegetable wastes and rice husks at once in order to get profit from both. Parameters like yield (Y_p/s), volumetric productivity (Q_p), volumetric consumption (Q_s) and maximum production were tested in order to visualise their capabilities in a full scale process. Methanogenic stage showed that among three consortia used only one seemed to be quite stable for the initial conditions in the medium showing a production up to 60% methane. The use of vegetal wastes and rice husks may prevent the depletion of one of them or the non correct classification of vegetal wastes and still get methane production.



Capítulo I. INTRODUCCIÓN

El establecimiento de tecnologías alternativas como la digestión anaeróbica (DA) en el tratamiento de residuos orgánicos para la generación de energía es hoy en día una estrategia bastante bien aceptada a nivel mundial por no dañar el medio ambiente y por ser accesible a bajos costos de operación debido a la materia prima que se utiliza (Mata-Alvarez et al, 2000). Casi todo proceso de la vida cotidiana de los seres humanos lleva consigo la generación de basura, misma que es por lo general asociada con algo inservible cuando en realidad debería asociarse con un reservorio de energía esperando por ser explotado. Esta explotación es un proceso que depende de la calidad de la basura y por sobre todo, del proceso de degradación con que se cuente. Los materiales de desecho son de muy variada procedencia, dependiendo de la época del año, del lugar, del tipo de comunidad, etc. Por otro lado la degradación microbiana, al ser un proceso biológico, es de por sí la más adecuada, ya que debido a la versatilidad enzimática que poseen los microorganismos puede ser mucho más eficiente que los procesos químicos tradicionales en cuanto se refiere al tratamiento de residuos biológicos de origen agrícola, municipal o industrial.

La producción de biogás está directamente relacionada con la cantidad de ácidos grasos volátiles (AGVs) producidos durante la degradación de la basura y es por esto que la optimización de este proceso es crucial en la generación de este tipo de energía alternativa. Entre las diferentes estrategias utilizadas para la mejora en la producción de biogás se encuentra el uso de aditivos orgánicos (Yadvika et al., 2004), los mismos que pueden ser de naturaleza compleja como los desechos agrícolas, los residuos municipales e industriales.

El campamento O.S.C.A.R. (Obras Sociales de Caminos de Acceso Rural) ubicado en la región de los Yungas del departamento de La Paz además de tener bien clasificada su basura doméstica puede tener acceso a desechos agrícolas propios de la región como la cascarilla de arroz (CA) y también a aserrín (AS) generado en la carpintería del mismo campamento. Estos



dos aditivos orgánicos pueden representar una alternativa en la DA de los desechos propios de la región. Por otro lado las heces de animales como los cerdos pueden servir de consorcios microbianos encargados de la generación de metano. Estas heces son de fácil acceso ya que el campamento cuenta con un criadero de cerdos. La versatilidad que pueden presentar los microorganismos es tan grande como lo es la variedad de condiciones en las que los desechos de actividades humanas se almacenan y/o generan.

El uso de materiales como la CA conjuntamente con la basura vegetal (BV) en procesos de codigestión como alternativa de generación de AGVs para el subsecuente establecimiento de procesos metanogénicos utilizando consorcios microbianos de diferentes nichos ecológicos, fue analizado en el presente trabajo. Parámetros como temperatura, pH, producciones volumétricas (Q_p), consumos volumétricos de sustratos (Q_s), rendimientos de producto en función al sustrato (Y_p/s) y otros fueron evaluados tanto en la generación de AGVs por parte de los consorcios hidrolíticos como en la generación de metano por los consorcios metanogénicos.

Se comprobó que el uso de CA como sustrato alternativo en la DA es viable ante una posible falta de BV o posible contaminación de esta última con materiales de desecho inorgánicos. La generación tanto de AGVs como de metano mostró ser dependiente de las condiciones de cultivo, de la concentración de sustrato y del consorcio utilizado. Concluyendo de forma tal que las mejores condiciones fueron las establecidas empleando residuos orgánicos y consorcios microbianos provenientes del propio campamento.



Capítulo II. ANTECEDENTES

Debido a la pronta extinción de los combustibles derivados del petróleo y del creciente impacto ambiental que produce la acumulación de basura es imperativo el desarrollo e implementación de tecnologías alternativas que sean sostenibles. Las reservas petrolíferas en todo el mundo no constituyen un recurso renovable y su demanda mundial cada día es mayor. Por otra parte el biogás ofrece una alternativa bastante atractiva, ya que puede ser utilizado como combustible vehicular, como combustible doméstico en la cocción de alimentos y también para generar energía eléctrica, La emisión de gas metano y de gases NO_x cuando es utilizado como combustible vehicular es mínima. Por último es bueno recordar que al ritmo de consumo de derivados de petróleo se estima que las reservas se agotaran para el año 2040 y para entonces debemos ya haber mejorado nuestra tecnología ambientalista.

Es necesario que los procesos industriales y de producción en general no sean agresivos con el medio ambiente, por otro lado se debe buscar que sean ventajosos desde el punto de vista de los costos de operación. Para esto es necesario un estudio del flujo de los materiales de desecho para que así puedan ser integrados en procesos de producción (Patel M. et al., 2000). En la actividad agrícola es común la práctica del chaqueo y pese a ser una práctica obsoleta sigue vigente en la región de los Yungas del departamento de La Paz. Sabiendo que la gran mayoría de la población rural boliviana todavía depende de combustibles fósiles (Alvarez R. et al., 2005) es imperativo trabajar en tecnologías alternativas para la generación de energía. La energía renovable originada de los desechos agrícolas puede ser potenciada mediante la plantación y explotación de cultivos de crecimiento rápido.

El campamento O.S.C.A.R. tiene el potencial de procesar sus desechos domésticos así como la inmensa cantidad de desechos agrícolas de la región. La electricidad en el campamento depende de un generador a diesel mismo que inevitablemente es fuente de contaminación ambiental además de requerir costo de operación y mantenimiento. El campamento es principalmente habitado por estudiantes de secundaria, esto significa capital humano que



puede llevar adelante la implementación de una tecnología alternativa. La clasificación de la basura orgánica e inorgánica es una práctica ya bastante bien establecida en el campamento lo cual permite tener ya un gran paso realizado en este campo.

En Bolivia, la Universidad Mayor de San Andrés desarrolla diferentes líneas de investigación. Entre las cuales, en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, se desarrollaron modelos para la producción de biogás a partir de lodos, materia fecal y vegetal (Delgado et al., 2002), y de la papa (*Solanum tuberosum*) (Quispe et al., 2004). Otros estudios realiza el IIDEPROQ de la Facultad de Ingeniería, a partir de heces de llama y vaca (Alvarez R. et al., 2005).



Capítulo III. JUSTIFICACIÓN

La producción de biogás a partir de desechos de tipo agrícola y doméstico es una alternativa energética de gran importancia tanto en países altamente industrializados como en los no industrializados. La descomposición de desechos orgánicos complejos como la basura vegetal generada de manera doméstica en la preparación de alimentos y desechos agrícolas propios de una región, constituyen la materia prima en el proceso denominado digestión anaeróbica. Este proceso constituye la etapa más importante en la generación de biogás, pues, dependiendo de la efectividad de los microorganismos hidrolíticos para degradar carbohidratos, proteínas y lípidos (materia orgánica) y producir de esta manera ácidos grasos volátiles, el proceso metanogénico será exitoso, debido al consumo de estos últimos. La cantidad de metano en el biogás es por lo general superior al 50% debido a la parcial solubilidad del CO₂. Es también conocido que la hidrólisis de carbohidratos, lípidos y proteínas da un rendimiento superior en la generación de metano llegando a ser en estos casos igual al 70% del biogás (Gallert C. et al. 2002). Existen diferentes estrategias en la digestión anaeróbica que dependen principalmente del tipo de materia prima y del proceso utilizado. Uno de los principales problemas especialmente cuando se trata de desechos agrícolas es la alta cantidad de lignina que se encuentra en estos materiales. La lignina es un polímero complejo que no es degradado en condiciones anaeróbicas y la importancia de su degradación radica en el hecho que una vez degradado, polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, xilano y otros pueden ser degradados en sus monómeros para ser consumidos por microorganismos con capacidad de fermentar estos compuestos, y así se obtienen compuestos de valor como etanol, ácidos grasos volátiles, etc. También se recomienda una previa aclimatación de consorcios hidrolíticos para mejorar este proceso (Gamze G. et al. 2004). La generación de ácidos grasos volátiles es de vital importancia para una subsecuente generación de biogás y es por esto que su optimización es importante.



La generación de desechos de tipo doméstico, agrícola, industrial y todos aquellos del diario vivir de las sociedades humanas modernas constituyen un gran problema ambiental por su gran acumulación y escaso procesamiento, esto debido al constante y persistente uso de botaderos e incineradores para su tratamiento, prácticas que resultan altamente dañinas para el medio ambiente. Mientras no exista el peligro de contaminantes tóxicos que queden como residuo la práctica del compost es una buena opción para tratar residuos agrícolas (Gallert C. et al. 2002). El desarrollo económico e industrial a nivel mundial necesita ir de la mano con las necesidades ambientales del planeta y para esto es necesario expandir nuevas técnicas en el tratamiento de la basura. Miles de toneladas de basura se generan diariamente debido casi en su totalidad, a actividades humanas y poco beneficio se saca de ella. Es por esta razón, que la conversión de ésta en energía a través de la optimización de procesos biológicos es imperativa para disminuir las emisiones de gases tóxicos para el medio ambiente. Los principales gases emanados por un botadero son metano, dióxido de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Jacobus P.H. van Wyk, 2001) de los cuales el metano y el dióxido de carbono son los que mayor aporte hacen al incremento del efecto invernadero. En nuestro país es conocida la práctica del chaqueo en la que los agricultores se deshacen de sus desechos quemándolos y así emanando gases nocivos para el medio ambiente. También existe la acumulación de pesticidas, metales pesados y otras sustancias peligrosas para la salud que quedan disueltas en la fracción líquida de los botaderos que, en última instancia termina contaminando aguas que van a riegos agrícolas o al consumo humano directamente, haciéndose así sumamente peligrosas. Por todo lo mencionado queda claro que la basura de tipo orgánico además de ser un reservorio energético necesita ser tratada para mejorar la calidad de vida en nuestro planeta.

Las características metabólicas de los consorcios microbianos tanto en la digestión anaeróbica como en la metanogénesis requieren un estudio de tipo bioquímico. Se puede evaluar el metabolismo de un consorcio mediante la medición de sus productos finales, tal es el caso de los AGVs en los consorcios hidrolíticos que son los principales efectores de la



digestión anaeróbica y la producción de metano (principal componente del biogás) por parte de los consorcios metanogénicos. La generación de metano ante diferentes proporciones de AGVs en términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO) debe ser estudiada en profundidad para entender mejor el proceso en dos etapas (Hidrólisis y Metanogénesis) (Burak D. et al. 2002). La medición de los substratos y su consumo en el tiempo, así como también otros parámetros como temperatura y pH ayudan a la optimización del proceso en general. La evaluación y optimización de esta digestión anaeróbica y consecuente metanogénesis es el pilar de una producción sostenible de este combustible.

El objetivo del presente estudio es el de evaluar estrategias biológicas, tales como el incremento en las proporciones de materia orgánica y la codigestión de residuos orgánicos, para optimizar el proceso hidrolítico de degradación y de esta manera obtener concentraciones incrementadas de AGVs para el establecimiento de un proceso de metanogénesis. El marco de estudio está enfocado en la problemática de generación de energía requerida en el campamento O.S.C.A.R. (localidad de Palos Blancos, La Paz), quienes poseen un excelente sistema de clasificación de basura y que además cuentan con energía eléctrica proveniente de generadores alimentados con diesel. Este trabajo constituye un análisis de la factibilidad de producción de biogás, a partir de desechos orgánicos y consorcios microbianos, para que de esta forma se puedan proseguir con más estudios a escala de laboratorio y piloto. De esta manera se podría ofrecer una posibilidad de generación de energía alternativa, amiga del medio ambiente, a una población aislada.



Capítulo IV. MARCO TEORICO

1. DESECHOS ORGÁNICOS COMPLEJOS (DOC)

El reciclaje de los materiales de desecho se hace día a día una actividad más obligatoria en diferentes países de todo el mundo, debido a políticas locales e internacionales que alientan el uso de la basura como fuente de energía. Se pueden clasificar los materiales de desecho de diferentes maneras, como por ejemplo materiales de desecho en la que se describen sub productos no vendibles y residuos inevitables (Mulholland et al. 2000). Debido a que los residuos orgánicos son mezclas casi imposibles de separar en cada uno de sus constituyentes se aconseja hacer uso de la digestión anaeróbica como el procedimiento más adecuado para tratar estos residuos, y utilizando estas tecnologías alternativas de manera óptima el efecto invernadero no se ve incrementado pese a que se genere metano y dióxido de carbono (Hofvendahl y Hagerdal-Hahn, 2000). No es aceptable el desequilibrio entre la materia prima y la basura generada como producto de la actividad industrial que hace uso de esta materia prima, y es por esta razón que los desechos deben ser clasificados y utilizados mediante tecnologías de bioremediación de manera rutinaria.

Los principales materiales adecuados para el proceso de digestión anaeróbica son la fracción sólida de las aguas servidas, residuos agrícolas, residuos industriales y residuos sólidos municipales (IEA Bioenergy, 2001). Los desechos de origen agrícola suelen ser destinados a la alimentación de animales de establo a manera de forraje, pero esta práctica depende de la actividad ganadera y por supuesto de la cantidad de desecho agrícola que se genera. Como alternativa estos materiales pueden ser degradados por microorganismos ambientales que se alimentan de estos desechos y en última instancia producir biogás. Muchos de los desechos agrícolas son ricos en material lignocelulósico, lo que hace difícil su degradación mediante digestión anaeróbica.



La fracción sólida de las aguas servidas es rica en microorganismos anaerobios que hidrolizan la materia orgánica y aquellos que a partir de los productos generados por esta hidrólisis generan biogás. Entre las ventajas de utilizar materia proveniente de las aguas servidas está la sanitación de estas y también la reducción del mal olor.

Los principales polímeros encontrados en la matriz de los desechos agrícolas son la celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa que es el polímero más abundante en la naturaleza constituye aproximadamente el 40 % del peso seco en la madera y está compuesta exclusivamente de unidades de D-glucosa (Fig. 1) unidas mediante enlaces β -1,4 que forman dímeros de celobiosa, mientras que la hemicelulosa (Fig. 2) que constituye aproximadamente el 25 a 30 % del peso seco es más diversa en cuanto a su composición teniendo como unidades monoméricas D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido 4-O-metilglucurónico, ácido D-galacturónico y ácidos D-glucurónicos (Pérez J. et al., 2002).

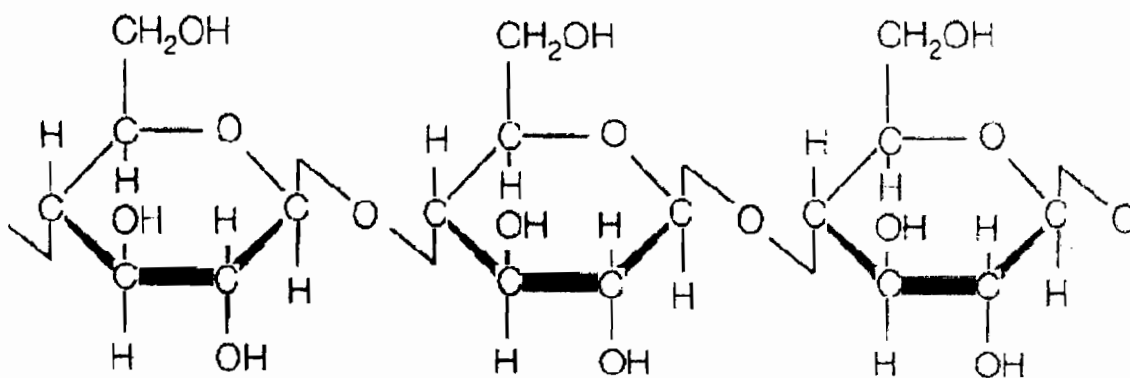


Figura 1. Estructura química de la celulosa



La lignina (Fig. 3) que junto a la celulosa es también el más abundante de los polímeros en la naturaleza es un tipo de polímero mucho más complejo y amorfo que esta constituido por unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de uniones lo que le da al polímero alta variabilidad en su estructura y por ende menor especificidad para ataques enzimáticos.

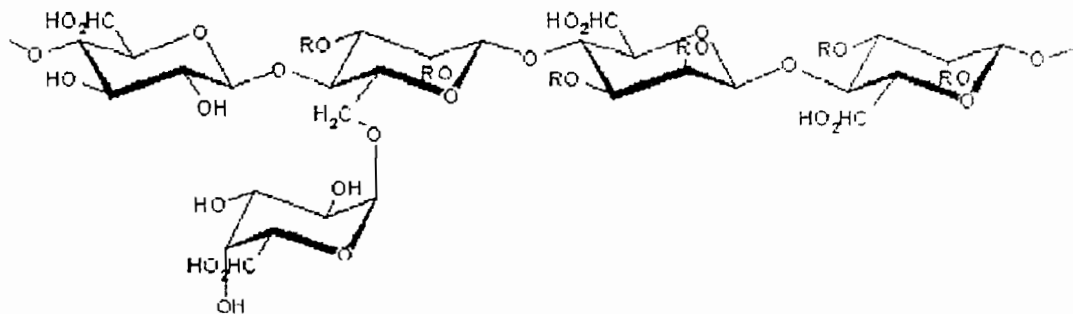


Figura 2. Estructura química del galactomanano que es típicamente encontrado en la hemicelulosa.

En el caso los residuos industriales, estos son diversos y se requieren tratamientos más específicos en función a los principales contaminantes que contengan y así también suele requerirse de microorganismos más específicos con la finalidad de que puedan degradar contaminantes característicos en cada caso.

Los residuos sólidos municipales constituyen un gran problema ambiental pues estos desechos son usualmente depositados en botaderos en los que la degradación, que se da de forma natural, toma mucho tiempo no pudiendo evitarse la contaminación ambiental como resultado final.

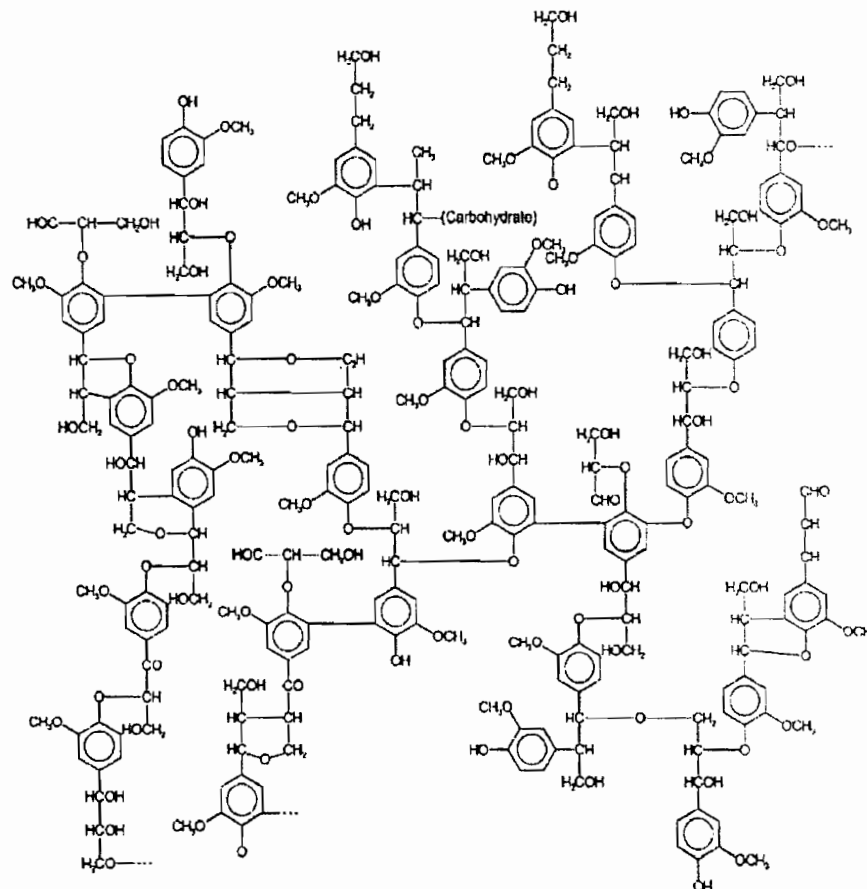


Figura 3. Estructura química de la lignina.

Factores como los cambios de estación y la calidad del material de desecho son naturales, otros que son propios del proceso de digestión como por ejemplo el tamaño del reactor y por último aquellos que no afectan de manera directa al proceso deben ser evaluados constantemente (Sarapatka B., 1994).



2. TRATAMIENTO DE DESECHOS ORGÁNICOS COMPLEJOS

La complejidad de los DOC hace que su degradación no sea del todo fácil y es por esta razón que se aplican ciertas metodologías para mejorar su digestión. En condiciones naturales la degradación es bastante compleja y difícil de reproducir con exactitud en el laboratorio, un buen modelo es el rumen pues es el nicho ecológico de los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica y de la generación de biogás, por esta razón es recomendable su estudio (Boullagui H. et al. 2005). La finalidad de las técnicas de pre tratamiento es solubilizar la lignina junto con la hemicelulosa y reducir el grado de cristalización de los polímeros en la matriz para que así las enzimas tengan mayor facilidad de atacar. Un buen pre tratamiento debe tener la capacidad de generar la mayor cantidad posible de unidades de monosacáridos como producto del pre tratamiento en sí o como producto inmediato de la acción enzimática, no debe degradar los monosacáridos solubilizados, no debe generar productos que resulten inhibitorios a la fermentación y por último debe ser económicamente viable (Ye S. et al., 2002). A continuación se hace una revisión de los métodos de pre tratamiento de tipo físico y químico utilizados para optimizar la digestión anaerobia.

2.1 Métodos físicos

Puede hacerse un tratamiento mecánico mediante el cual se pueda romper al máximo posible la estructura cristalina de los DOC. La materia cruda puede cortarse, molerse o pulverizarse, dependiendo de la cantidad de lignina que tenga. También se pueden hacer irradiaciones con rayos gamma, los cuales tienen la capacidad de romper los enlaces glucosídicos β -1,4, sin embargo esta técnica no es bien aceptada desde el punto de vista medio ambientalista (Galbe Mats. et al., 2007). Mediante tratamiento por calor, denominado pirolisis también se puede hacer que la celulosa se desprenda de la matriz para luego ser solubilizada mediante un tratamiento químico adicional. Las temperaturas



de pirolisis son de aproximadamente 300 °C pero se obtienen mejores resultados a temperaturas más moderadas (Ye S. et al., 2002).

2.2 Métodos físico químicos

Entre los más populares existen el tratamiento con vapor a altas presiones y el uso de amoníaco acuoso también a altas presiones (Steam explosion). El uso de vapor de agua a altas presiones consiste en mantener los DOC en vapor a presiones de 0.69 a 4.83 Mpa que corresponden a 160 a 260 °C durante cierto periodo de tiempo luego del cual repentinamente la presión desciende hasta igualar la atmosférica ocasionando que se rompa la estructura cristalina quedando bastante matriz expuesta a un subsecuente ataque enzimático. Una desventaja que puede acompañar a esta técnica es la generación de inhibidores de la fermentación por lo que se recomienda lavar la materia tratada para liberarla de inhibidores (Ye S. et al., 2002). Una técnica similar hace uso de amoníaco acuoso conjuntamente la presión alta, esta técnica es conocida como AFEX de su sigla en inglés (Ammonium Fiber Explosion). La principal ventaja de esta es que no genera inhibidores de la fermentación.

2.3 Métodos Químicos.

Existen varias técnicas de pre tratamientos químico que al igual que los pre tratamientos físicos tienen como finalidad mejorar la subsecuente acción enzimática. Entre los métodos químicos más comunes podemos encontrar a la ozonólisis (Pérez J, et al., 2002) que tiene la ventaja de no producir sustancias tóxicas y se realiza a temperatura ambiente. Los más comunes son los que hacen uso de soluciones ácidas y los que hacen uso de soluciones alcalinas.



2.3.1 Pre tratamiento ácido

En el pre tratamiento ácido se utilizan ácidos fuertes tales como sulfúrico, clorhídrico y nítrico, el ácido logra degradar aun más cuando es sometido a incubación en condiciones extremas tales como altas temperaturas como por ejemplo autoclave durante 90 min y otros tratamientos térmicos afines. El problema de usar estas condiciones extremas es la toxicidad subsecuente, motivo por el que debemos considerarse pasos extras como neutralizar el medio, separar las sustancias tóxicas, y también el material de los reactores que deben resistir la corrosión (Ye S. et al., 2002). Otras opciones como usar temperaturas moderadas y/o concentraciones menos agresivas son prometedoras.

2.3.2 Pre tratamiento alcalino

Se puede hacer uso de hidróxido de sodio o también de cal para degradar DOC. En este tipo de pre tratamiento suele también utilizarse altas temperaturas y a diferencia del tratamiento ácido, este tratamiento está mejor dirigido a degradar compuestos que son ricos en lignina y no así en xilano, celulosa y hemicelulosa. El posible mecanismo es la saponificación de los enlaces éster que unen la hemicelulosa, el xilano y otros componentes (Ye S. et al., 2002).

2.4 Métodos biológicos – Enfoque del proceso de Digestión Anaeróbica

La conversión de la materia orgánica mediante digestión anaeróbica hacia la generación de metano, ocurre en cuatro pasos. El primer paso denominado hidrólisis implica la transformación del material orgánico insoluble mediante la acción de enzimas secretadas al medio externo celular y/o enzimas que se encuentran en la superficie de las células. Los compuestos orgánicos de alto peso molecular como carbohidratos, lípidos y proteínas son hidrolizados y como consecuencia se producen productos que son más solubles tales como cadenas cortas de polisacáridos, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos. El



segundo paso se denomina acidogénesis en el que los productos de la hidrólisis son fermentados produciendo ácidos grasos de cadena corta. El tercer paso denominado acetogénesis como su nombre los sugiere se produce ácido acético e hidrógeno molecular. Por último en el cuarto paso llamado metanogénico se produce metano y dióxido de carbono mediante el uso de hidrógeno molecular o ácido acético. Un resumen de todos estos procesos metabólicos se muestra en la Figura 4.

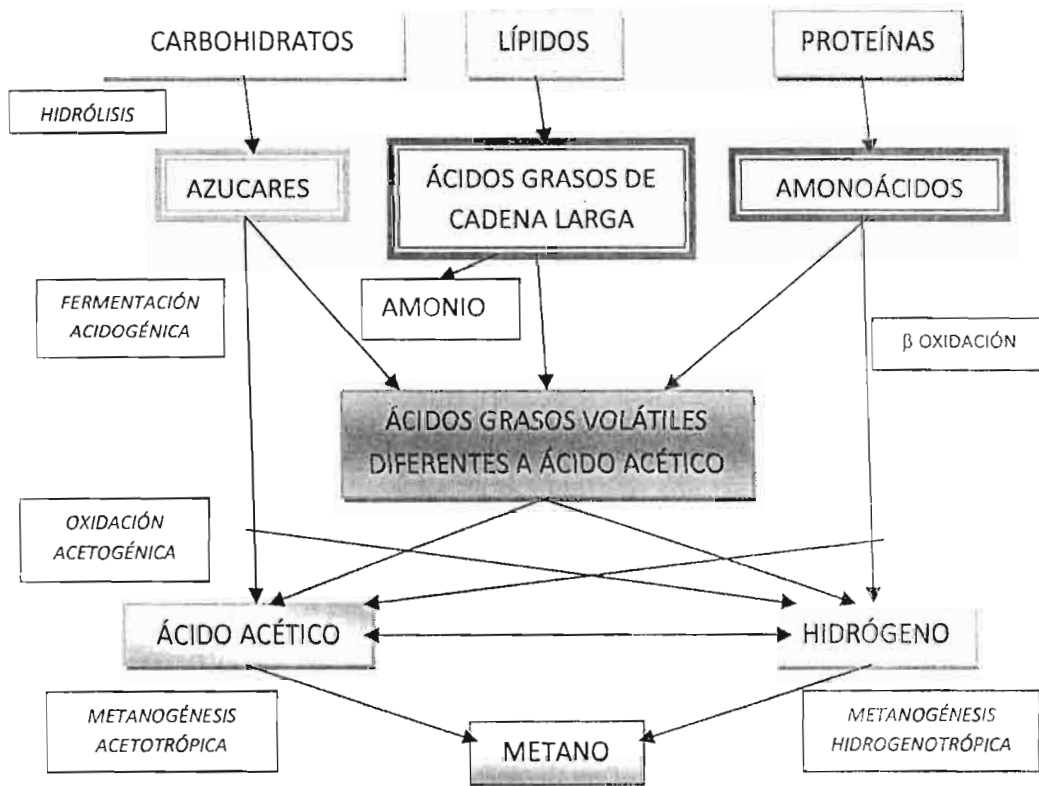


Figura 4. Rutas metabólicas en la digestión anaeróbica



Los métodos de tratamiento de desechos orgánicos complejos mencionados anteriormente, pueden maximizar el reciclaje y la recuperación de los componentes inútiles. Entre estos métodos, el tratamiento biológico basado en la digestión anaeróbica con frecuencia es el más rentable, debido a la recuperación de la alta energía ligada al proceso y a sus consecuencias limitadas para el medio ambiente.

2.4.1 Hidrólisis

Es la etapa en la que los polímeros del material lignocelulósico, lípidos y proteínas son hidrolizados por la acción de enzimas secretadas o ubicadas en la superficie exterior de los microorganismos hábiles para tal propósito, entre las cuales se pueden mencionar a celulasas, amilasas, lipasas y proteasas. Los monómeros y/o oligosacaridos generados son solubles y pueden ser ingeridos por los microorganismos. La hidrólisis es generalmente considerada el paso limitante en el proceso general de la conversión de DOC a metano u otro producto de interés.

Las principales enzimas involucradas en la hidrólisis son las involucradas en la hidrólisis de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La hidrólisis de la celulosa es mediada por celulasas que actúan en los enlaces β -1,4. Estas enzimas son generalmente clasificadas en endoglucanasas (EGs) y celobiohidrolasas (CBHs). Las EGs actúan en sitios amorfos de la celulosa rompiendo internamente el polímero es decir una acción endo- β -1,4 glucosídica. Las CBHs por el contrario actúan en lo extremos terminales del polímero, es decir que tienen una acción exo- β -1,4 glucosídica. La acción conjunta de estas dos enzimas produce como resultado celobiosa que es un dímero de dos unidades de glucosa y para que la hidrólisis sea óptima actúa una enzima llamada β -glucosidasa (Pérez J, et al., 2002). La hidrólisis de la hemicelulosa es un poco más compleja debido a la variedad de polímeros que componen la hemicelulosa. Entre los polímeros más comúnmente



encontrados en la hemicelulosa está el xilano y el xilano O-acetil-4-O-metilglucurónico. Enzimas como las endo-1,4- β -xilanasas y xilano 1,4- β -xilosidasas se encargan de degradar el xilano hasta xilosa. Por otro lado una batería de cuatro enzimas se encargan de degradar el xilano O-acetil-4-O-metilglucurónico, estas son endo-1,4- β -xilanasas, acetil esterasa α -glucuronidasa y β -xilosidasa son las que actúan sinérgicamente para degradar este polímero (Pérez J, et al., 2002). La degradación de la lignina es aun más compleja obviamente debido a su alto peso molecular y complejidad estructural. Las enzimas mejor conocidas en la degradación de este polímero son las lacasas y peroxidasas. De estas últimas la lignino peroxidasas (LiPs) y las manganeso peroxidasas (MnPs) han sido bien caracterizadas (Pérez J, et al., 2002). Los microorganismos mejor estudiados en la degradación de la lignina son los hongos “White-rot fungi” y se conoce muy poco o nada acerca de procariontas con una real capacidad de degradación de la lignina.

Por otro lado la hidrólisis también depende de la acción de enzimas lipolíticas, proteolíticas y pectinolíticas. Las enzimas lipolíticas dejan como resultado de su acción sobre mono, di y tri acilglicéridos moléculas de glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Se sabe que su acción depende de la presencia de una segunda fase, una fase lipídica, que desencadena la reacción (Jaeger et al. 1994). Por otro lado las enzimas proteolíticas actúan sobre los enlaces peptídicos de las proteínas para así dejar en solución a los aminoácidos que conforman las proteínas para que luego sean metabolizados como fuente de carbono y/o nitrógeno.

Gracias a la hidrólisis de las macromoléculas mencionadas el medio se enriquece de moléculas solubles que son fácilmente tomadas por los microorganismos para metabolizarlas y crecer a expensas de estas.



2.4.2 Acidogénesis

Esta es la más rápida de las etapas en la digestión anaeróbica y se lleva adelante por la acción de microorganismos fermentativos y oxidadores anaerobios. Se forman productos tales como AGVs, lactato y alcoholes luego de la fermentación de los productos de la hidrólisis. Esto se da en respuesta a la ausencia de un aceptor de electrones externo, la formación de ácidos orgánicos de cadena corta es la respuesta metabólica a la acumulación de electrones y el incremento de la presión de hidrógeno.

Dependiendo del tipo de microorganismo y substratos la fermentación puede dar diferentes productos, así por ejemplo los triacilglicéridos dan como resultado glicerol, que en última instancia es fermentado hasta ácido acético, y ácidos grasos de cadena larga. En el caso de los aminoácidos generados en la hidrólisis pueden ser fermentados hasta AGVs, amoníaco, sulfuro, dióxido de carbono e hidrógeno.

Hay ciertos microorganismos metanogénicos que pueden utilizar directamente los productos de la acidogénesis para generar biogás, pero por lo general es necesaria la acción de los microorganismos acetogénicos.

2.4.3 Acetogénesis

Los microorganismos acetogénicos son de crecimiento lento y se encargan de transformar los productos de la acidogénesis en acetato, dióxido de carbono, formiato e hidrógeno, esta acción depende de una baja presión de hidrógeno (Schink. 1997: Mah et al., 1982: Sekiguchi et al., 2001). Para que esta presión sea baja se requiere de quienes consuman hidrógeno, es así que estos microorganismos tienen una alta sintropía con los microorganismos metanogénicos.



2.4.4 Metanogénesis

Los microorganismos encargados de producir metano son los metanógenos que pertenecen al dominio taxonómico *Archea*. Entre los substratos que utilizan para producir metano están el acetato, hidrógeno, formiato, metanol y dióxido de carbono (Gujer W, Zehnder AJB. 1983). Esta conversión se realiza mediante una de dos vías metabólicas importantes, estos son acetotrófica e hidrogenotrófica. Se ha estimado mediante relaciones estequiométricas que cerca del 70 % del metano se produce por la vía acetotrófica (Archer, 1983; Klass DL, 1984) pese a que solo se conocen dos géneros de microorganismos que tienen este metabolismo (*Methanosaeta* y *Methanosarcina*), mientras que la mayoría usa la vía hidrogenotrófica (Hawkes and Hawkes, 1987; Shea et al., 1968), esta vía tiene mayor rendimiento y no es limitante, esto debido a que mantiene la presión de hidrógeno baja y así no inhibe a los microorganismos acetogénicos. Los microorganismos hidrogenotróficos son los más veloces de entre todos los microorganismos involucrados en la digestión anaeróbica, su tiempo de duplicación ha sido estimado en seis horas (Mosey and Fernandez, 1989), comparando con tiempos de duplicación de más de dos días resulta claro que son bastante más veloces. Debido a su alta cinética en el consumo de hidrógeno son bastante resistentes a cambios en su entorno mientras que los acetotróficos son más lábiles a este tipo de cambios.

2.5 Digestión anaeróbica frente a digestión aeróbica

En la digestión aeróbica el aceptor final de los electrones es el oxígeno y el carbono proveniente de la materia orgánica es oxidado hasta dióxido de carbono. Aproximadamente el 60 % de la energía proveniente de la materia orgánica es utilizada en la síntesis de más biomasa y su mantenimiento, siendo el resto disipado como calor (Mah R. A. 1982), esto se acompaña también de la producción de otros compuestos como



ketonas, aldehídos y amonio. La degradación aeróbica es también conocida como producción de compost.

En la digestión anaeróbica cerca del 90 % de la energía existente en los substratos es utilizada para producir metano el cual tiene un alto contenido calorífico (24 MJ/m^3) mientras que el restante 10 % es distribuido entre los requerimientos metabólicos y disipado como calor, como consecuencia se tiene menor incremento de la biomasa y mayor producción de energía en forma de gas metano (Colleran et al., 1992).

Queda claro que ante una demanda de soluciones prácticas para los problemas medio ambientales y la creciente demanda de combustibles no derivados del petróleo la digestión anaeróbica es una de las mejores si no la mejor alternativa tecnológica para encarar el problema.

2.6 Estrategias biológicas para mejorar la digestión anaeróbica

Con la finalidad de mejorar la digestión anaeróbica se puede hacer uso de recursos biológicos tales como células (cepas o consorcios), enzimas o inclusive substratos para adicionarlos a un proceso de digestión y así mejorarlo. En el caso de materiales con alto contenido de lignina se puede hacer un pre tratamiento usando cultivos fúngicos que tengan la capacidad de degradar esta materia de esta manera se facilita la hidrólisis en la digestión anaeróbica. A continuación se hace una breve revisión de otros tres métodos biológicos destinados a mejorar la digestión anaeróbica.

2.6.1 Adición de enzimas

La adición de enzimas a un cultivo anaeróbico tiene como finalidad aumentar la cantidad de materia hidrolizada. Enzimas tales como celulasas, proteasas, lipasas son las



principales encargadas de la hidrólisis y se las puede encontrar como preparados enzimáticos comerciales. Los factores que determinarán una buena acción enzimática son principalmente los relacionados con el tipo de sustrato así por ejemplo el grado de cristalinidad de la celulosa, cantidad y distribución de la lignina determinan cuán accesible es el sustrato a la acción enzimática (Mansfield SH. et al., 1999). En procesos industriales es ideal tener tratamientos de gran versatilidad y que duren muy corto tiempo, horas o días, pero hasta el momento no se conoce de preparado enzimático de tales características. Para mejorar procesos enzimáticos pueden hacerse combinaciones con tratamientos químicos y/o físicos.

Los procesos industriales por lo general requieren grandes cantidades de preparados enzimáticos. El principal problema es el alto costo de producción y mientras más puro es un preparado enzimático más alto es su costo de producción. Mediante la ingeniería genética se pretende mejorar la producción de enzimas.

2.6.2 Bioaumentación

Otra estrategia biológica es el uso de organismos enteros para aumentarlos a un cultivo conocido. No hay mucha investigación al respecto y puede deberse a que es difícil que un cultivo no nativo compita por los nutrientes o interactúe con microorganismos nativos (Gurgo D. 2006). En experimentos de digestión anaeróbica se aumentó una cepa lipolítica (*Clostridium lundense*, DSM 17049) mostrando resultados benéficos en la producción de metano (Gurgo D. et al., 2006).

2.6.3 Codigestión

En algunas circunstancias puede darse el caso que algún tipo de material de desecho es escaso y podría ocasionar que el proceso se detenga por falta de materia prima, ante estas circunstancias existe la posibilidad de hacer una mezcla utilizando otro tipo de residuo, esto es hacer una codigestión. La codigestión es el proceso mediante el cual se somete a



digestión anaeróbica una mezcla de dos o más residuos de desecho (Ken Krich et al., 2005). Puede existir un sinergismo entre los diferentes substratos ocasionando mayor productividad o puede uno de ellos controlar la generación de algún subproducto tóxico neutralizándolo. Es importante considerar el equilibrio C:N para no ocasionar un desequilibrio en el sistema, también la dinámica de la población microbiana, su composición y metabolismo puede ser afectado por los diferentes substratos añadidos (Stroot PG. et al., 2000).

2.7 Condiciones de cultivo

A continuación se hace una breve revisión a los parámetros más importantes a considerarse al trabajar con cultivos microbianos en condiciones laboratoriales.

2.7.1 Influencia del pH

Los cultivos anaeróbicos son igualmente afectados por variaciones en el pH, ya que la asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas, síntesis de metabolitos primarios y secundarios depende de cuan ácido o alcalino sea el medio. Los microorganismos metangénicos y los acetotróficos tienen metabolismo óptimo a valores de pH de 6.5 hasta 7.5 mientras que los hidrolíticos y acidogénicos tienen un rango mayor que va desde 5 hasta 7. La principal sustancia con capacidad de tamponamiento es el bicarbonato debido a la generación de dióxido de carbono y su parcial solubilidad en agua. Otros compuestos involucrados en la capacidad de tamponamiento son el bifosfato y el sulfuro aunque tienen mucha menor influencia que el sistema bicarbonato. La composición del medio es también determinante para el pH, así un medio rico en carbohidratos beneficia a la acidificación del medio, mientras que un medio rico en compuestos nitrogenados tiene el efecto contrario, esto debido a la formación de amoníaco.



2.7.2 Influencia de la temperatura

Usualmente la temperatura de cultivo en procesos de digestión anaeróbica es de 25 °C a 40 °C para cultivos mesofílicos y temperaturas mayores a 45 °C para cultivos termófilos. El incremento en la temperatura es beneficioso pues propiedades físicas como la tensión superficial, transferencia de masa y viscosidad son afectadas de manera positiva para el consumo de nutrientes por parte de los microorganismos. Dependiendo del tipo de microorganismos el incremento de la temperatura puede o no ser benéfico ya que microorganismos aclimatados a temperaturas ambientales pueden morir en condiciones térmicas altas principalmente debido a la desnaturalización de las proteínas.

También existe la posibilidad de llevar adelante la digestión anaeróbica en condiciones psicofílicas, esto es a temperatura menores a 20 °C. La degradación de la materia orgánica es bastante lenta y depende de cuan soluble sea el substrato. Estudios de aclimatación de consorcios mesofílicos a condiciones psicofílicas mostraron que se encontraban las mismas comunidades microbianas (Nyns. 1986). Esto muestra que más que consorcios psicofílicos son consorcios mesofílicos psicotolerantes.

2.7.3 Nutrientes

En la digestión anaeróbica se requiere que los microorganismos estén metabólicamente activos y para tal efecto se requiere que el medio contenga nutrientes complejos como macromoléculas al igual que micronutrientes. Es importante considerar las fuentes de carbono y nitrógeno ya que un desequilibrio de estas conlleva una inhibición en el metabolismo bacteriano. Una relación recomendable en términos de demanda química de oxígeno para el carbono (Chemical Oxygen Demand en inglés), nitrógeno N y fósforo P es COD:N:P 100:5:1 para cultivos anaeróbicos (Hulshoff P. 1998). La importancia de



los micronutrientes radica en que muchos de ellos son co-factores enzimáticos y su presencia es esencial para el buen funcionamiento de ciertas enzimas.

2.7.4 Toxicidad

Los microorganismos anaerobios no son menos sensibles a sustancias tóxicas que los microorganismos aerobios (Blum and Speece. 1991). Un desequilibrio en el flujo de productos y sustratos entre los diferentes tipos de microorganismos (hidrolíticos, acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos) suele conducir a que las condiciones del cultivo se desequilibren y como consecuencia se da la acumulación de alguno de los productos que a altas concentraciones resulta tóxico. El factor más común de toxicidad es la acumulación de ácidos grasos volátiles, lo que ocasiona un descenso en el pH inhibiendo el metabolismo de los propios microorganismos adicogénicos.



Capítulo V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar estrategias biológicas para optimizar el proceso hidrolítico anaerobio de desechos orgánicos complejos en la producción de biogás.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido.
2. Aislar, cultivar y activar consorcios microbianos anaerobios hidrolíticos.
3. Establecer las condiciones del proceso hidrolítico a través del análisis de la producción de AGVs y la alcalinidad del medio en función al consorcio, substrato y temperatura de incubación.
4. Determinar el efecto de la proporción de desecho orgánico complejo y consorcio hidrolítico sobre la producción de ácidos grasos volátiles, con la finalidad de determinar la condición adecuada de saturación de substrato.
5. Estudiar condiciones de codigestión de substratos utilizando cascarilla de arroz y basura vegetal mezclados en diferentes proporciones.
6. Activar y cultivar consorcios metanogénicos.
7. Optimizar condiciones del cultivo metanogénico.



Capítulo VI. METODOLOGÍA

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el establecimiento de los procesos de digestión anaeróbica y metanogénesis, se utilizaron Desechos Orgánicos Complejos (DOC) y diferentes consorcios microbianos ambientales. Los DOC fueron evaluados mediante pre tratamiento químico y subsecuente evaluación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) con la finalidad de establecer la cantidad relativa de material lignocelulósico en cada DOC, además de la determinación de la actividad enzimática como parámetro de verificación del proceso hidrolítico.

A lo largo del trabajo se realizaron análisis tales como determinación de pH, demanda química de oxígeno (DQO), determinación de ácidos grasos volátiles (AGVs), y de las actividades enzimáticas pectinasas, carboximetil celulasas, xilanasas, amilasas y proteasas. Los AGVs obtenidos en la digestión anaeróbica fueron usados como fuente de carbono para los consorcios metanogénicos, cuya producción de metano se evaluó cuantitativamente mediante cromatografía de gases.

1.1 Material Biológico

El material biológico estuvo constituido por DOC que fueron substratos de los consorcios hidrolíticos y consorcios microbianos ambientales de tipo hidrolítico y metanogénico.

1.1.1 Substratos

En la región de los Yungas del departamento de La Paz existe bastante producción agrícola y los residuos de estos productos constituyen el principal DOC generado en la región. El campamento O.S.C.A.R. que está ubicado en dicha región cuenta con contenedores y dos botaderos bien clasificados para basura orgánica e inorgánica (Fig.



1), que permite la clasificación de la basura generada. De igual manera, se cuenta con una carpintería que genera aserrín como desecho biodegradable, y por último, y como recurso alternativo, se puede tener acceso a los desechos de peladoras industriales de arroz en la población cercana de Caranavi.



Figura 1. Contenedores y botaderos de basura correctamente clasificados en el campamento O.S.C.A.R.

De esta manera se tiene basura vegetal (BV), cascarilla de arroz (CA) y aserrín (AS) como substratos crudos. Todos estos materiales son susceptibles de hidrólisis mediante



un proceso de digestión anaeróbica y dependiendo de la cantidad de lignina que tengan, su hidrólisis será mayor o menor (IEA BIOENERGY, July 2001)

Basura Vegetal (BV)

Se colectaron muestras de frutas y verduras en descomposición. Las muestras fueron colectadas en bolsas estériles y conservadas así hasta su procesamiento en el laboratorio.

Cascarilla de Arroz (CA)

La cascarilla de arroz fue colectada directamente de las peladoras industriales de la localidad de Caranavi. Se conservaron en bolsas plásticas y bien secas hasta su uso en el laboratorio.

Aserrín (AS)

El aserrín fue colectado en la carpintería del campamento O.S.C.A.R y conservado en bolsas plásticas estériles hasta su uso en el laboratorio.

1.1.2 Consorcios microbianos

Se utilizaron seis consorcios microbianos con la finalidad de reproducir las condiciones ambientales en las que los DOC son degradados en la naturaleza. Tres de ellos estuvieron exclusivamente dirigidos al proceso hidrolítico y los tres restantes al proceso metanogénico.



1.1.2.1 Consorcios hidrolíticos

Aquellos consorcios que tienen capacidad de adaptación a un hábitat en el que su medio es rico en material lignocelulósico son los ideales para la digestión anaeróbica. Es así que se utilizaron tres consorcios provenientes de diferentes regiones pero con similares condiciones nutricionales, es decir que todos ellos estuvieron en contacto con material lignocelulósico en su nicho ecológico. Todos ellos fueron conservados en el laboratorio a 4 °C de temperatura hasta su uso en cultivos anaerobios.

Consorcio ISA

El consorcio ISA lleva su nombre en reconocimiento a la investigadora que tomó la muestra (Isabel Moreno). La muestra fue tomada de una planta de tratamiento de café en la localidad de los Yungas del departamento de La Paz y fue conservada en frascos plásticos a -4 °C previamente a ser utilizada en el presente estudio.

Consorcio TACANA

El consorcio TACANA fue colectado de un pantano en las cercanías de la región habitada por la comunidad Tacana localizada en Alto Beni. Este consorcio estuvo en estudio en el laboratorio por aproximadamente un año, previo a la realización del presente trabajo.

Consorcio OSCAR

El consorcio OSCAR fue colectado del botadero de desechos orgánicos del campamento O.S.C.A.R. Se tomaron diferentes porciones de desechos orgánicos consistentes en frutas y verduras en descomposición, las mismas que fueron conservadas en bolsas plásticas a temperatura ambiente y llevadas al laboratorio en un periodo no mayor a 24 h.



1.1.2.2. Consorcios metanogénicos

Los consorcios metanogénicos del presente trabajo fueron colectados de hábitats naturales y conservados en el laboratorio en condiciones de cultivo a temperatura ambiente (20 °C). Esto con la finalidad de mantener un desarrollo microbiano más bien moderado.

Consortio PIG

El consorcio PIG fue colectado en bolsas plásticas estériles a partir de las heces fecales del criadero de chanchos del propio campamento O.S.C.A.R. (Fig. 2).



Figura 2. Heces de cerdo (cuadro izquierdo) del criadero de cerdos del Campamento.



Consortio LLAMA

El consorcio LLAMA estuvo constituido por heces de llamas que fueron colectadas en bolsas plásticas estériles del hábitat natural de estos animales en las cercanías de la localidad de Sajama en el departamento de Oruro.

Consortio LIXIVIADO DE MALLASA

El consorcio LIXIVIADO DE MALLASA corresponde a una muestra colectada en el botadero municipal de la zona de Mallasa, mismo que solía ser el botadero oficial de toda la ciudad de La Paz. Este consorcio fue tomado del mismo laboratorio pues ya llevaba algún tiempo siendo estudiado por otros investigadores en el área.

2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

2.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La estimación de la demanda química de oxígeno se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Standards & methods (APHA, 1997).

2.2 Determinación de la producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)

Se tomaron 20 mL del fermento (VS) producido luego de la incubación de los consorcios en el medio de cultivo para ser titulada mediante el método de titulación en tres puntos (Buchauer K. 1998). Se procedió midiendo el pH inicial que es el equivalente a la alcalinidad medida (Alk_{meas}) se ajustó el pH a 5 con ácido sulfúrico 1 N (N) o con hidróxido de sodio 1 N (N) según el caso, para luego medir la cantidad de ácido sulfúrico 1N (N) requerida para llegar a un pH de 4.3 y luego a uno de 4.0, este último valor



constituye el volumen de ácido añadido ($VA_{5-4 \text{ meas}}$). Los datos obtenidos de acuerdo a este procedimiento fueron utilizados en el cálculo del valor S_a equivalente a la cantidad total de ácidos grasos volátiles considerados como ácido acético (Buchauer K. 1998), de acuerdo a la relación que se muestra a continuación:

$$S_a = 131340 * N * VA_{5-4 \text{ meas}} / VS - 3.08 * Alk_{\text{meas}} - 25$$

Los 20 mL de muestra mencionados en el párrafo anterior fueron tomados del sobrenadante de 30 mL de muestra centrifugada a 4000 rpm durante 15 min en cada caso, esto debido a que la muestra tomada directamente de cada cultivo presentaba bastante materia en suspensión, misma que podría haber interferido en la valoración subsecuente.

2.3 Determinación de la actividad enzimática

En el presente trabajo se evaluaron cuatro actividades de exoenzimas que actúan sobre polisacáridos y sobre proteínas. La actividad de enzimas involucradas en la hidrólisis de celulosa, almidón, hemicelulosa y pectina fue determinada mediante la medición de azúcares reductores como producto de la hidrólisis enzimática a través de la técnica modificada de la reducción del ácido 3,5 di nitro salicílico (DNS) (Miller, 1959). Soluciones de glucosa, xilosa y ácido galacturónico fueron utilizadas como estándares, respectivamente.

La actividad endocelulasa fue determinada a 50 °C usando como sustrato carboximetil celulosa (CMC) al 0.2 % en buffer citrato 50 mM pH 4.8. Xilano obtenido de avena (SIGMA) fue utilizado al 0.2 % en buffer fosfato 200 mM pH 6 para la determinación de la actividad endoxilanasas a 50 °C. Pectina de manzana al 0.1 % en buffer acetato 100 mM pH 5.5 fue utilizado para la determinación de la actividad pectinolítica a 50 °C. Por



último, la actividad amilolítica fue establecida a 50 °C usando como substrato almidón al 0.2 % en buffer acetato 50 mM pH 6.

Un mililitro de muestra previamente filtrado con filtro Millipore de 0.45 μ m (proveniente de los 30 mL centrifugados utilizados para la determinación de AGVs) y conservado a 0 °C mediante el uso de baño de hielo para evitar la inactivación de las enzimas existentes en dicho volumen de muestra, fue distribuido en tubo control y tubo test de acuerdo al esquema que se muestra a continuación:

Componentes	Tubo Blanco	Tubo Control	Tubo test
Muestra	-	-	50 μ l
Substrato en buffer	450 μ l	450 μ l	450 μ l
Agua	50 μ l	-	-
TOTAL	500 μl	450 μl	500 μl

Se procedió a incubar a 50 °C por 60 min. Posteriormente se procedió de acuerdo al siguiente esquema:



	Tubo Blanco	Tubo Control	Tubo test
Componentes			
Muestra	-	50 μ l	-
Solución de DNS	750 μ l	750 μ l	750 μ l
TOTAL	1250 μ l	1250 μ l	1250 μ l

Finalmente, los tubos se incubaron a 90 °C por 5 min y las absorbancias fueron leídas a 540 nm contra blanco reactivo. La determinación del valor de absorbancia real se obtuvo por simple substracción de los valores de los tubos test menos los tubos control en cada muestra. Por último, los resultados fueron expresados en Unidades Internacionales (UI) de actividad enzimática la cual es definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un μ mol/min de azúcar reductor expresado como equivalentes de glucosa o xilosa o ácido galacturónico.

La actividad proteolítica fue determinada a partir de la mezcla de un volumen de muestra (previamente centrifugada y filtrada) con un volumen de solución de azocaseína al 0.5 % (precalentada en buffer TRIS-HCl 100 mM pH 7.4) e incubada a 50 °C por 1 hora. La reacción fue detenida añadiendo 2 volúmenes de ácido tri cloro acético al 10%. Finalmente la mezcla-reacción fue centrifugada a 3000 g por 10 min y la absorbancia medida a 380 nm (Kole MM et al., 1988). Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en una curva de calibración que refiere las unidades internacionales (UI) de papaína (ANEXO A) mismas que se encuentran definidas en el producto comercial como 17 UI/mg (Papaína de papaya SIGMA, código 125K7675).



2.4 Determinación de metano por cromatografía de gases

La composición del llamado biogás es principalmente metano y dióxido de carbono. Al ser estos dos compuestos volátiles a temperatura ambiente se prescinde de algún tratamiento de la muestra gaseosa para pasarla por un cromatógrafo de gases. La evaluación de metano se realizó inyectando 10 μL de muestra gaseosa tomados con jeringa directamente de la fase aérea de los cultivos metanogénicos. La curva de calibración fue determinada a partir de diluciones gaseosas de una muestra de gas metano (de distribución domiciliar). La concentración de metano determinada fue relacionada a porcentaje según curva patron (ANEXO A).

El cromatógrafo de gases empleado fue un cromatógrafo Perkin Elmer modelo CLARUS 500. A continuación se indican las condiciones para la determinación de metano:

Columna: Elite-1-30 m x 0.53 mm x 3.0 μm , Part # N9316051, Serial # 501641

Detector: FID a 250 °C

Inyector: 200 °C

Horno: 80 °C

Gas portador: H_2

Tiempo de corrida: 5 minutos

Tiempo de retención: 1.518 minutos

2.5 Determinación de la alcalinidad - pH

Las mediciones de pH se realizaron con un equipo portátil, pHmetro ORION, modelo 420 A.



3 DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Determinación de la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido

La complejidad estructural de los DOC hace que su hidrólisis enzimática no sea del todo eficiente. El ácido sulfúrico al ser un ácido fuerte y no poseer selectividad tiene una marcada capacidad de hidrólisis sobre sustratos como los del presente estudio. El producto de esta hidrólisis ácida puede ser medido en términos de su demanda química de oxígeno (DQO). El valor obtenido representará la cantidad de materia susceptible de hidrólisis. Para tal propósito se realizó una desecación y homogeneización de la BV previamente al pre tratamiento ácido como tal y por último un cálculo de la cantidad de DOC necesario en el medio de cultivo mediante una homologación de los valores de DQO con el equivalente de glucosa en el medio de cultivo

Desecación y homogeneización de la basura vegetal

Con la finalidad de tener partículas de aproximadamente el mismo tamaño toda la basura vegetal fue homogeneizada mediante una licuadora. Para este fin se añadió agua en cantidad suficiente para facilitar la particularización de la BV y así optimizar el proceso, luego de lo cual se procedió a secar todo el molido en estufa a 60 °C, temperatura a la cual no crecen microorganismos mesófilos ambientales y tampoco se desnaturalizan proteínas ni se altera la estructura de las vitaminas.

Pre tratamiento ácido

Se trató cada material con ácido sulfúrico para determinar la cantidad de materia orgánica susceptible de hidrólisis. Se prepararon soluciones al 10% (p/v) de los diferentes

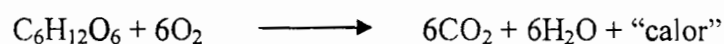


substratos en ácido sulfúrico al 2% (p/v) en botellas de boro silicato herméticamente cerradas y tratadas térmicamente a 121°C en autoclave por 90 min con la finalidad de determinar el contenido relativo de lignina en los tres substratos (Silverstein R, 2004). Luego de enfriamiento a temperatura ambiente se determina la DQO para cada caso. Los DOC ricos en lignina muestran valores de DQO menores a aquellos que presentan menor proporción de este polímero (Silverstein R, 2004). De esta manera los DOC pueden ser seleccionados en función a su contenido relativo de lignina.

Homologación de los valores de DQO con el equivalente de glucosa en el medio de cultivo

Una determinada cantidad de glucosa al igual que otros compuestos orgánicos es susceptible de oxidación mediante la técnica DQO. Tomando 6 g/L de glucosa como parámetro teórico, tal como se encuentra en el medio comercial “Anaeróbico Fluido” (SCHARIAU. Ref. 03-008), medio en el que los consorcios mostraron buen crecimiento, se hizo una analogía estequiométrica como se explica a continuación:

Un mol de glucosa requiere de 192 g (6 mol) de oxígeno molecular para una combustión total hasta dióxido de carbono, agua y calor.



Se puede fácilmente deducir que 6 g de glucosa serán oxidados por 6.4 g de oxígeno molecular. Entonces, si un valor de DQO es de 6400 (6400 mgO₂/L) en una muestra real equivaldría idealmente a seis gramos de glucosa. De esta forma luego de evaluar los substratos los valores obtenidos de DQO fueron homologados con el valor teórico de 6 gramos de glucosa (6.4 g de O₂ por litro de solución). Por ejemplo la fracción acuosa del pre tratamiento ácido de BV (7 g BV en 70 mL de H₂SO₄ (2%), solución al 10 %) tiene



un valor DQO de 44.6 g O₂/L. El valor de DQO es referido a un litro, así es que para 70 mL el cálculo mediante factor unitario será el siguiente:

$$\begin{aligned} ? \text{ g O}_2 &= 70 \text{ mL} * 44.6 \text{ g O}_2 / 1000 \text{ mL} \\ &= 3.12 \text{ g O}_2 \text{ (requeridos por los 70 mL)} \end{aligned}$$

Por lo que se puede afirmar que 7 g de BV requirieron de 3.12 g O₂ para oxidarse en una solución al 10%. Ahora bien, ¿Cuántos gramos de DOC serán necesarios para obtener un DQO de 6.4 g O₂? (recuerde que este valor es el que producirían 6 g de glucosa).

$$\begin{aligned} ? \text{ g BV} &= 6.4 \text{ g O}_2 * 7 \text{ g BV} / 44.6 \text{ g O}_2 \\ &= 1 \text{ g BV (en 70 mL)} \end{aligned}$$

Expresando 1 g de BV en 70 mL de solución en términos de porcentaje se tiene: 1 g / 70 mL * 100 = 1,43 % (p/v) que en la práctica representa la concentración de BV que se debe preparar para tener una solución que equivaldría idealmente a una de 6 g de glucosa por litro.

3.2 Aislamiento, cultivo y activación de los consorcios hidrolíticos

Los consorcios hidrolíticos fueron aislados de sus hábitats naturales tomando muestras en bolsas plásticas y conservándolos en el laboratorio para su posterior cultivo. Se utilizaron botellas de 100 y 120 mL con medio de cultivo basal (ANEXO B) a las cuales se les añadió DOC al 5 % y por último se saturaron con gas nitrógeno libre de oxígeno para generar un ambiente anaerobio para luego ser esterilizadas en autoclave. Luego de ser esterilizadas fueron enfriadas hasta temperatura ambiente y se añadió tioglicolato de



sodio estéril a cada medio a una concentración final de 0.2 % (p/v) como agente reductor del potencial redox del medio. Cada consorcio fue inoculado al 10 % y los cultivos fueron incubados en estufa a 30 ° C por 1 a 2 semanas. Por último se determinaron las actividades celulolíticas y xilanolíticas de los cultivos para constatar la activación de los consorcios hidrolíticos, es decir constatar que se encuentran viables, cultivables y aptos para utilizar la materia que se les da como nutrientes.

3.3 Determinación del efecto de la temperatura de incubación y del tipo de DOC y consorcio microbiano en la producción de AGVs, y en la alcalinidad del medio

Se estableció un diseño experimental de 3x2x2 (12 experimentos) basados en los tres consorcios hidrolíticos (ISA, TACANA y OSCAR), dos temperaturas (28 y 37 °C) y dos tipos de DOC (BV y CA). Se preparó medio de cultivo basal (ANEXO B) con DOC en concentraciones equivalentes a 6 g de glucosa por litro (según valores homólogos de DQO) en viales de 100 mL saturando de nitrógeno molecular libre de oxígeno y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min. Luego de enfriar a temperatura ambiente se añadió a cada vial tioglicolato de sodio (0.2 % concentración final) y solución de vitaminas (apéndice B) para finalmente inocular el consorcio correspondiente al 10 %. Por último se determinó la cantidad acumulada de AGVs luego de un mes de incubación.

3.4 Determinación del efecto de la proporción de los DOC

Se estableció un diseño factorial completo 3^3 (27 experimentos), donde los tres consorcios se cultivaron en tres proporciones diferentes (1/3X, 1X y 3X) de DOC. Los consorcios fueron inoculados al 10 % de forma separada. Estas proporciones fueron preparadas en 80 mL de medio basal (ANEXO B) en viales de 100 mL. Los medios así preparados fueron saturados con nitrógeno gaseoso libre de oxígeno para asegurar la calidad anaeróbica de



los mismos, posteriormente esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min. Luego de enfriamiento se añadió tioglicolato de sodio a cada vial a una concentración final de 0.2 % (p/v) y solución de vitaminas (ANEXO B) y finalmente incubados a 37 °C por el lapso de un mes. Se tomaron muestras cada dos días aproximadamente y se determinaron AGVs, DQO y pH. Los datos de AGVs se utilizaron en la determinación de cinéticas de producción y cálculo de la productividad volumétrica (Qv).

3.5 Ensayo de codigestión.

El uso de aditivos orgánicos como ser residuos de cereales y otros similares tiene el potencial de mejorar la capacidad de producción de AGVs (Yadvika et al, 2004). La cascarilla de arroz o la basura vegetal puede ser utilizada con tal fin. Se realizaron mezclas de CA con BV teniendo el siguiente espectro de proporciones:

Experimento	Proporción de CA	Proporción de BV
1	4/5	1/5
2	3/4	1/4
3	2/3	1/3
4	1/2	1/2
5	1/3	2/3
6	1/4	3/4
7	1/5	4/5

Todas estas fracciones expresadas en términos de DQO referido al valor de glucosa en el medio.



3.6 Activación de los consorcios metanogénicos

Los consorcios metanogénicos fueron cultivados en medio para anaerobios (ANEXO B) a 37 °C utilizando una mezcla preparada de AGVs como fuente de carbono. La actividad de los consorcios metanogénicos fue confirmada en función a su producción de metano, determinada por cromatografía de gases.

3.7 Optimización del cultivo metanogénico

Se estableció un diseño factorial 3^3 , con 3 concentraciones de AGVs (0.5, 1 y 2 mg/mL) y los tres consorcios metanogénicos descritos previamente. El medio de cultivo utilizado fue el descrito en el ANEXO B.



ítulo VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación de la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido

La cantidad de materia susceptible de hidrólisis en cada uno de los DOC se diferenció claramente en función a la cantidad relativa de lignina (Silverstein R, 2004). Los valores de la DQO se refirieron en porcentaje relativo al equivalente de 6 g de glucosa por litro de medio (Tabla 1).

Tabla 1. Pre tratamiento de DOC crudo para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y porcentaje de material requerido equivalente a 6 g de glucosa por litro de solución.

Material crudo	DQO (mg O ₂ /L)	% DOC en el medio de cultivo.
Cascarilla de arroz (CA)	1.42*10 ⁴	4.5
Aserrín (AS)	2.41*10 ³	18.6
Basura Vegetal (BV)	4.46*10 ⁴	1.5

Los valores obtenidos fueron claramente representativos del contenido de lignina de cada uno de estos materiales. Es así que los valores de BV y CA fueron menores al de AS, evidenciando el alto contenido de lignina de este último. Para preparar un medio de cultivo equivalente a 6 g de glucosa por litro, se requerirían 18.6 g de AS por cada 100 mL, esto significaría un medio sobresaturado, Se podría pensar en reducir el tamaño de



las partículas de aserrín ya que un tamaño menor favorece su hidrólisis (Cullis IF et al., 2004) pero esto implicaría un paso extra que no serviría de mucho ante la existencia de los otros dos materiales que no requieren ser reducidos en tamaño.

Es así que, debido a la alta concentración requerida para preparar los medios de cultivo con AS, a la naturaleza recalcitrante de la lignina (especialmente en procesos anaeróbicos) y por último a la mejor digestibilidad de materiales más ricos en hemicelulosa que en lignocelulosa como la CA y BV, se prescindió del AS en todos los experimentos subsecuentes.

. Aislamiento, cultivo y activación de consorcios anaerobios hidrolíticos

2.1 Determinación del proceso hidrolítico a través de la actividad enzimática.

La Tabla 2 detalla las máximas actividades celulolítica y xilanolítica obtenidas cuando los consorcios OSCAR, TACANA e ISA fueron inoculados en medio de cultivo mínimo con CA y BV.

La máxima actividad celulolítica observada fue de 55 UI/L cuando el consorcio OSCAR creció en el medio con CA. Las máximas actividades xilanolíticas fueron obtenidas cuando el consorcio ISA creció en medio con CA (137 UI/L) y el consorcio TACANA creció en medio con BV (83 UI/L).



Tabla 2. Actividad celulolítica y xilanolítica de tres consorcios microbianos: OSCAR, TACANA e ISA utilizando dos sustratos crudos susceptibles de hidrólisis: CA y BV.

OSCAR		
SUBSTRATO	ACT. CELULOLITICA (UI/L)	ACT. XILANOLITICA (UI/L)
CA	55	56
BV	44	67

TACANA		
SUBSTRATO	ACT. CELULOLITICA (UI/L)	ACT. XILANOLITICA (UI/L)
CA	47	62
BV	46	83

ISA		
SUBSTRATO	ACT. CELULOLITICA (UI/L)	ACT. XILANOLITICA (UI/L)
CA	46	137
BV	46	79

De esta manera se confirmó la actividad celulolítica y xilanolítica de los tres consorcios en los sustratos crudos BV y CA, con lo que se pudo afirmar que tienen la capacidad de utilizar estos materiales como sustratos.



3. Establecimiento de las condiciones del proceso hidrolítico a través del análisis de la producción de AGVs y la alcalinidad del medio en función al consorcio, substrato y temperatura de incubación.

Análisis de la producción final de AGVs

Se compararon las concentraciones finales de AGVs producidos en función al consorcio, substrato y la temperatura. Los mayores valores de AGVs fueron aquellos en los que el substrato fue BV, sin gran influencia por parte del consorcio ni de la temperatura (Tabla 3). Las condiciones de cultivo pueden influir de manera significativa la maquinaria enzimática y metabólica de los microorganismos que actúan en la digestión anaeróbica (Khalil A. I., 2001) y los resultados aquí presentados muestran variaciones en la producción de AGVs debidas a diferentes condiciones de cultivo.

El análisis por regresión múltiple (ANEXO C) demostró una influencia altamente significativa de la variable substrato ($p \leq 0.00024$) sobre las variables temperatura y tipo de consorcio. Los cultivos con BV produjeron una mayor concentración final de AGVs comparados con las concentraciones obtenidas en los medios de cultivo con CA.



Tabla 3. Diseño experimental que relaciona el tipo de consorcio, sustrato y temperatura para la optimización de la producción de AGV.

Experimento	Condiciones químicas y físicas de cultivo				Resultados
	consorcio	sustrato	temperatura	pH	AGVs máx. (mg/L)
1	ISA	CA	37	6.09	2170
2	ISA	CA	28	6.82	1500
3	ISA	BV	37	4.91	3650
4	ISA	BV	28	4.94	3550
5	TACANA	CA	37	6.43	1980
6	TACANA	CA	28	6.64	1620
7	TACANA	BV	37	4.8	4040
8	TACANA	BV	28	4.92	3920
9	OSCAR	CA	37	7.12	534
10	OSCAR	CA	28	6.84	1180
11	OSCAR	BV	37	4.73	4380
12	OSCAR	BV	28	4.93	3680

La Figura 1 muestra la concentración final de AGVs obtenida en función a la interacción del consorcio con el sustrato. Se puede evidenciar que la diferencia entre los valores de



las concentraciones de AGVs finales, referidos a las temperaturas de incubación (representado por esferas en la Fig. 1), fueron mínimas en los cultivos con BV ya sea inoculados con el consorcio TACANA (4040 mg/L y 3920 mg/L a 37 y 28 °C respectivamente, Tabla 3) o inoculados con el consorcio ISA (3650 mg/L y 3550 mg/L a 37 y 28 °C respectivamente, Tabla 3) a diferencia de los cultivos inoculados con el consorcio OSCAR (4380 mg/L y 3680 mg/L a 37 y 28 °C respectivamente, Tabla 3).

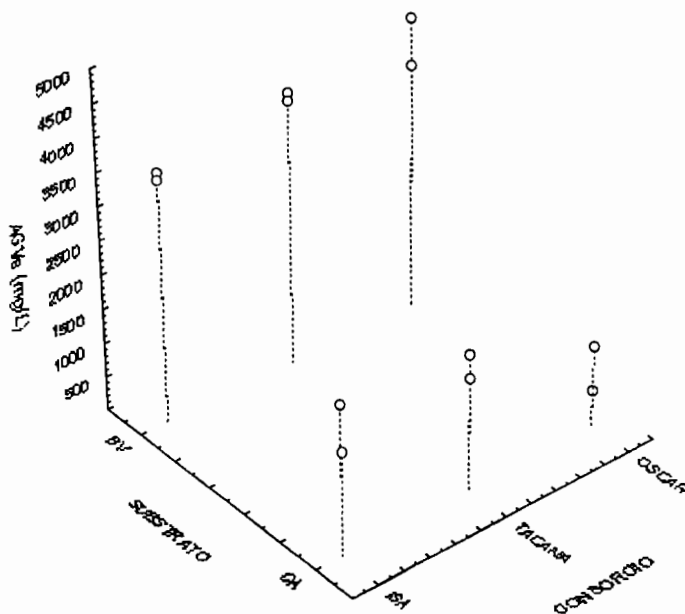


Figura 1. Producción de AGVs en función de sustrato y consorcio.

Por otro lado, en los consorcios cultivados en CA se observó una mayor diferencia en los valores de AGVs finales. Cuando el consorcio ISA fue inoculado, valores de 2170 mg/L y 1500 mg/L, a 37 y 28 °C respectivamente, fueron obtenidos (Tabla 3), mientras que los



cultivos con el consorcio TACANA mostraron valores de 1980 mg/L y 1620 mg/L a 37 y 28 °C respectivamente (Tabla 3), finalmente los cultivos con el consorcio OSCAR mostraron valores de 534 mg/L y 1180 mg/L, a 37 y 28 °C respectivamente, (Tabla 3).

Es importante recalcar que el consorcio OSCAR produjo menor cantidad de AGVs finales comparado con los consorcios TACANA e ISA. Esto podría deberse al contenido de la CA que además de tener principalmente celulosa en su composición, también tiene un alto contenido de lignina, y un peculiar contenido alto de cenizas, lo que la hace particular entre los residuos lignocelulósicos (Yañez R. et al., 2006).

Pese a las diferencias mencionadas en la producción final de AGVs se puede afirmar sin lugar a dudas que la variable determinante entre sustrato y consorcio fue la variable sustrato

En la Figura 2 se comparan las producciones finales de AGVs como función de la temperatura y el sustrato. Entre las dos variables se observa claramente que la variable determinante fue el sustrato. La BV permitió la producción final más alta de AGVs y su diferencia con los valores obtenidos con CA es por demás evidente. Mientras que la diferencia de estos valores debida a la variable temperatura es mucho menos evidente. La idea de mantener la temperatura moderadamente baja podría ser beneficiosa si se considera que el mal olor generado en la digestión anaeróbica puede ser mejor controlado además de la evidencia que a 20 °C puede existir una mejor producción de metano que a 37 °C (Ndegwa P. M. et al., 2008), esto en el caso de un proceso metanogénico inmerso en la hidrólisis.

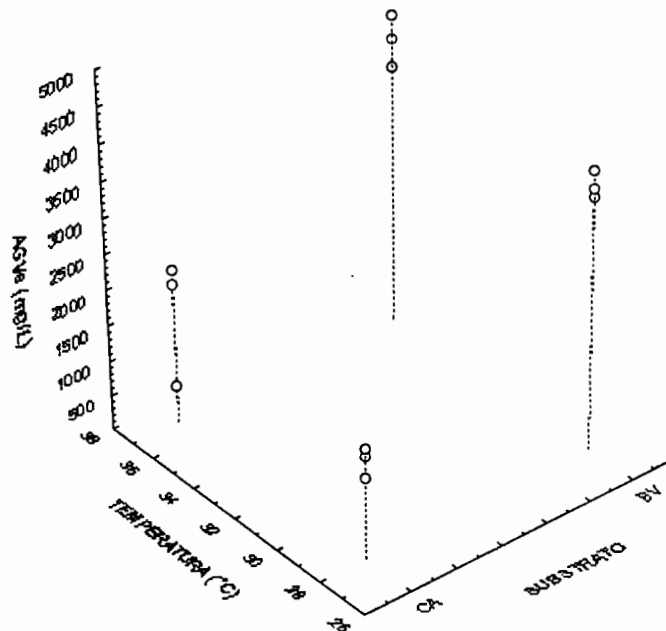


Figura 2. Producción de AGVs en función a la temperatura y sustrato.

Por otro lado se puede ver claramente que no todos los consorcios produjeron los AGVs finales de manera homogénea (esferas, Fig. 2) especialmente a 37 °C con CA donde el consorcio OSCAR produjo solo 534 mg/L (Tabla 3), cantidad muy baja comparada con los otros dos consorcios (ISA con 2170 mg/L y TACANA con 1980 mg/L, Tabla 3), mientras que con BV y a 28 °C los tres consorcios fueron más o menos iguales en su producción final (ISA con 3550 mg/L, TACANA con 3920 mg/L y OSCAR con 3680 mg/L).



Análisis de la alcalinidad

Es importante que el pH final de cada cultivo no disminuya demasiado para la posterior utilización de los AGVs en el proceso metanogénico. Los AGVs pasaran a ser metabolizados por los consorcios metanogénicos y ante un medio con pH bajo la metanogénesis puede ser inhibida, inclusive si el consorcio es adaptado a valores bajos de pH, los rendimientos decaen (Jain S R et al., 1998). En el presente estudio y de acuerdo al análisis de regresión múltiple, el sustrato BV es altamente significativo ($p < 0.00001$) en cuanto se refiere al pH final del medio de cultivo (ANEXO C), siendo este valor muy bajo en comparación con los pH obtenidos en los cultivos con CA.

La Figura 3 muestra los valores de pH final como función de los consorcios y los sustratos.

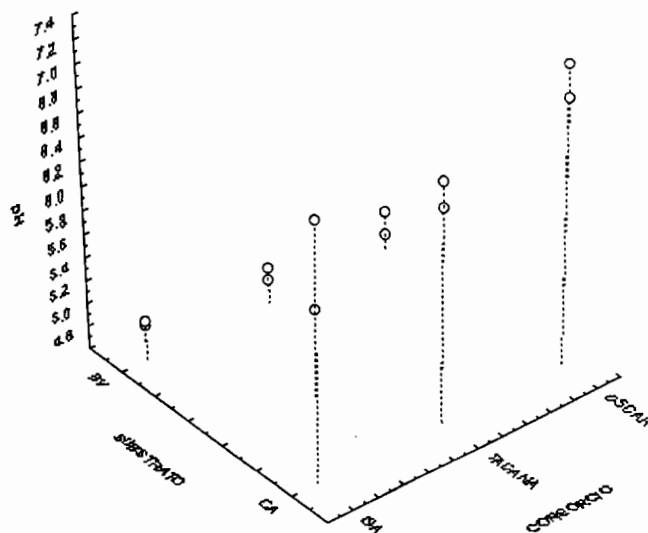


Figura 3. Alcalinidad en función al tipo al consorcio y al sustrato.



En todos los cultivos realizados con BV como sustrato se obtuvieron valores de pH por debajo de 5, y con los cultivos realizados con CA los valores de pH se mantuvieron por encima de seis. Por otro lado se puede observar que los valores de pH final de los consorcios (esferas, Fig. 3) mostraron bastante similitud en los cultivos establecidos con BV, ISA (pH de 4.91 y 4.94 a 37 °C y 28 °C respectivamente, Tabla 3), OSCAR (pH de 4.8 y 4.92 a 37 °C y 28 °C respectivamente, Tabla 3) y TACANA (pH de 4.73 y 4.93 a 37 °C y 28 °C respectivamente, Tabla 3). Mientras que en los cultivos realizados con CA estas similitudes no fueron grandes, TACANA con pH de 7.12 y 6.84 37 °C y 28 °C respectivamente (Tabla 3), OSCAR con pH de 6.43 y 6.64 a 37 °C y 28 °C respectivamente (Tabla 3) y especialmente el consorcio ISA con pH de 6.09 y 6.82 a 37 °C y 28 °C respectivamente (Tabla 3).

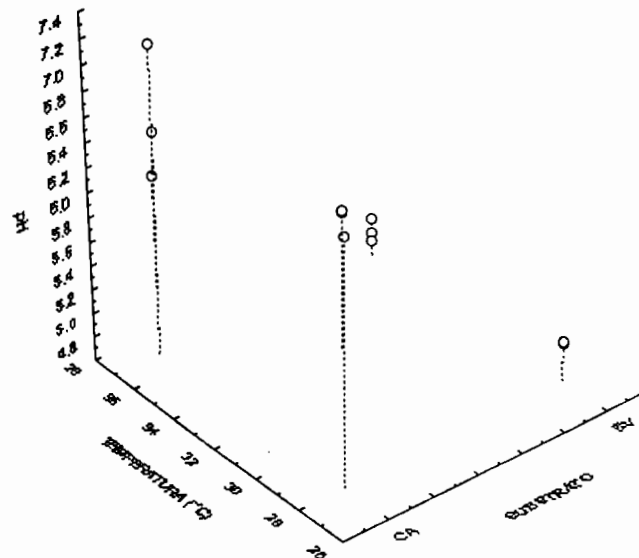


Figura 4. Alcalinidad en función a la temperatura y al sustrato.



En la Figura 4 se comparan los valores de pH final como función de la temperatura y el sustrato. Una vez más se evidencia la influencia determinante de la BV.

La variedad de la materia orgánica usada en la digestión anaeróbica es un factor determinante en la productividad de biogás. Esta variedad depende de la zona geográfica, de la manera de almacenamiento y también de la estación en la que se colecta (Saint-Joly C. et al, 2000). Así la producción de AGVs a partir de materia orgánica es el producto deseado del proceso hidrolítico y es también posterior sustrato de los consorcios metanogénicos. Es por esta razón, que su producción debe ser bien controlada y optimizada. En primera instancia y observando las figuras 1 y 2 se puede afirmar que la producción de ácidos grasos volátiles depende principalmente del tipo de sustrato y no así de la temperatura ni tampoco del tipo de consorcio. De igual forma se puede ver en las figuras 3 y 4 el efecto del tipo de sustrato sobre la alcalinidad del medio, nuevamente este responde al tipo de sustrato y no así al consorcio ni a la temperatura. La alcalinidad final que se obtuvo en los cultivos con basura vegetal mostró que el uso de este DOC podría ser contraproducente si lo que se quiere es tener un producto útil para una subsecuente producción de biogás.

Claramente los consorcios que tuvieron BV como parte de la composición del medio de cultivo tuvieron una producción notablemente mayor de AGVs, alrededor de 50 % más, esto puede haberse debido a una mayor accesibilidad de nutrientes de tipo xilanósico y celulósico y sobre todo a una mucho menor cantidad de contenido lignocelulósico comparada con las cascarilla de arroz.



4. **Determinación del efecto de la proporción de desecho orgánico complejo y consorcio hidrolítico sobre la producción de ácidos grasos volátiles, con la finalidad de determinar la condición adecuada de saturación de sustrato.**

Diferentes proporciones de BV con los consorcios ISA, OSCAR y TACANA

Las diferentes cantidades de sustrato en un mismo volumen de medio de cultivo dan una idea de cuan toxica (si lo fuese) puede resultar una sobrecarga de sustrato. Las proporciones de sustrato fueron clasificadas en tres categorías, 1/3X (equivalente a 2 g de glucosa por litro de medio), 1X (equivalente a 6 g de glucosa por litro de medio) y 3X (equivalente a 18 g de glucosa por litro de medio). La cinética de producción, la productividad volumétrica (Q_p) y la producción máxima mostraron que a mayor proporción de sustrato se obtuvo mayor producción de AGVs.

TABLA 4. Equivalentes de DQO a las concentraciones de glucosa en los medios de cultivo con BV.

Proporción de sustrato (BV)	DQO (mg/L)	Equivalente en concentración de glucosa (g/L)
1/3x	1.90E+03	2
1x	6.40E+03	6
3x	1.90E+04	18

Los medios de cultivo se prepararon con medio basal (ANEXO B) añadiendo los sustratos crudos en función al equivalente medido en DQO de la BV. La Tabla 4 muestra los valores de DQO equivalentes a 2 (1/3X), 6 (1X) y 18 (3X) gramos de glucosa por litro que se utilizaron para preparar los medios de cultivo. Se prepararon 70 mL por



cada cultivo en botellas de 120 mL saturadas con nitrógeno libre de oxígeno y esterilizadas en autoclave a 121 °C por 15 min, luego se añadieron tioglicolato de sodio estéril y solución de vitaminas (ANEXO B).

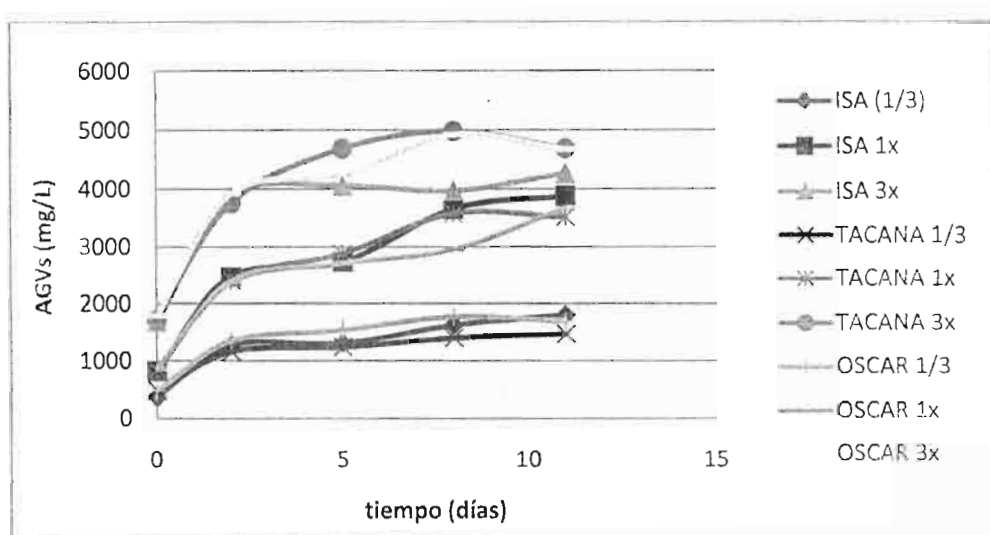


Figura 5. Producción de AGVs por los consorcios hidrolíticos ISA, TACANA y OSCAR en tres proporciones de basura vegetal (1/3X, 1X y 3X)

La cinética de producción en las tres proporciones mostró tener una relación directa con la cantidad de sustrato en el medio (Fig. 5). Durante los dos primeros días se observa una clara etapa de producción en la que los tres consorcios produjeron AGVs con diferentes cinéticas (pendientes). A partir de este punto la producción decae y se pueden observar diferencias pero la tendencia fue clara, a mayor proporción, mayor producción.

En la Tabla 5 se resumen las producciones máximas de AGVs y las productividades volumétricas (Q_p) en función a la proporción de sustrato sólido en el medio de cultivo inoculado con los tres consorcios hidrolíticos.



TABLA 5. Producciones máximas de AGVs y productividades volumétricas (Qp) de los consorcios hidrolíticos ISA, TACANA y OSCAR en tres diferentes proporciones de sustrato crudo

Consortio	Proporción de sustrato BV	AGVs conc. Final (mg/L)	Qp (mg AGVs/L/d)
ISA	1/3X	1810	144
ISA	1X	3880	408
ISA	3X	4270	1090
TACANA	1/3X	1470	119
TACANA	1X	3520	197
TACANA	3X	4690	571
OSCAR	1/3X	1700	168
OSCAR	1X	3680	257
OSCAR	3X	4670	401

El efecto de esta relación directa entre la producción de AGVs y la proporción de BV, podría ser diferente para los cultivos metanogénicos ya que no siempre una alta carga de sustrato crudo significa alta producción de metano en un sistema de producción de un solo paso (Fernandez J. et al., 2008). Además se evidenció que los cultivos con BV



producen AGVs finales con pH inferior a 5, lo cual también inhibiría el desarrollo de los microorganismos metanogénicos ya que estos son más sensibles a los cambios de pH que los microorganismos hidrolíticos.

El consorcio ISA mostró una clara tendencia a aumentar su productividad volumétrica (Q_p) a medida que aumentó la proporción de BV (Fig.6), mientras los consorcios OSCAR y TACANA mostraron un menor aumento de sus productividades. Al mismo tiempo se puede observar que la producción final de AGVs para los tres consorcios se mantuvo homogénea para cada proporción de DOC (Fig. 7).

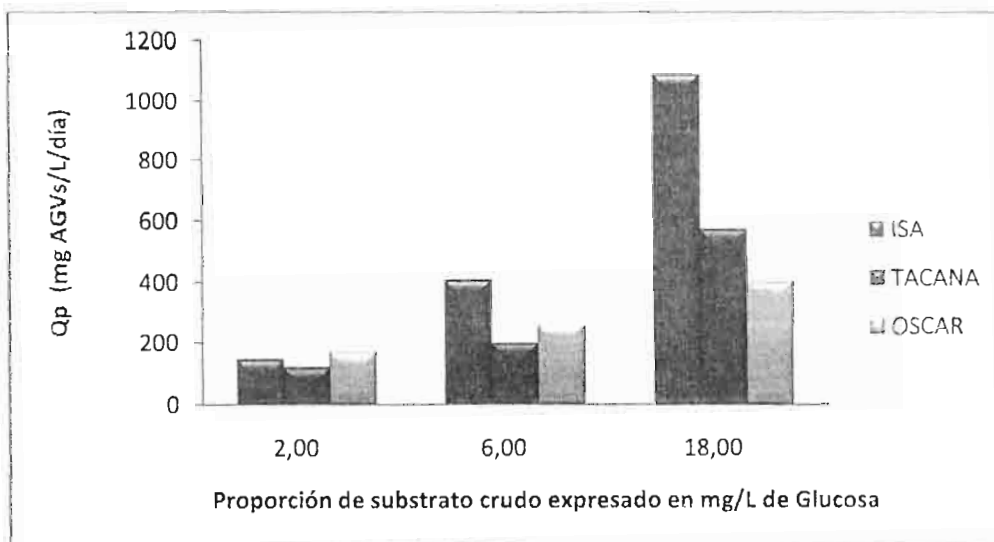


Figura 6. Productividad volumétrica (Q_p) de AGVs por los consorcios microbianos ISA, TACANA y OSCAR en función a la materia orgánica disponible DQO

El consorcio ISA demostró tener la mayor de las cinéticas por su alta productividad volumétrica, pero los tres consorcios mostraron similar concentración final de AGVs. La máxima degradación de la BV tiene como consecuencia no solo una alta formación de



AGVs si no también la acidificación del medio, factor que termina siendo contraproducente para la generación de metano.

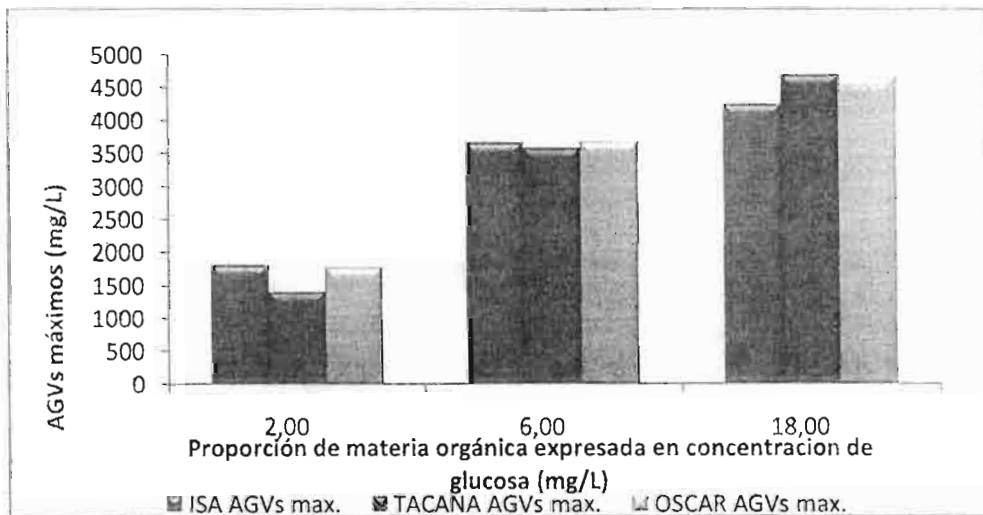


Figura 7. Máximas producciones de AGVs (mg/L) a diferentes proporciones de DOC.

Diferentes proporciones de CA con el consorcio OSCAR.

La producción final de AGVs producida por el consorcio OSCAR cultivado con CA en tres proporciones diferentes mostró estar directamente relacionada con la cantidad de sustrato presente en el medio de cultivo. Los medios de cultivo se prepararon con medio basal (ANEXO B) 70 mL en botellas de 120 mL adicionando las respectivas cantidades de sustrato crudo (Tabla 6), saturadas con nitrógeno libre de oxígeno, esterilizadas en autoclave a 121 °C por 15 min y adicionadas con solución de vitaminas y tioglicolato de sodio (ANEXO B)



Tabla 6. Equivalentes de DQO a las concentraciones de glucosa en los medios de cultivo con CA.

Proporción de sustrato (CA)	DQO mg/L	Equivalente en concentración de glucosa (g/L)
1/3X	1.90E+03	2
1X	6.40E+03	6
3X	1.90E+04	18

La cinética de producción (Fig. 8), muestra que el consorcio OSCAR produjo AGVs de acuerdo a la cantidad de sustrato presente en el medio de cultivo.

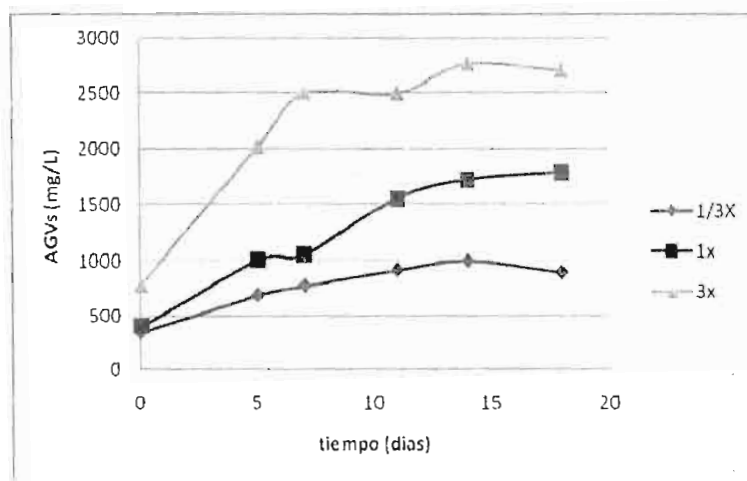


Figura 8 Producción de AGVs por el consorcio OSCAR en tres proporciones diferentes de CA (1/3X, 1X y 3X).



Comparando esta cinética con la generada con BV (Fig. 5) se observa que con CA hay una mayor diferencia entre las concentraciones finales de AGVs obtenidas en las proporciones 3X y 1X que con los resultados homólogos obtenidos con BV. Esta diferencia podría deberse a la rápida acidificación que se da en el medio con BV a 1X y 3X proporciones de sustrato crudo, lo que, si bien no inhibe del todo el metabolismo de los microorganismos, puede desacelerar el proceso.

La productividad volumétrica (Q_p) y la concentración final de AGVs muestran haber tenido una relación directa entre los valores obtenidos y la proporción de sustrato crudo (Fig. 9 y Tabla 7).

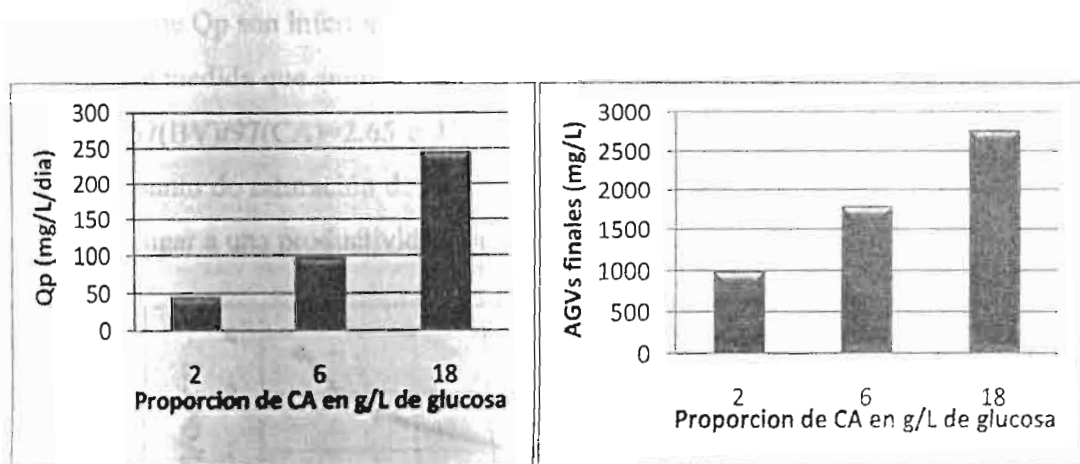


Figura 9. **Productividad volumétrica (Q_p) y Concentración final de AGVs por el consorcio OSCAR en tres proporciones diferentes de CA (1/3X, 1X y 3X).**



Tabla 7. Producciones máximas de AGVs y Productividades volumétricas Q_p del consorcio hidrolítico OSCAR en tres diferentes proporciones de CA.

Proporción de substrato	AGVs conc. Final (mg/L)	Q_p (mg/L/día)
1/3X	993	45
1X	1789	97
3X	2762	245

Los valores de Q_p son inferiores a los que se obtuvieron con BV pero la razón geométrica disminuye a medida que aumenta la proporción de substrato crudo ($168(BV)/45(CA)=3.7$ a 1/3X; $257(BV)/97(CA)=2.65$ a 1X y $401(BV)/245(CA)=1.65$ a 3X). Esto claramente refleja un punto de saturación de substrato que estaría por encima de la proporción 3X el cual daría lugar a una productividad Q_p cercana o igual a cero (Fig. 10).

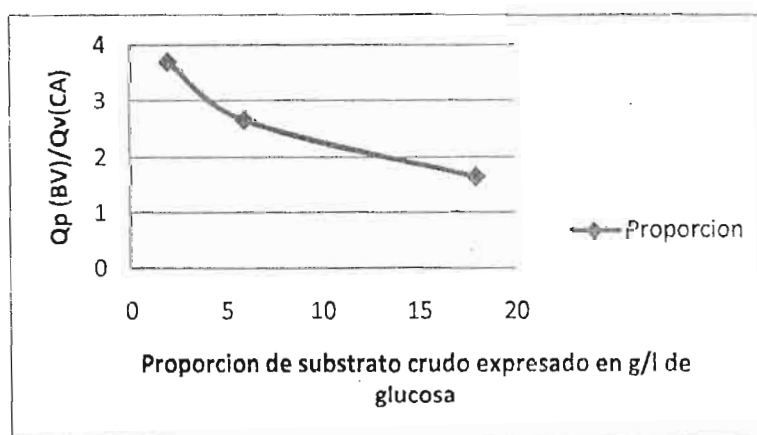


Figura 10. Razón de productividades Q_p de BV y CA en función a la proporción de substrato.



Las diferentes proporciones de sustrato crudo estuvieron por encima y por debajo del valor equivalente a 6 g de glucosa por cada litro de medio y tuvieron un efecto directo sobre la producción de AGVs. Los medios de cultivo no pudieron contener mayores proporciones de sustrato porque se sobresaturaban.

Estudio de condiciones de codigestión de sustratos utilizando cascarilla de arroz y basura vegetal mezclados en diferentes proporciones

Diferentes proporciones mezcladas de CA con BV en una concentración final igual a 3X (6 g/L de glucosa) mostraron un efecto positivo sobre la producción final de AGVs aunque no sobre la productividad volumétrica (Q_p). También se estudiaron las actividades enzimáticas de cinco enzimas involucradas en el proceso hidrolítico, de las cuales una mostró haber sido claramente afectada por la proporción de los sustratos. Es así que las diferentes proporciones de CA y BV en los medios de cultivo demostraron la posibilidad de uso de CA como aditivo alternativo ante una posible falta de BV en la producción de AGVs.

Contrariamente a los resultados obtenidos con los sustratos ensayados por separado, los resultados de concentraciones de AGVs finales en la codigestión realizada en siete experimentos diferentes, no mostraron relación directa con la variación de las proporciones de sustratos (Tabla 8 y Fig. 8). La concentración final de AGVs se mantuvo relativamente constante en la mayoría de los experimentos (coeficiente de variación, $CV = 0.13$), con excepción del experimento 5 en el que se alcanzó una producción final de 4729 mg/L, misma que es similar valor de 4670 mg/L obtenido con BV en proporción 3X (Tabla 5).



Tabla 8. Productividad volumétrica Q_p y concentración final de AGVs en los siete experimentos de codigestión.

Experimento	BV		CA		Q_p (mg/L/día)	AGVs (mg/L)
	(DQO)*	Fracción	(DQO)*	Fracción		
1	3840	1/5	15360	4/5	182.2	4080
2	4800	1/4	14400	3/4	103.01	3084
3	6400	1/3	12800	2/3	114.23	3658
4	9600	1/2	9600	1/2	178.97	3337
5	12800	2/3	6400	1/3	191.66	4729
6	14400	3/4	4800	1/4	129.13	3904
7	15360	4/5	3840	1/5	82.83	3582

* Valores obtenidos por la homologación de valores de glucosa a DQO.

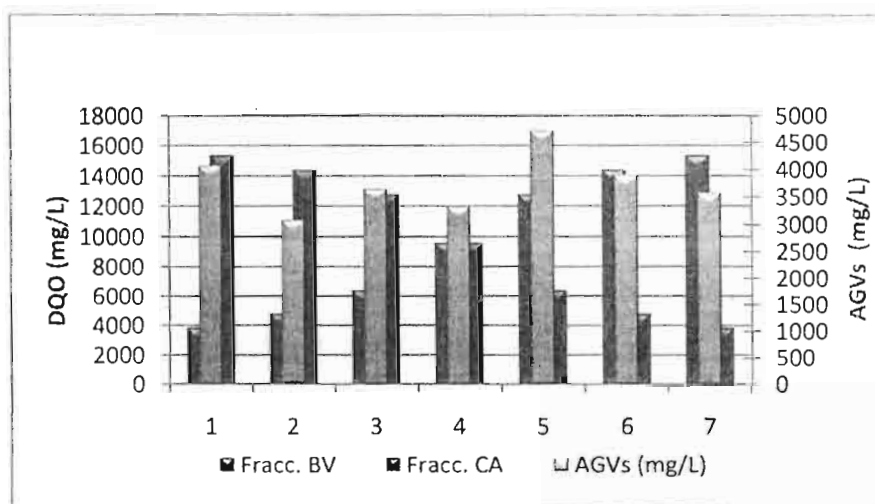


Figura 8. Producción máxima de AGVs mg/L a diferentes proporciones de sustrato crudo (DQO) tanto de BV como de CA.



Los valores de las productividades volumétricas (Q_p) mostraron mayor diferencia entre los siete experimentos, con un mayor coeficiente de variación, $CV = 0.28$ (Fig. 9, Tabla 8). En los experimentos 1, 4 y 5 se alcanzaron valores mayores de Q_p , pero aun así se encuentran muy por debajo del valor de 401 mg/L/día obtenido con BV como único sustrato (Tabla 5).

Las diferentes proporciones de BV y CA podrían llegar a tener un efecto altamente significativo sobre la máxima producción de AGVs y sobre la Productividad volumétrica (Q_p) siempre y cuando se utilicen concentraciones mayores a $3X$ (18 g/L de glucosa) (ANEXO D).

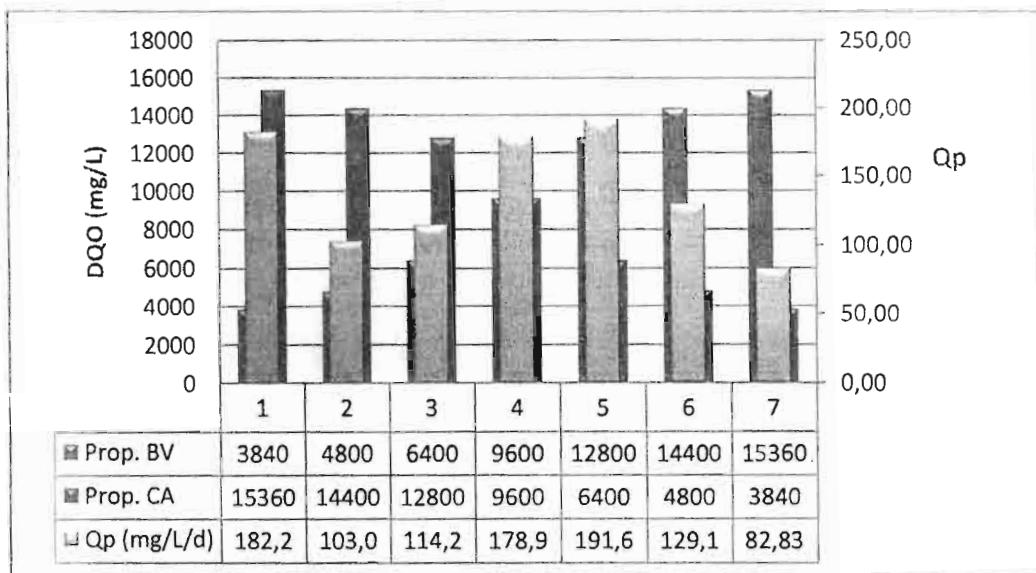


Figura 9. Productividad volumetrica Q_p a diferentes proporciones de sustrato (DQO) tanto de basura vegetal como de cascarilla de arroz.



La Tabla 9 y la Figura 10 muestran las actividades enzimáticas máximas de cinco enzimas hidrolíticas estudiadas en los sobrenadantes de cada uno de los siete experimentos de codigestión.

Tabla 9. Máximas actividades enzimáticas alcanzadas en los siete experimentos de codigestión. Todas expresadas en UI/mL.

Experimento	Act. Proteolítica	Act. Pectinolítica	Act. Amilolítica	Act. Celulolítica	Act. Xilanolítica
1	0.25	0.04	0.13	0.13	0.18
2	0.27	0.04	0.59	0.52	0.50
3	0.28	0.04	0.29	0.31	0.27
4	0.31	0.05	0.76	0.20	0.25
5	0.35	0.04	0.22	0.19	0.23
6	0.38	0.04	0.24	0.24	0.22
7	0.39	0.04	0.18	0.20	0.20

La variación en las diferentes proporciones de DOC tuvo efecto en diferentes grados sobre la producción de enzimas involucradas en el proceso de hidrólisis. Las enzimas proteolíticas mostraron haber tenido una relación directa con el aumento de la proporción de BV. Este efecto mostro haber sido altamente significativo (ANEXO D). Por otro lado la actividad de las enzimas de tipo glucolítico (con excepción de las enzimas pectinolíticas) podría verse afectada por la variación en la proporción de los DOC (ANEXO D). Según el análisis estadístico podría esperarse un efecto altamente significativo a mayores concentraciones de sustratos, es decir a concentraciones mayores a 3X (18 g/L de glucosa), mismas que sobresaturarían el medio de cultivo y se perdería la homogeneidad del mismo.



La posibilidad de uso de CA como DOC alternativo es factible aunque puede bajar la producción final de AGVs quizás debido al alto contenido de lignina y cenizas que es propio de este desecho (Uzodimna E.O., et al., 2008). La variación en la producción de AGVs también puede atribuirse a la relación C:N, la misma que es alta en el caso de la CA. Ambos factores (contenido alto de lignina y alta relación C:N) mostraron ser poco benéficos en la digestión anaeróbica de CA con desecho de bebidas carbonatadas (Kalra M. S. et al, 1986), aunque no en la proporción del presente estudio.

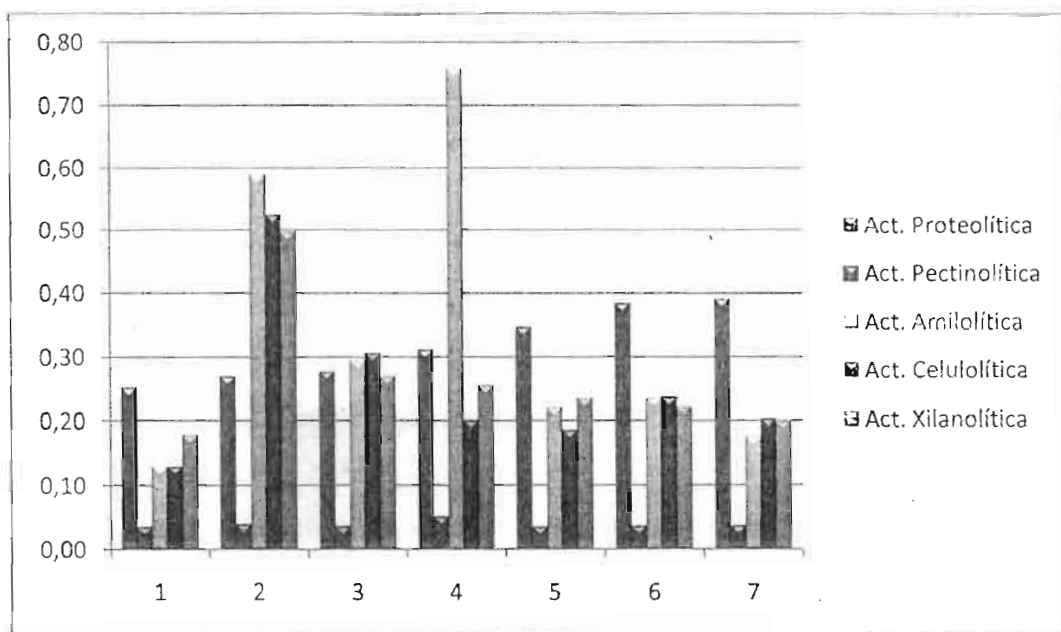


Fig. 10. Actividades enzimáticas (UI/mL) de cinco enzimas hidrolíticas en cada uno de los siete experimentos de codigestión

Puede ser recomendable que la CA se someta a un pre tratamiento antes de ser añadida a una mezcla para codigestión (Uzodimna E.O., et al, 2008). Sin embargo, este procedimiento podría encarecer el proceso de hidrólisis y además, podrían liberarse



subproductos del tratamiento, como ser compuestos fenólicos entre otros, que tendrían un efecto negativo sobre el metabolismo de los consorcios metanogénicos a los cuales se facilitará la mezcla de AGVs producidos.

La composición de la basura doméstica varía según la región y según el método de recojo y pese a que se den tratamientos similares los resultados pueden no ser similares inclusive utilizando las mismas condiciones de cultivo (Saint-Joly C., et al., 2000). La variación en la composición de la BV pueden cambiar el curso de la digestión anaeróbica (Sarapakta B., 1994), es así que conociendo en mayor profundidad la cinética de consumo de los distintos componentes de la BV se podría monitorear su mejor consumo para una mayor producción de AGVs.

En el presente estudio, la actividad enzimática fue determinada en el sobrenadante de los cultivos. Estas son enzimas libres pero también se encuentran aquellas relacionadas a los biofilms (Zhang B., et al., 2007), las cuales pueden haber tenido también una importante participación en la degradación de la materia orgánica, considerando que los microorganismos formadores de biopelículas generalmente poseen sistemas tales como celulosomas y xilanosomas que permiten la hidrólisis enzimática *in situ* del material lignocelulósico. Pese a este contexto, y considerando el hecho de que la cascarilla de arroz posee en su composición material lignocelulósico y almidón, no se pudo observar que las actividades amilolítica, celulolítica y xilanolítica se vieran incrementadas a medida que aumenta la proporción de CA en relación a BV; mientras que por otro lado el aumento en la proporción de BV en relación a CA, produjo un incremento en la actividad proteolítica, fenómeno que puede atribuirse a la mayor accesibilidad a sustratos pobres en lignina (menor cantidad de CA).



i. Activación y cultivo de consorcios metanogénicos

La activación y cultivo de los consorcios metanogénicos PIG, Llama y Mallasa fue establecida a 37 °C durante aproximadamente 17 días, en el transcurso de los cuales se verificó la producción de metano por medio del análisis por cromatografía de gases, esta producción fue confirmatoria de la actividad de estos consorcios. Todos ellos se mantuvieron activos inoculándolos en condiciones de cultivo, realizando trasposos periódicos a medios frescos para constatar una activa producción de metano.

. Optimización de condiciones de cultivo metanogénico

Se cultivaron los tres consorcios metanogénicos (PIG, Llama y Mallasa) en tres concentraciones diferentes de AGVs (0.5, 1 y 2 mg/mL) con la finalidad de observar variaciones en la productividad volumétrica (Q_p , %metano/L/d), consumo de substrato (Q_s , g AGVs/L/d) y rendimiento (Y_p/s , % metano/g AGVs). Las determinaciones de metano a través de cromatografía de gases fueron establecidas como una medición absoluta, vale decir, que no se midió la proporción de metano en el contexto de otros gases posiblemente presentes en la fase gaseosa, como ser dióxido de carbono, entre otros.

Las concentraciones de AGVs (0.5, 1 y 2 mg/mL) fueron preparadas a partir de la producción obtenida en el proceso hidrolítico descrito anteriormente. Por esta razón, los medios de cultivo metanogénico fueron preparados con estas concentraciones menores a las obtenidas en el proceso hidrolítico, de otra manera no se hubiera contado con la cantidad suficiente para la preparación de los mismos.



En la Figura 11 se puede verificar la producción de metano (% metano) a lo largo de 22 días de cultivo en batch en condiciones anaeróbicas. El consorcio PIG mostró la mayor producción de entre todas (ca. 60 %) a 2 mg/mL de AGVs, producción que se mantuvo estable por 5 días y a 0.5 mg/mL de AGVs (ca. 50 % metano) mientras que a 1 mg/mL se dio la menor de sus producciones (ca. 20 %), misma que se mantuvo casi constante por más de 10 días. Los valores de productividad Q_p (Fig. 12) muestran cierta homología con estos resultados, mientras que los valores obtenidos de consumo de sustrato Q_s (Fig. 12) muestran haber tenido relación directa con la concentración inicial de AGVs, al menos en los consorcios PIG y Mallasa.

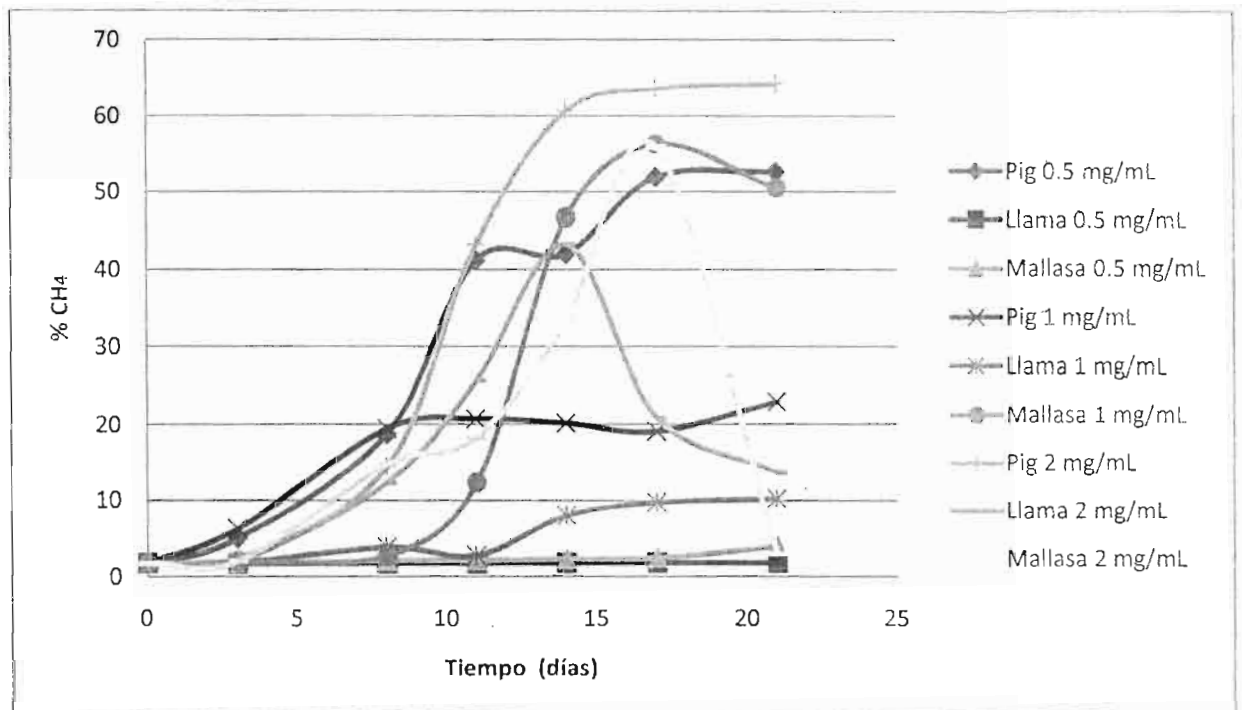


Figura 11. Producción de metano (% CH₄) a distintas concentraciones de AGVs por los consorcios metanogénicos PIG, Llama y Mallasa



El consorcio Mallasa mostró su máxima producción (c.a 55 %) a concentraciones de AGVs de 2 y 1 mg/mL, mientras que a 0,5 mg/mL se mantuvo en c.a 5 % desde casi un principio. Los valores de Q_p muestran una muy baja productividad a 0.5 mg/mL de AGVs que es concordante con la producción máxima de metano mientras que los valores correspondientes a 1 y 2 mg/mL de AGVs no muestran concordancia con los de producción máxima. Por otro lado los valores de Q_s sí muestran haber tenido una dependencia directa de la concentración inicial de AGVs.

Por último el consorcio Llama mostró una marcada producción de ca. 40 % a 2 mg/mL de AGVs comparada con una producción de ca. 10 % a 1 mg/mL y de 0 % a 0.5 mg/mL de AGVs. Estos resultados guardan homología con los valores de Q_p y Q_s (Fig. 12) donde se ve que el consorcio Llama mostró haber tenido una relación directa con la concentración de AGVs iniciales.

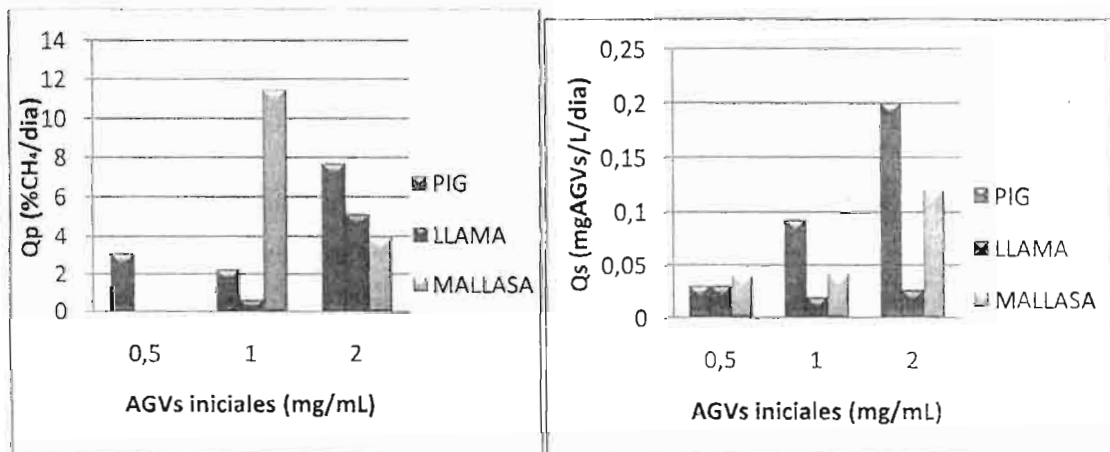


Figura 12. Relación de las constantes productividad volumétrica (Q_p) y consumo volumétrico (Q_s) en la producción de metano por los consorcios metanogénicos PIG, Llama y Mallasa inoculados a 0.5, 1 y 2 mg/mL de AGVs.



En cuanto se refiere a la productividad volumétrica (Q_p) y al consumo volumétrico de AGVs (Q_s) por parte de los consorcios metanogénicos se puede decir que no existe una relación directamente proporcional entre ambas constantes. Este hecho indicaría que la composición microbiana de los consorcios es variable y dependiente de una calidad y concentración de sustratos (AGVs) diferente en cada caso.

Con la excepción del consorcio PIG se puede decir que la producción de metano tuvo una relación relativamente directa a la concentración inicial de AGVs, ya que en el caso del consorcio Mallasa se repitió el valor a 1 y 2 g/L (Fig. 11). En cuanto al consumo volumétrico Q_s los consorcios PIG y Mallasa mostraron haber tenido relación directa con la concentración inicial de AGVs mientras que el consorcio Llama muestra haber tenido una muy baja variación en las tres diferentes concentraciones de AGVs. Considerando la relación estrecha entre la productividad (Q_p) y el consumo volumétrico (Q_s), el consorcio PIG muestra haber tenido directa influencia de los AGVs iniciales para ambos parámetros, pese a que sus valores de Q_p a 0.5 y 1 mg/mL muestran poca variación.

La Tabla 10 y Figura 13 muestran los rendimientos en los cultivos metanogénicos expresados como % de metano formado por cada mg por mL de solución de AGVs.

Tabla 10. Rendimientos de producción de metano en función a la cantidad de substrato consumido ($Y_{p/s}$ = % metano/g AGV).

CONSORCIO	AGVs iniciales (mg/mL)		
	0.5	1	2
PIG	83.4	20.6	29.6
LLAMA	0.4	30.3	15.7
MALLASA	5.4	56.8	26.3



El consorcio PIG muestra una marcada diferencia en su valor de rendimiento a 0.5 mg/mL de AGVs comparado con los correspondientes a 1 y 2 mg/mL. Si bien los valores Q_p mostraron estrecha relación con la concentración inicial de AGVs puede considerarse el alto rendimiento a 0.5 mg/mL de AGVs como resultado de uso casi exclusivo de estos en la generación de metano mientras que a mayores concentraciones posiblemente se utilicen estos AGVs en la generación de más biomasa que en última instancia puede ser la responsable de los mayores valores de Q_p y Q_s .

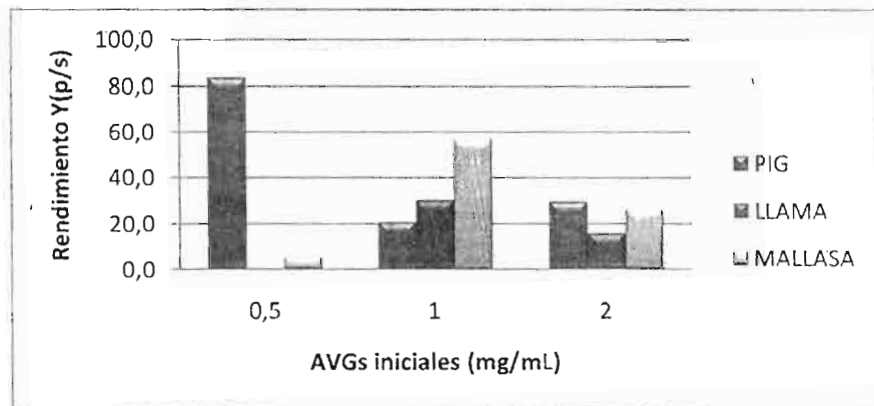


Figura 13 Rendimientos expresados como % CH_4 /(mg/mL AGVs) de los tres consorcios metanogénicos inoculados a 0.5, 1 y 2 mg/mL de AGVs.

El consorcio Mallasas muestra también una marcada diferencia aunque en menor proporción en su rendimiento a 1 mg/mL de AGVs comparado con 0.5 y 2 mg/mL. Este valor puede correlacionarse con el valor de Q_p (Fig. 12). El hecho de una menor producción a mayor concentración de AGVs puede responder a un fenómeno de saturación de sustrato, ó a la presencia de potasio y lípidos cuando altas concentraciones de materia orgánica son parte del sustrato de consorcios metanogénicos que no están aclimatados (Garucci G. et al. 2005), ó a la presencia de sulfatos que puede disminuir la producción de metano, favoreciendo a consorcios de bacterias sulfato reductoras (Purdy K. J. et al., 2003). De cualquier manera las altas concentraciones de AGVs para el



consorcio Mallasa resultaron ser adversas para la producción de metano aunque el consumo de AGVs (Qs) no se vio afectado.

Por último el consorcio Llama muestra haber tenido rendimientos mucho mayores a concentraciones de 1 y 2 mg/mL de AGVs comparados con el correspondiente a 0.5 mg/mL de AGVs. Una sobrecarga de AGVs es contraproducente para la metanogénesis (Yadvika et al., 2004) y de esta forma el consorcio Llama puede haber sido afectado por una sobrecarga de materia orgánica (AGVs) ya que se ha reportado que estas heces tienen gran cantidad de sólidos volátiles, nitrógeno y fósforo (Alvarez R., et al., 2005)

Pese a que el rendimiento podría estar directamente relacionado con la cantidad de materia orgánica en el medio de cultivo se ha visto que en el caso de cargas moderadas de material orgánico la adición de aditivos como por ejemplo vitaminas puede ser contraproducente para el rendimiento (Gamze G. et al, 1993), como también se ha observado que un alto contenido de materia orgánica ocasiona un descenso en el rendimiento de metano (Mtz.-Vituria, et al., 1994). De esta manera, en el presente estudio puede observarse un fenómeno similar especialmente con el consorcio FIG. El consorcio Mallasa muestra haber tenido similar efecto pero entre las concentraciones de 1 y 2 mg/mL, similarmente a lo ocurrido con el consorcio Llama pero en menor proporción. Si la producción de metano dependería solamente de la calidad y la concentración de AGVs, la relación entre ambas constantes debería ser directamente proporcional en ambos casos. Este fenómeno determinaría que el consorcio metanogénico podría estar compuesto por metanógenos acetoclasticos e hidrogenotrópicos en distintas proporciones de acuerdo a su dependencia de acetato o de CO₂ y H₂.

La Figura 14 muestra la constante de producción de metano Q_p y su relación con el tipo de consorcio metanogénico estudiado cuando estos fueron inoculados a 0.5, 1 y 2 g/L de AGVs.

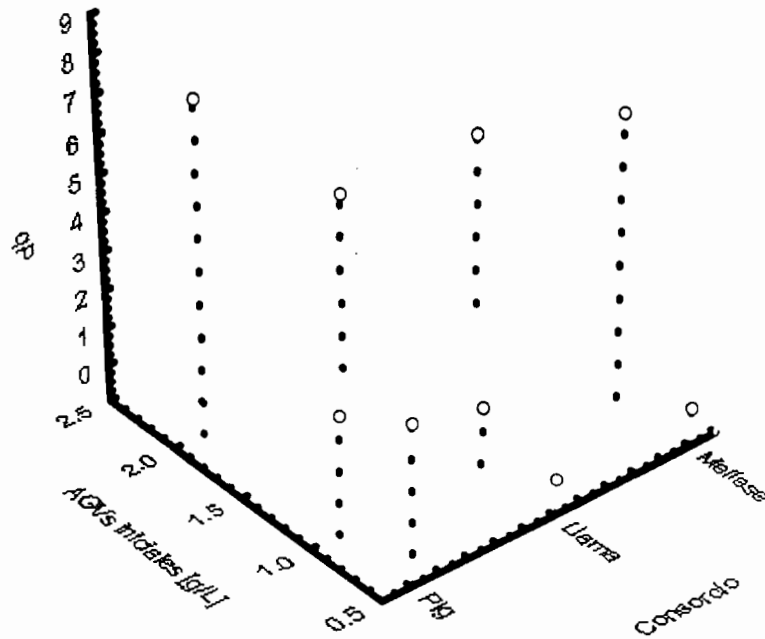


Figura 14. Productividad Q_p en función a consorcio metanogénico y a la concentración de AGVs iniciales en el medio de cultivo

Las productividades del consorcio PIG muestran haber sido superiores a todas las demás con la excepción del consorcio Mallasa a 1 mg/mL de AGVs iniciales. Presumiblemente a mayores concentraciones de AGVs este consorcio se satura y baja su productividad de metano. Correlacionando estos resultados con aquellos de productividad Q_p se observa claramente que la mayor fue establecida cuando el consorcio PIG fue inoculado en un cultivo en batch anaeróbico con 2 g/L de AGVs. Este dato corrobora también la mayor y



más sostenible producción de metano (Figura 14) obtenida en cultivos en batch en este estudio.

La producción de biogás a partir de heces de animales suele ser baja aunque estable mientras que usando desechos sólidos la producción se incrementa pero es más inestable (Schanbacher F. L. 2005), y como en el presente trabajo se hizo uso de ambos tipos de materiales los resultados pueden haber respondido a ambas características reportadas.



Capítulo VIII. CONCLUSIONES

La determinación de la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido posibilitó una evaluación cuantitativa del contenido de lignina en cada uno de los DOC y así seleccionar los mejores DOC para la subsecuente digestión anaeróbica.

La activación de los consorcios hidrolíticos mediante la determinación del proceso hidrolítico a través de la actividad enzimática permitió confirmar la capacidad de estos consorcios para crecer en medios de cultivo cuyas fuentes de carbono estaban constituidas por desechos orgánicos complejos.

Mediante el estudio del efecto del tipo de consorcio, sustrato y temperatura sobre la producción de AGVs como producto final de la hidrólisis anaeróbica y sobre la alcalinidad del medio se evidenció que la variable altamente influyente sobre esta producción fue la basura vegetal ya que fue la que mayor producción final de AGVs permitió. Esto pudo haberse debido a la menor cantidad de lignina en comparación a la cascarilla de arroz (CA).

El estudio del efecto de la proporción de sustratos crudos y el tipo de consorcio hidrolítico sobre la producción de AGVs demostró que hubo una relación directa entre la cantidad de sustrato crudo en el medio de cultivo y la producción de AGVs.

El estudio de la codigestión de sustrato utilizando cascarilla de arroz y basura vegetal mezclados en diferentes proporciones mostró que el uso de cascarilla de arroz como aditivo ante la falta de basura vegetal es factible para la digestión anaeróbica aunque la producción de AGVs puede verse disminuida pero no inhibida.

La activación y cultivo de los consorcios metanogénicos mostró que es factible mantener estos consorcios en condiciones latentes listos para su uso en la producción de metano a mayores escalas.



De los tres consorcios metanogénicos estudiados el consorcio PIG mostro haber tenido un comportamiento más predecible de acuerdo a la concentración de AGVs en el medio de cultivo

Todavía queda por resolver la composición microbiana presente en este tipo de consorcios para poder determinar la relación directa y la dependencia metabólica con la calidad y concentración de AGVs utilizados.

Capítulo IX

**Artículo científico a ser publicado en
el Segundo volumen de la revista
BIOFARBO-ed. 2010:**

EVALUATION OF BIOLOGICAL
STRATEGIES TO OPTIMIZE THE
HYDROLITIC ANAEROBIC PROCESS OF
ORGANIC COMPLEX WASTES IN THE
BIOGAS PRODUCTION

EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS PARA OPTIMIZAR EL PROCESO HIDROLÍTICO ANAEROBIO DE DESECHOS ORGANICOS COMPLEJOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOGAS

**EVALUATION OF BIOLOGICAL STRATEGIES TO OPTIMIZE THE HYDROLITIC ANAEROBIC PROCESS OF ORGANIC
COMPLEX WASTES IN THE BIOGAS PRODUCTION**

**Cavero Olguin, V. Hugo; Alvarez Aliaga Ma. Teresa; Terrazas Siles, L. Enrique; Giménez Turba, Alberto.
Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas. F.C.F.B. – U.M.S.A.
Contacto: Hugo Cavero, telf. 72590724, e-mail: hugo_cavero@hotmail.com**

Biogas production through anaerobic digestion using organic complex wastes and environmental microbial consortia was studied. Strategies like evaluation of substrate-lignin content, substrate proportion, co-digestion, enzymatic production and AGV content were applied and evaluated specially in the anaerobic digestion stage with the aim of producing volatile fatty acids which later on were fed into the methanogenic stage. Vegetal wastes, rice husks, and wood chips were first evaluated onto their lignin content for being degraded in the anaerobic digestion. Parameters like temperature, pH and consortia were used to optimise the hydrolytic process. Other parameters like the enzymatic activity was tested in co-digestion experiments using vegetal wastes and rice husks from which volatile fatty acids produced were used to generate methane in the methanogenic cultures. Results showed that it's feasible the use of vegetable wastes and rice husks at once in order to get profit from both. Parameters like yield (Y_p/s), volumetric productivity (Q_p), volumetric consumption (Q_s) and maximum production were tested in order to visualise their capabilities in a full scale process. Methanogenic stage showed that among three consortia used only one seemed to be quite suitable for the initial conditions in the medium showing a production up to 60 %methane, with Q_p values of c.a. 8 %methane/day and Y_p/s of c.a. 30 (g/g). The use of vegetal wastes and rice husks may prevent the depletion of one of them or the non correct classification of vegetal wastes and still get methane production.

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de tecnologías alternativas como la digestión anaeróbica (DA) en el tratamiento de residuos orgánicos para la generación de energía es hoy en día una estrategia aceptada a nivel mundial por no dañar el medio ambiente y por ser accesible a bajos costos de operación debido a la materia prima que se utiliza (Mata-Alvarez et al, 2000). La producción de biogás está directamente relacionada con la cantidad de ácidos grasos volátiles (AGVs) producidos durante la DA y es por esto que la optimización de este proceso es crucial en la generación de este tipo de energía alternativa. Entre las diferentes estrategias utilizadas para la mejora en la producción de biogás se encuentra el uso de aditivos orgánicos (Yadvika et al., 2004), los mismos que pueden ser de naturaleza compleja como los desechos agrícolas, los residuos municipales e industriales.

El campamento O.S.C.A.R. (Obras Sociales de Caminos de Acceso Rural) ubicado en la región de los Yungas del departamento de La Paz depende del uso de diesel para generar su energía eléctrica y del uso de leña para preparar sus alimentos. En este campamento se tiene bien clasificada la basura doméstica y también se tiene acceso a desechos agrícolas propios de la región como la cascarilla de arroz (CA) y a aserrín (AS) generado en el mismo campamento. Por

Por otro lado las heces de animales como los chanchos pueden servir para la generación de metano, estas heces son de fácil acceso ya que el campamento cuenta con un criadero de chanchos.

El uso de materiales como la CA conjuntamente con la basura vegetal (BV) por separado y en procesos de codigestión como alternativa de generación de AGVs para el subsecuente establecimiento de procesos metanogénicos utilizando consorcios microbianos de diferentes nichos ecológicos, fue analizado en el presente trabajo. Parámetros como temperatura, pH, producciones volumétricas (Q_p), consumos volumétricos de sustratos (Q_s), rendimientos de producto en función al sustrato (Y_p/s) y otros fueron evaluados tanto en la generación de AGVs por parte de los consorcios hidrolíticos como en la generación de metano por los consorcios metanogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el establecimiento de los procesos de DA y metanogénesis, se utilizaron Desechos orgánicos Complejos (DOC) y diferentes consorcios microbianos ambientales. Los DOC fueron evaluados mediante pre-tratamiento químico y subsecuente evaluación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) con la finalidad de establecer la cantidad relativa de material lignocelulósico. Se realizaron los siguientes análisis: determinación de pH, demanda química de oxígeno (DQO), determinación de ácidos grasos volátiles (AGVs), y de las actividades enzimáticas pectinasas, arboximetil celulasas, xilanasas, amilasas y proteasas. Los AGVs obtenidos en la digestión anaeróbica fueron usados como fuente de carbono para los consorcios metanogénicos, cuya producción de metano se evaluó cuantitativamente mediante cromatografía de gases.

Material Biológico

El material biológico utilizado estuvo constituido por sustratos, y consorcios microbianos, tanto hidrolíticos como metanogénicos. Como sustratos se utilizaron basura vegetal (BV), cascarilla de arroz (CA) y aserrín (AS). Como BV se colectaron muestras de frutas y verduras en su composición. La CA de arroz fue colectada directamente de las peladoras industriales de la localidad de Caranavi. El AS fue colectado en la carpintería del campamento O.S.C.A.R. En cuanto a los consorcios microbianos, estos estuvieron constituidos por tres consorcios hidrolíticos (ISA, TACANA y OSCAR) y tres metanogénicos (PIG, Llama y Mallasa). Todos los tomados de ambientes naturales. El consorcio ISA (de Isabel, quien tomó la muestra) fue tomado de una planta de tratamiento de café en la localidad de los yungas del departamento de La Paz y se conservó en frascos plásticos a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El consorcio TACANA fue colectado de un pantano en las cercanías de la región habitada por la comunidad Tacana localizada en Alto Beni norte del departamento de La Paz). El consorcio OSCAR fue colectado del botadero de desechos orgánicos del campamento. El consorcio PIG fue colectado de las heces fecales del criadero de chanchos del propio campamento O.S.C.A.R. El consorcio LLAMA estuvo constituido por heces de llamas en las cercanías de la provincia Sajama en el departamento de Puno. El consorcio LIXIVIADO DE MALLASA corresponde a una muestra colectada en el botadero municipal de la zona de Mallasa, mismo que solía ser el botadero oficial de toda la localidad de La Paz. Este consorcio fue tomado del mismo laboratorio pues ya llevaba algún tiempo siendo estudiado por otros investigadores en el área.

Determinaciones analíticas

Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La estimación de la demanda química de oxígeno se realizó de acuerdo al protocolo descrito en standards & methods (APHA, 1998).

Determinación de la producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)

Se tomaron 20 mL del fermento (VS) producido luego de la incubación de los consorcios en el medio de cultivo para ser titulada mediante el método de titulación en tres puntos (Buchauer K., 1998). Se procedió midiendo el pH inicial que es el equivalente a la alcalinidad medida (Alk_{meas}) e ajustó el pH a 5 con ácido sulfúrico 1 N (N) o con hidróxido de sodio 1 N (N) según el caso, para luego medir la cantidad de ácido sulfúrico 1N (N) requerida para llegar a un pH de 4.3 y luego a uno de 4.0, este último valor constituye el volumen de ácido añadido ($VA_{5-4\ meas}$). Los datos obtenidos de acuerdo a este procedimiento fueron utilizados en el cálculo del valor S_a equivalente a la cantidad total de ácidos grasos volátiles considerados como ácido acético (Buchauer K., 1998), de acuerdo a la relación $S_a = 131340 * N * VA_{5-4\ meas} / VS - 3.08 * Alk_{meas} - 5$. Los 20 mL de muestra mencionados fueron tomados un sobrenadante de 30 mL de muestra centrifugada a 4000 rpm durante 15 min en cada caso, esto debido a que la muestra tomada directamente de cada cultivo presentaba bastante materia en suspensión, misma que podría haber interferido en la valoración subsecuente.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de enzimas involucradas en la hidrólisis de celulosa, almidón, hemicelulosa y pectina fue determinada mediante la medición de azúcares reductores como producto de la hidrólisis enzimática a través de la técnica modificada de la reducción del ácido 3,5 di nitro salicílico (DNS) (Miller, 1959). Soluciones de glucosa, xilosa y ácido galacturónico fueron utilizadas como estándares, respectivamente. La actividad endocelulasa fue determinada usando como sustrato carboximetil celulosa (CMC) al 0.2 % en buffer citrato 50 mM, pH 4.8. Xilano obtenido de avena (SIGMA) fue utilizado al 0.2 % en buffer fosfato 200 mM, pH 6 para la determinación de la actividad endoxilanasas. Pectina de manzana al 0.1 % en buffer acetato 100 mM, pH 5.5 fue utilizado para la determinación de la actividad pectinolítica. Por último, la actividad amilolítica fue evaluada usando como sustrato almidón al 0.2 % en buffer acetato 50 mM, pH 6.

Un mililitro de muestra previamente filtrado con filtro Millipore de 0.45 μ m y conservado a 0 °C mediante el uso de baño de hielo para evitar la inactivación de las enzimas. Se utilizaron baterías y tres tubos, denominados blanco, control y test. Se añadieron 450 μ L de sustrato en buffer a cada uno de los tres tubos, 50 μ L de muestra solo al tubo test y por último 50 μ L de agua al tubo blanco. Se procedió a incubar a 50 °C por 60 min. Posteriormente se procedió a añadir 750 μ L de solución de DNS a cada uno de los tres tubos y 50 μ L solo al tubo control quedando así todos con 1250 μ L de volumen total. Finalmente, los tubos se incubaron a 90 °C por 5 min y las absorbancias fueron leídas a 540 nm contra el blanco reactivo. La determinación del valor de absorbancia real se obtuvo por simple sustracción de los valores de los tubos test menos los

ubos control en cada muestra. Por último, los resultados fueron expresados en Unidades Internacionales (UI) de actividad enzimática la cual es definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un $\mu\text{mol}/\text{min}$ de azúcar reductor expresado como equivalentes de glucosa o xilosa o ácido galacturónico.

La actividad proteolítica fue determinada a partir de la mezcla de un volumen de muestra previamente centrifugada y filtrada) con un volumen de solución de azocaseína al 0.5 % precalentada en buffer TRIS-HCl 100 mM, pH 7.4) e incubada a 50 °C por 1 hora. La reacción fue detenida añadiendo 2 volúmenes de ácido tricloroacético al 10%. Finalmente la mezcla de reacción fue centrifugada a 3000 g por 10 min y la absorbancia del sobrenadante medida a 380 nm (Kole MM et al., 1988). Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en una curva de calibración que refiere las unidades internacionales (UI) de papaína, mismas que se encuentran definidas en el producto comercial como 17 UI/mg (Papaína de papaya SIGMA, código 25K7675).

Determinación de metano por cromatografía de gases

La evaluación de metano se realizó inyectando 10 μL de muestra gaseosa tomados con jeringa directamente de la fase aérea de los cultivos metanogénicos. El cromatógrafo de gases empleado fue un cromatógrafo Perkin Elmer modelo CLARUS 500. Columna: Elite-1-30 m x 0.53 mm x 20 μm , Part # N9316051, Serial # 501641. Detector: FID a 250 °C. Las condiciones de corrida fueron como se detalla a continuación, Inyector: 200 °C. Horno: 80 °C. Gas portador: H_2 . Tiempo de corrida: 5 minutos. Tiempo de retención: 1.518 minutos. La curva de calibración fue determinada a partir de diluciones gaseosas de una muestra de gas metano (de distribución domiciliar). La concentración de metano determinada fue relacionada al 100 %.

Determinación de la alcalinidad - pH

Las mediciones de pH se realizaron con un equipo portátil, pHmetro ORION, modelo 420 A.

Diseño metodológico

Determinación de la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido

El producto del pre tratamiento ácido fue medido en términos de DQO, así el valor obtenido presentó la cantidad de materia susceptible de hidrólisis. La BV fue previamente homogenizada mediante una licuadora, añadiendo agua en cantidad suficiente para obtener una mezcla homogénea, posteriormente filtrada y desecada en estufa a 60 °C.

Pre tratamiento ácido

Se prepararon soluciones al 10% (p/v) de los diferentes substratos en ácido sulfúrico al 2% (p/v) en botellas de boro silicato herméticamente cerradas y tratadas térmicamente a 121°C en autoclave por 90 min con la finalidad de determinar el contenido relativo de lignina en los tres substratos (Silverstein R., 2004). Luego de enfriamiento a temperatura ambiente se determinó la

DQO para cada caso. De esta manera los DOC se seleccionaron en función a su contenido relativo de lignina.

Homologación de los valores de DQO con el equivalente de glucosa en el medio de cultivo

Una determinada cantidad de glucosa al igual que otros compuestos orgánicos es susceptible de oxidación mediante la técnica DQO. Tomando 6 g/L de glucosa como parámetro teórico, tal como se encuentra en el medio comercial "Anaeróbico Fluido" (SCHARIAU. Ref. 03-008), medio en el que los consorcios mostraron buen crecimiento, se hizo una analogía estequiométrica como se explica a continuación:

Un mol de glucosa requiere de 192 g (6 mol) de oxígeno molecular para una combustión total hasta dióxido de carbono, agua y calor.



Se puede fácilmente deducir que 6 g de glucosa serán oxidados por 6.4 g de oxígeno molecular. Entonces, si un valor de DQO es de 6400 (6400 mgO₂/L) en una muestra real equivaldría idealmente a seis gramos de glucosa. De esta forma luego de evaluar los substratos los valores obtenidos de DQO fueron homologados con el valor teórico de 6 gramos de glucosa (6.4 g de O₂ por litro de solución). Por ejemplo la fracción acuosa del pre tratamiento ácido de BV (7 g BV en 10 mL de H₂SO₄ (2%), solución al 10 %) tiene un valor DQO de 44.6 g O₂/L. El valor de DQO es referido a un litro, así es que para 70 mL el cálculo mediante factor unitario será el siguiente:

$$\begin{aligned} ? \text{ g O}_2 &= 70 \text{ mL} * 44.6 \text{ g O}_2 / 1000 \text{ mL} \\ &= 3.12 \text{ g O}_2 \text{ (requeridos por los 70 mL)} \end{aligned}$$

Por lo que se puede afirmar que 7 g de BV requirieron de 3.12 g O₂ para oxidarse en una solución al 10%. Ahora bien, ¿Cuántos gramos de DOC serán necesarios para obtener un DQO de 6.4 g O₂? (recuerde que este valor es el que producirían 6 g de glucosa).

$$\begin{aligned} ? \text{ g BV} &= 6.4 \text{ g O}_2 * 7 \text{ g BV} / 44.6 \text{ g O}_2 \\ &= 1 \text{ g BV (en 70 mL)} \end{aligned}$$

Expresando 1 g de BV en 70 mL de solución en términos de porcentaje se tiene: 1 g / 70 mL * 100 = 1,43 % (p/v) que en la practica representa la concentración de BV que se debe preparar para tener una solución que equivaldría idealmente a una de 6 g de glucosa por litro.

Determinación del efecto de la temperatura de incubación y del tipo de DOC y consorcio microbiano en la producción de AGVs, y en la alcalinidad del medio

Se estableció un diseño experimental de 3x2x2 (12 experimentos) basados en los tres consorcios hidrolíticos (ISA, TACANA y OSCAR), dos temperaturas (28 y 37 °C) y dos tipos de DOC (BV y CA). Se preparó medio de cultivo basal con DOC en concentraciones equivalentes a 6 g de glucosa por litro (según valores homólogos de DQO) en viales de 100 mL saturando de

trógeno molecular libre de oxígeno y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min. Luego de enfriar a temperatura ambiente se añadió a cada vial tioglicolato de sodio (0.2 % concentración) y solución de vitaminas para finalmente inocular el consorcio correspondiente al 10 %. Por último se determinó la cantidad acumulada de AGVs luego de un mes de incubación.

determinación del efecto de la proporción de los materiales de desecho

Se estableció un diseño factorial completo 3^3 (27 experimentos), donde los tres consorcios se cultivaron en tres proporciones diferentes (1/3X, 1X y 3X) de DOC. Estas proporciones fueron preparadas en 80 mL de medio basal en viales de 100 mL, preparados como se indica en el capítulo precedente y finalmente incubadas a 37 °C por un mes. Se tomaron muestras cada dos días aproximadamente y se determinaron AGVs, DQO y pH. Los datos de AGVs se utilizaron en la determinación de cinéticas de producción, productividad y consumo volumétrico (Q_p y Q_s).

ensayo de codigestión.

Se realizaron mezclas de CA con BV teniendo el siguiente espectro de proporciones:

Experimento	Proporción de CA	Proporción de BV
1	4/5	1/5
2	3/4	1/4
3	2/3	1/3
4	1/2	1/2
5	1/3	2/3
6	1/4	3/4
7	1/5	4/5

donde todas estas fracciones expresadas en términos de DQO referido al valor de glucosa en el medio.

optimización del cultivo metanogénico

Se estableció un diseño factorial 3^3 , con 3 concentraciones de AGVs (0.5, 1 y 2 mg/mL) y los consorcios metanogénicos PIG, Llama y Mallasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

determinación de la cantidad de desecho orgánico complejo (DOC) susceptible de hidrólisis a través de pre tratamiento ácido

La cantidad de materia susceptible de hidrólisis en cada uno de los DOC se diferenciaron experimentalmente en función a la cantidad relativa de lignina (Silverstein R., 2004). Los valores de la DQO se refirieron en porcentaje relativo al equivalente de 6 g de glucosa por litro de medio (Tabla 1).

a 1. Pre tratamiento de DOC crudo para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y porcentaje de material requerido equivalente a 6 g de glucosa por litro de solución.

DOC crudo	DQO (mg O ₂ /L)	% DOC en el medio de cultivo.
Cascarilla de arroz (CA)	1.42*10 ⁴	4.5
Aserrín (AS)	2.41*10 ³	18.6
Basura Vegetal (BV)	4.46*10 ⁴	1.5

Los valores obtenidos fueron claramente representativos del contenido de lignina de cada uno de los materiales. Es así que los valores de BV y CA fueron menores al de AS, evidenciando el menor contenido de lignina de este último. Para preparar un medio de cultivo equivalente a 6 g de glucosa por litro, se requerirían 18.6 g de AS por cada 100 mL, esto significaría un medio muy saturado. Se podría pensar en reducir el tamaño de las partículas de aserrín ya que un tamaño menor favorece su hidrólisis (Cullis IF et al., 2004) pero esto implicaría un paso extraño no serviría de mucho ante la existencia de los otros dos materiales que no son tan ricos en lignina. Es así que, debido a la alta concentración requerida para preparar los medios de cultivo con AS, a la naturaleza recalcitrante de la lignina (especialmente en procesos anaeróbicos) y por no a la mejor digestibilidad de materiales más ricos en hemicelulosa que en lignocelulosa como la CA y BV, se prescindió del AS en todos los experimentos subsecuentes.

efecto del tipo de consorcio, sustrato y temperatura sobre la producción de AGVs como producto final de la hidrólisis anaeróbica, y sobre la alcalinidad del medio

análisis de la producción final de AGVs

Los mayores valores de AGVs fueron aquellos en los que el sustrato fue BV, sin gran influencia por parte del consorcio ni de la temperatura (fig. 1). Las condiciones de cultivo pueden influir de manera significativa a la maquinaria enzimática y metabólica de los microorganismos que actúan en la digestión anaeróbica (Khalil A. I., 2001) y los resultados aquí presentados muestran variaciones en la producción de AGVs debidas a diferentes condiciones de cultivo, además vale la pena mencionar el contenido de la CA que además de tener principalmente celulosa en su composición, también tiene un alto contenido de lignina, y un peculiar contenido alto de cenizas, lo que la hace particular entre los residuos lignocelulósicos (Yañez R. et al., 2006).

Analizando los datos por regresión múltiple se vio que la variable sustrato tuvo una influencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.00024$) sobre las variables temperatura y la variable consorcio. Los cultivos con BV produjeron una mayor concentración final de AGVs comparados con las concentraciones obtenidas en los medios de cultivo con CA.

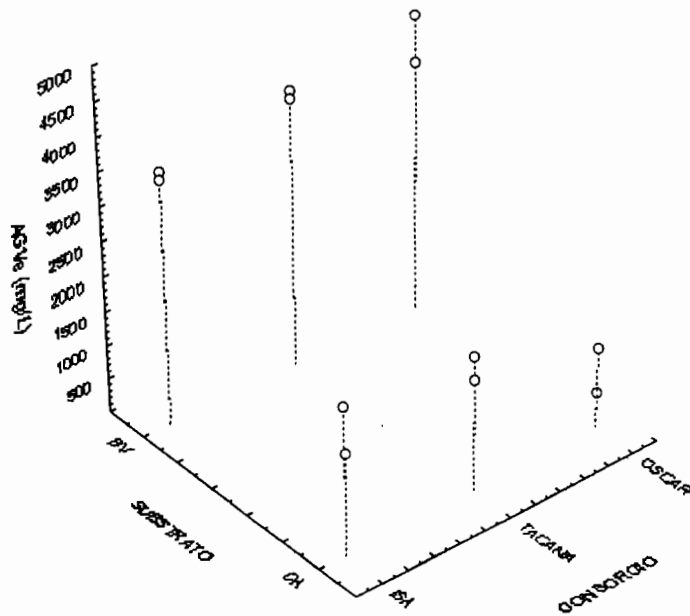


Figura 1. Producción de AGVs en función de sustrato y consorcio.

En la figura 2 se comparan las producciones finales de AGVs como función de la temperatura y el sustrato. Entre las dos variables se observa claramente que la variable determinante fue el sustrato. La BV permitió la producción final más alta de AGVs y su diferencia con los valores obtenidos con CA es por demás evidente. Mientras que la diferencia de estos valores debida a la variable temperatura es mucho menos evidente. La idea de mantener la temperatura moderadamente baja podría ser beneficiosa si se considera que el mal olor generado en la digestión anaeróbica puede ser mejor controlado además de la evidencia que a 20 °C puede existir una mejor producción de metano que a 37 °C (Ndegwa P. M. et al., 2008), esto en el caso de un proceso metanogénico inmerso en la hidrólisis.

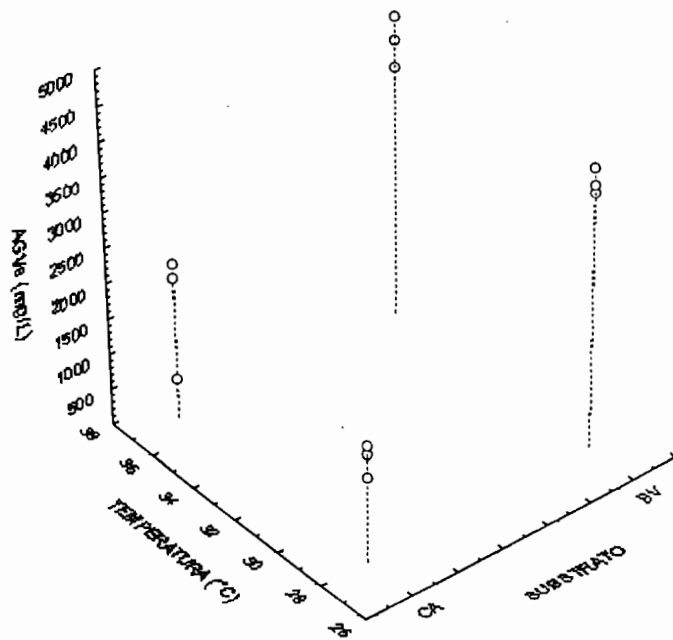


Figura 2. Producción de AGVs en función a la temperatura y sustrato.

Análisis de la alcalinidad

De acuerdo al análisis de regresión múltiple, el sustrato BV resultó ser altamente significativo ($p < 0.00001$) en cuanto se refiere al pH final del medio de cultivo, cuyo valor mínimo fue de 4.73, siendo este valor muy bajo en comparación con los valores de pH obtenidos en los cultivos con CA, cuyo valor mínimo fue 6.09. Es importante que el pH final de cada cultivo no disminuya demasiado para el posterior uso de los AGVs en el proceso metanogénico. Los AGVs pasarán a ser metabolizados por los consorcios metanogénicos y ante un medio con pH bajo la metanogénesis puede ser inhibida, inclusive si el consorcio es adaptado a valores bajos de pH, los rendimientos decaen (Jain S R et al., 1998).

Efecto de la proporción de DOC y el tipo de consorcio hidrolítico sobre la producción de AGVs

Diferentes proporciones de BV con los consorcios ISA, OSCAR y TACANA

La cinética de producción en las tres proporciones mostró tener una relación directa con la cantidad de sustrato en el medio. La tendencia fue clara, a mayor proporción, mayor producción. Los valores de Q_p y AGVs finales se resumen en la Tabla 2. El efecto de la relación directa entre la producción de AGVs y la proporción de BV podría ser diferente para los cultivos metanogénicos ya que no siempre una alta carga de sustrato crudo significa alta producción de etano en un sistema de producción de un solo paso (Fernandez J. et al., 2008). Además se evidenció que los cultivos con BV producen AGVs finales con pH inferior a 5, lo cual también

inhibiría el desarrollo de los microorganismos metanogénicos ya que estos son más sensibles a los cambios de pH que los microorganismos hidrolíticos.

Tabla 2. Producciones máximas de AGVs y productividades volumétricas (Qp) de los consorcios hidrolíticos ISA, TACANA y OSCAR en tres diferentes proporciones de sustrato crudo

Consortio	Proporción de sustrato BV	AGVs conc. final (mg/L)	Qp (mg AGVs/L/d)
ISA	1/3X	1810	144
ISA	1X	3880	408
ISA	3X	4270	1090
TACANA	1/3X	1470	119
TACANA	1X	3520	197
TACANA	3X	4690	571
OSCAR	1/3X	1700	168
OSCAR	1X	3680	257
OSCAR	3X	4670	401

El consorcio ISA mostró una clara tendencia a aumentar su productividad volumétrica (Qp) a medida que aumentó la proporción de BV, mientras los consorcios OSCAR y TACANA no mostraron un gran aumento de sus valores Qp. Al mismo tiempo se puede observar que la producción final de AGVs para los tres consorcios se mantuvo homogénea para cada proporción DOC.

Diferentes proporciones de CA con el consorcio OSCAR

La productividad volumétrica (Qp) y la concentración final de AGVs mostraron haber tenido una relación directa con la proporción de CA (Tabla 3). Comparando los valores mostrados en la Tabla 3 con los generados con BV (Tabla 2) se observa que con CA hay una mayor diferenciación entre las concentraciones finales de AGVs obtenidas en las proporciones 3X y 1X que con los resultados homólogos obtenidos con BV. Esta diferencia podría deberse a la rápida acidificación que se da en el medio con BV a 1X y 3X proporciones de sustrato crudo, lo que, si bien no inhibe del todo el metabolismo de los microorganismos, puede desacelerar el proceso.

Tabla 3. Producciones máximas de AGVs y Productividades volumétricas Qp del consorcio hidrolítico OSCAR en tres diferentes proporciones de CA.

Proporción de substrato	AGVs conc. Final (mg/L)	Qp (mg/L/día)
1/3X	993	45
1X	1789	97
3X	2762	245

Los valores de Qp son inferiores a los que se obtuvieron con BV pero la razón geométrica disminuye a medida que aumenta la proporción de substrato crudo ($168(BV)/45(CA)=3.7$ a 1X; $257(BV)/97(CA)=2.65$ a 1X y $401(BV)/245(CA)=1.65$ a 3X). Esto claramente refleja un punto de saturación de substrato que estaría por encima de la proporción 3X el cual daría lugar a una productividad Qp cercana o igual a cero (Fig. 3).

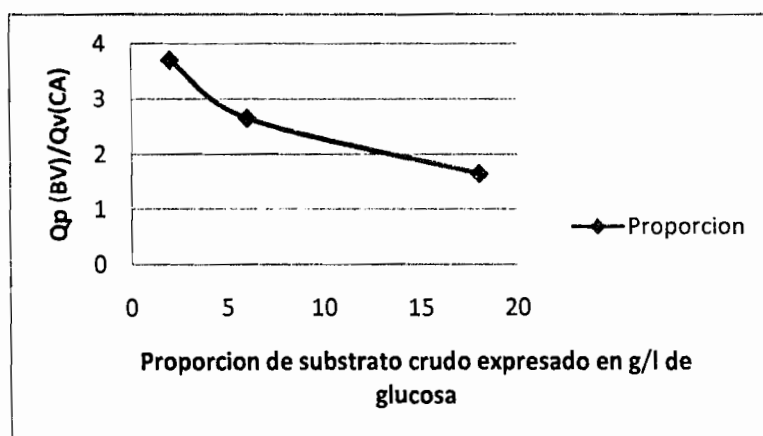


Figura 3. Razón de productividades Qp de BV y CA en función a la proporción de substrato.

Estudio de la codigestión de substrato utilizando CA y BV mezclados en diferentes proporciones

Diferentes proporciones mezcladas de CA con BV en una concentración final igual a 3X (6 g/L glucosa) mostraron un efecto positivo sobre la producción final de AGVs aunque no sobre la productividad volumétrica (Qp). También se estudiaron las actividades enzimáticas de cinco enzimas involucradas en el proceso hidrolítico, de las cuales una mostró haber sido claramente afectada por la proporción de los substratos.

Contrariamente a los resultados obtenidos con los substratos ensayados por separado, los diferentes niveles de concentraciones de AGVs finales en la codigestión realizada en siete experimentos independientes, no mostraron relación directa con la variación de las proporciones de substratos (Tabla 4). La concentración final de AGVs se mantuvo relativamente constante en la mayoría de

experimentos (coeficiente de variación, $CV = 0.13$), con excepción del experimento 5 en el que se alcanzó una producción final de 4729 mg/L, misma que es similar valor de 4670 mg/L obtenido con BV en proporción 3X.

3LA 4. Productividad volumétrica Q_p y concentración final de AGVs en los siete experimentos de codigestión.

Experimento	BV		CA		Q_p (mg/L/día)	AGVs (mg/L)
	(DQO)*	Fracción	(DQO)*	Fracción		
1	3840	1/5	15360	4/5	182.2	4080
2	4800	1/4	14400	3/4	103.01	3084
3	6400	1/3	12800	2/3	114.23	3658
4	9600	1/2	9600	1/2	178.97	3337
5	12800	2/3	6400	1/3	191.66	4729
6	14400	3/4	4800	1/4	129.13	3904
7	15360	4/5	3840	1/5	82.83	3582

Valores obtenidos por la homologación de valores de glucosa a DQO.

Los valores de las productividades volumétricas (Q_p) mostraron mayor diferencia entre los siete experimentos, con un mayor coeficiente de variación, $CV = 0.28$ (Tabla 4). En los experimentos 5 y 7 se alcanzaron valores mayores de Q_p , pero aun así se encuentran muy por debajo del valor de 401 mg/L/día obtenido con BV como único sustrato (Tabla 2).

Tabla 5 muestra la actividad proteolítica máxima en cada uno de los siete experimentos de codigestión. Las enzimas proteolíticas mostraron haber tenido una relación directa con el contenido de la proporción de BV.

3LA 5. Máximas actividades proteolíticas alcanzadas en los siete experimentos de codigestión. Todas expresadas en UI/mL.

Experimento (BV:CA)	Act. Proteolítica
1 (1/5: 4/5)	0.25
2 (1/4: 3/4)	0.27
3 (1/3: 2/3)	0.28
4 (1/2: 1/2)	0.31
5 (2/3: 1/3)	0.35
6 (3/4: 1/4)	0.38
7 (4/5: 1/5)	0.39

La posibilidad de uso de CA como DOC alternativo es factible aunque puede bajar la producción de AGVs quizás debido al alto contenido de lignina y cenizas que es propio de este desecho (Molina E.O., et al., 2008). La variación en la producción de AGVs también puede atribuirse a la relación C:N, la misma que es alta en el caso de la CA. Ambos factores (contenido alto de lignina y alta relación C:N) mostraron ser poco benéficos en la digestión anaeróbica de CA con

desecho de bebidas carbonatadas (Kalra M. S. et al, 1986), aunque no en la proporción del presente estudio. Puede ser recomendable que la CA se someta a un pre tratamiento antes de ser añadida a una mezcla para codigestión (Uzodimna E.O., et al, 2008). Sin embargo, este procedimiento podría encarecer el proceso de hidrólisis y además, podrían liberarse subproductos del tratamiento, como ser compuestos fenólicos entre otros, que tendrían un efecto negativo sobre el metabolismo de los consorcios metanogénicos a los cuales se facilitará la mezcla de AGVs producidos.

La composición de la BV doméstica varía según la región y según el método de recojo y pese a que se den tratamientos similares los resultados pueden no ser similares inclusive utilizando las mismas condiciones de cultivo (Saint-Joly C., et al., 2000). La variación en la composición de la BV pueden cambiar el curso de la digestión anaeróbica (Sarapakta B., 1994), es así que conociendo en mayor profundidad la cinética de consumo de los distintos componentes de la BV se podría monitorear su mejor consumo para una mayor producción de AGVs.

En el presente estudio, la actividad enzimática fue determinada en el sobrenadante de los cultivos. Estas son enzimas libres pero también se encuentran aquellas relacionadas a los biofilms (Zhang B., et al., 2007), las cuales pueden haber tenido también una importante participación en la degradación de la materia orgánica, considerando que los microorganismos formadores de biopelículas generalmente poseen sistemas tales como celulosomas y xilanosomas que permiten la hidrólisis enzimática *in situ* del material lignocelulósico. Pese a este contexto, y considerando el hecho de que la CA posee en su composición material lignocelulósico y hemicelulosa, no se pudo observar que las actividades amilolítica, celulolítica y xilanolítica se vieran incrementadas a medida que aumenta la proporción de CA en relación a BV; mientras que por otro lado el aumento en la proporción de BV en relación a CA, produjo un incremento en la actividad proteolítica, fenómeno que puede atribuirse a la mayor accesibilidad a substratos libres en lignina (menor cantidad de CA).

Optimización de condiciones de cultivo metanogénico

Los consorcios metanogénicos fueron cultivados en tres concentraciones diferentes de AGVs (0.5, 1 y 2 mg/mL) con la finalidad de observar variaciones en la productividad volumétrica (Q_p , L metano/L/d), consumo de substrato (Q_s , g AGVs/L/d) y rendimiento ($Y_{p/s}$, % metano/g AGVs). Las concentraciones de AGVs (0.5, 1 y 2 mg/mL) fueron preparadas a partir de la reducción obtenida en el proceso hidrolítico descrito anteriormente.

Los consorcios PIG (2 mg/mL y 0.5 mg/mL) y Mallasa (2 mg/mL) fueron los que mayor producción de metano mostraron (Fig. 4). Los valores de productividad Q_p (Fig. 5) muestran cierta homología con estos resultados, mientras que los valores obtenidos de consumo de substrato Q_s (Fig. 5) muestran haber tenido relación directa con la concentración inicial de AGVs, al menos en los consorcios PIG y Mallasa.

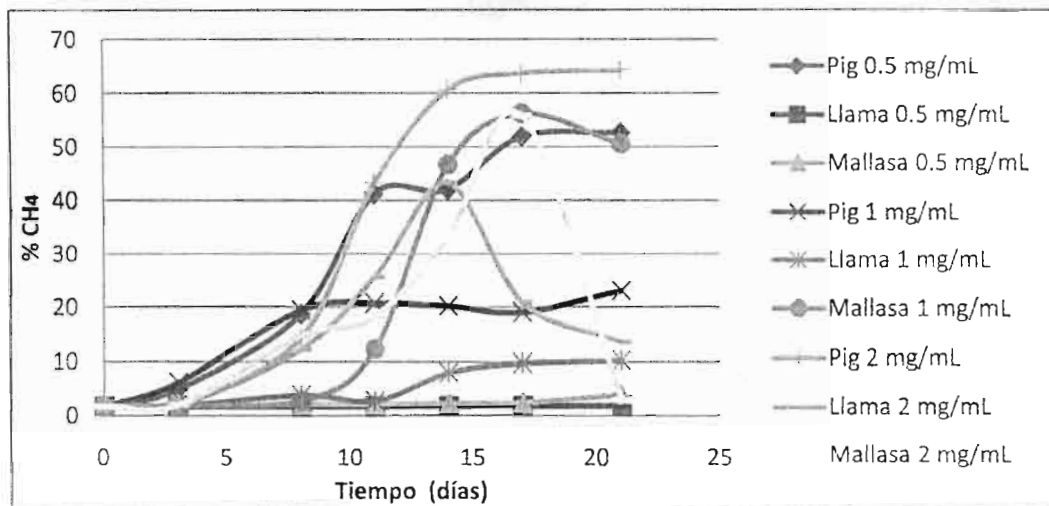


Figura 4. Producción de metano (% CH₄) a distintas concentraciones de AGVs por los consorcios metanogénicos PIG, Llama y Mallasa

Con la excepción del consorcio PIG se puede decir que la producción de metano tuvo una relación relativamente directa con la concentración inicial de AGVs, ya que en el caso del consorcio Mallasa se repitió el valor a 1 y 2 mg/mL (Fig. 4). En cuanto al consumo volumétrico Q_s los consorcios PIG y Mallasa mostraron haber tenido relación directa con la concentración inicial de AGVs mientras que el consorcio Llama muestra haber tenido una muy baja variación en las tres concentraciones diferentes de AGVs. Considerando la relación estrecha entre la productividad (Q_p) y el consumo volumétrico (Q_s), el consorcio PIG muestra haber tenido directa influencia de los AGVs iniciales para ambos parámetros, pese a que sus valores de Q_p a 0.5 y 1 mg/mL muestran poca variación.

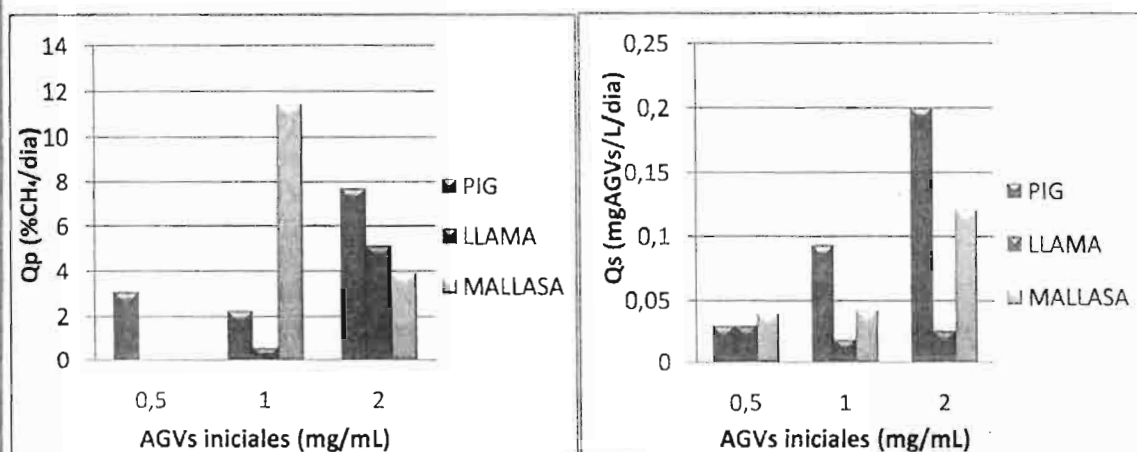


Figura 5. Relación de las constantes productividad volumétrica (Q_p) y consumo volumétrico (Q_s) en la producción de metano por los consorcios metanogénicos PIG, Llama y Mallasa inoculados a 0.5, 1 y 2 mg/mL de AGVs.

estar compuesto por metanógenos acetoclasticos e hidrogenotrópicos en distintas proporciones de acuerdo a su dependencia de acetato o de CO₂ y H₂. La producción de biogás a partir de heces de animales suele ser baja aunque estable mientras que usando desechos sólidos la producción se incrementa pero es mas inestable (Schanbacher F. L. 2005), y como en el presente trabajo se hizo uso de ambos tipos de materiales los resultados pueden haber respondido a ambas características reportadas.

En conclusión se puede afirmar que el uso de BV y CA en experimentos de co-digestión mostraron la factibilidad de uso de estos dos desechos orgánicos en la producción de biogás usando heces de chanchos, siendo este material el que mostro haber tenido un comportamiento más predecible de acuerdo a la concentración de ácidos grasos volátiles en el medio de cultivo

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento primordial al I.R.D. (Institute du Research pour le Developpement) por su apoyo económico. A toda la comunidad del Campamento O.S.C.A.R. Al Lic. Efrain Chambi y a estudiantes que contribuyeron en distintos análisis: Rodney Keller, Juna Pablo Apaza y Claudia Rivera.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Alvarez, R, Vilca, Saul, Liden, G. 2006. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 30, pp. 66-75.

APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington DC.

Buchauer, K. 1998. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes. *Water SA*. Vol. 24, No. 1, pp. 49-56.

Cullis, IF, Saddler, JN, Mansfield, SD. 2004. Effect of Initial Moisture Content and Chip Size on the Bioconversion Efficiency of Softwood Lignocellulosics. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 85, No. 4, pp. 413-421.

Gamze, Güngör-Demirci, Göksel, N. Demirer. 2004. Effect of inicial COD concentration, nutrient addition, temperature, and microbial acclimatation on anaerobic treatability of broiler and cattle manure. *Bioresource technology*. Vol. 93, pp. 109-117.

Jain, SR and Mattiasson, B. 1998. Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. *Biotechnology Letters*. Vol. 20, No. 8, pp. 771-775.

Khalil, AI, Beheary, MS, Salem, EM. 2001. Monitoring of microbial populations and their cellulolytic activities during the composting of municipal solid wastes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 17, pp. 155-161.

Kole MM, Draper I, Gerson FD. 1988. Protease production by bacillus subtilis in oxygen controlled glucose feed batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:404-408.

Mata-Alvarez et al. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. Vol. 74, pp. 3-16.

Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, No. 3. pp. 426-428.

Ndegwa PM, Hamilton DW, Lalman JA, Cumba HJ. 2008. Effects of cycle-frequency and temperature on the performance of Anaerobic Sequencing Batch Reactors (ASBRs) treating swine waste. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 1972-1980.

Purdy, KJ, Munson MA, Cresswell-Maynard T, Nedwell DB, Embley TM. 2003. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in a UK estuary. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 44, pp. 361-371.

Saint-Joly, C, Desbois, S, Lotti, JP. 2000. Determinant impact of waste collection and composition on anaerobic digestion performance: industrial results. *Water Science and Technology*. Vol. 41 Issue: 3, pp. 291-297

Sarapatka, B. 1994. Factors influencing biogas production during full-scale anaerobic fermentation of farmyard manure. *Bioresource Technology*. Vol. 49, pp. 17-23.

Schanbacher, FL, Willett LB, Borger DC, Neiswander RL, Gratz M. 2005. Bioprocess associated with anaerobic digestion of manures and food wastes for the production of biogas. *Animal Waste Management Symposium*.

Silvesrstein, Rebecca Anne. 2004. A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. Master of science thesis. Graduate Faculty of North Carolina State University.

Uzodinma, EO, Ofoefule, AU, Eze, JI, Mbaeyi, I, Onwuka, ND. 2008. Effect of some organic wastes on the biogas yield from carbonated soft drink sludge. *Scientific Research and Essay*. Vol. 3 (9), pp. 401-405.

Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T, R, Sangeeta K, Vineet. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques-a review. *Bioresource Technology*. Vol. 95, pp. 1-10.

Yáñez, R, Alonso, JL, Parajó, JC. 2006. Enzymatic saccharification of hydrogen peroxide-treated solids from hydrothermal processing of rice husks. *Process Biochemistry*. Vol 41, pp. 1244-1252.

Zhang, B, He, P, Lu, F, Shao, L, Wang, P. 2007. Extracellular enzyme activities during regulated Hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Research*. Vol. 41, pp. 4468-4478.

La tabla 6 muestran los rendimientos de los cultivos metanogénicos expresados como % de metano formado por cada mg por mL de solución de AGVs. El consorcio PIG muestra una marcada diferencia en su valor de rendimiento a 0.5 mg/mL de AGVs comparado con los correspondientes a 1 y 2 mg/mL. Si bien los valores Q_p mostraron estrecha relación con la concentración inicial de AGVs puede considerarse el alto rendimiento a 0.5 mg/mL de AGVs como resultado de uso casi exclusivo de estos en la generación de metano mientras que a mayores concentraciones posiblemente se utilicen estos AGVs en la generación de más biomasa que en última instancia puede ser la responsable de los mayores valores de Q_p y Q_s .

Tabla 6. Rendimientos de producción de metano en función a la cantidad de sustrato consumido ($Y_{p/s}$ = % metano/g AGV).

CONSORCIO	AGVs iniciales (mg/mL)		
	0.5	1	2
PIG	83.4	20.6	29.6
LLAMA	0.4	30.3	15.7
MALLASA	5.4	56.8	26.3

El consorcio Mallasa muestra también una marcada diferencia aunque en menor proporción en su rendimiento a 1 mg/mL de AGVs comparado con 0.5 y 2 mg/mL. Este valor puede correlacionarse con el valor de Q_p (Fig. 5). El hecho de una menor producción a mayor concentración de AGVs puede responder a un fenómeno de saturación de sustrato, ó a la presencia de potasio y lípidos cuando altas concentraciones de materia orgánica son parte del sustrato de consorcios metanogénicos que no están aclimatados (Garucci G. et al. 2005), ó a la presencia de sulfatos que puede disminuir la producción de metano, favoreciendo a consorcios de bacterias sulfato reductoras (Purdy K. J., et al., 2003). De cualquier manera las altas concentraciones de AGVs para el consorcio Mallasa resultaron ser adversas para la producción de metano aunque el consumo de AGVs (Q_s) no se vio afectado.

Por último el consorcio Llama muestra haber tenido rendimientos mucho mayores a concentraciones de 1 y 2 mg/mL de AGVs comparados con el correspondiente a 0.5 mg/mL de AGVs. Una sobrecarga de AGVs es contraproducente para la metanogénesis (Yadvika et al., 2004) y de esta forma el consorcio Llama puede haber sido afectado por una sobrecarga de materia orgánica (AGVs) ya que se ha reportado que estas heces tienen gran cantidad de sólidos volátiles, nitrógeno y fósforo (Alvarez R., et al., 2005).

Pese a que el rendimiento podría estar directamente relacionado con la cantidad de materia orgánica en el medio de cultivo se ha visto que en el caso de cargas moderadas de material orgánico la adición de aditivos como por ejemplo vitaminas puede ser contraproducente para el rendimiento (Gamze G. et al, 1993), como también se ha observado que un alto contenido de materia orgánica ocasiona un descenso en el rendimiento de metano (Mtz.-Vituria, et al., 1994). De esta manera, en el presente estudio puede observarse un fenómeno similar especialmente con el consorcio PIG. El consorcio Mallasa muestra haber tenido similar efecto pero entre las concentraciones de 1 y 2 mg/mL, similarmente a lo ocurrido con el consorcio Llama pero en menor proporción. Si la producción de metano dependería solamente de la calidad y la concentración de AGVs, la relación entre ambas constantes debería ser directamente proporcional en ambos casos. Este fenómeno determinaría que el consorcio metanogénico podría

Capítulo X

BIBLIOGRAFIA

CONSULTADA

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Alvarez, R, Villca, Saul, Liden, G. 2006. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 30, pp. 66-75.
- APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington DC.
- Archer, D.B. 1983. The microbial process control in methanogenic fermentation of soluble wastes. *Enzyme Microbial Technology*. Vol. 5, pp. 162-169.
- Björnsson, L. (2000). Intensification of the biogas process by improved process monitoring and biomass retention. Doctoral Dissertation at Department of Biotechnology, Lund University, Sweden.
- Blum, D. J. W. and Speece, R.E. 1991. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparison and correlations. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 63(3), 198-207.
- Boullagui, H, Touhami, Y, Ben Cheikh, R, Hamdi, M, 2005. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*. Vol. 40, pp. 989-995.
- Buchauer, K. 1998. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes. *Water SA*. Vol. 24, No. 1, pp. 49-56.
- Burak. Demirel and Orhan Yenihun. 2002. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of chemical technology and biotechnology*. Vol 77, pp. 743-745.
- Cammarota, M. C., Freire D. M. G. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*. Vol. 97, pp. 2195-2210.
- Collerane, E, Concannon, F, Golden, T, et al. 1992. Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Water Science and Technology*. Vol. 25, Issue 7, pp. 31-40.
- Cullis, IF, Saddler, JN, Mansfield, SD. 2004. Effect of Initial Moisture Content and Chip Size on the Bioconversion Efficiency of Softwood Lignocellulosics. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 85, No. 4, pp. 413-421.

- Delgado, S, Diaz, F, Villarroel, R, Vera, L, Diaz, R, Elmaleh, S. 2002. Influence of biologically treated wastewater quality on filtration through a hollow-fibre membrane. *Desalination*. Vol. 146, Issue 1-3, pp. 459-462.
- Diamantis, V, Melidis, P, Aivasidis, A, 2006. Continuous determination of volatile products in anaerobic fermenters by on-line capillary gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 573-574, pp. 189-194.
- Dores, G, Björnsson, L, Madelana A, Mattiasson, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste – Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium. (manuscript).
- Edward, A, Raphael, L, Michael, E, 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current options in biotechnology*. Vol. 18, pp. 237-245.
- Gail Lorenz Miller. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, No. 3, March 1959, pp. 426-428.
- Galbe, Mats & Zacchi, Guido. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. Vol. 108, pp. 41-65.
- Gallert, C. and Winter, J. 2002. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturewissenschaften*. Vol. 89, pp. 483-496.
- Gamze, Güngör-Demirci, Göksel, N. Demirer. 2004. Effect of initial COD concentration, nutrient addition, temperature, and microbial acclimatation on anaerobic treatability of broiler and cattle manure. *Bioresource technology*. Vol. 93, pp. 109-117.
- Garcia, AB, Guimaraes, DM, Cammarota, MC. 2007. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. *International biodeterioration & biodegradation*. Vol. 60, pp. 219-225.
- Gijzen, HJ, Lubberding, HJ, Verhagen, FJ, Zwart, KB & Vogels, GD. 1987. Application of rumen microorganisms for an enhanced anaerobic degradation of solid organic waste materials. *Biological Wastes*. Vol. 22, pp. 81-95.
- Gujer, W, Zehnder, AJB. 1983. Conversion Processes in Anaerobic-Digestion. *Water Science and Technology*. Vol. 15, Issue 8-9, pp. 181-182.
- Gurgo e Cirne D. 2006. Evaluation of Biological Strategies to Enhance Hydrolysis During Anaerobic Digestion of Complex Waste. Doctoral thesis. Lund University - Sweden.
- Hawkes, F. R. and Hawkes, D. L. 1987. Anaerobic digestion, pp. 337-358. In Bu'lock, J. and Kristiansen, B. (ed.), *Basic Biotechnology*, Academic Press, London.

Hofvendahl, K, Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 26, Issue: 2-4, pp. 87-107.

Hulshoff, Po, L. W. 1998. *Anaerobic waste water treatment, a short course*. Delf, Holland.

IEA BIOENERGY. 2001. *Biogas and more!*

Itodo, I, Awulu, J, 1999. Effects of total solids concentrations of poultry, cattle, and piggery waste slurries on biogas yield. *Technical Notes*. Vol. 42(6), pp. 1853-1855.

Jacobus, P.H. van Wyk. 2001. Biotechnology and the utilization of the biowaste as a resource of bioproduct development. *TRENDS biotechnology*. Vol. 19, no. 5.

Jaeger, KE, Ransac, S, Dijkstra, BW, et al. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 15, Issue: 1, pp. 29-63.

Jain, SR and Mattiasson, B. 1998. Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. *Biotechnology Letters*. Vol. 20, No. 8, pp. 771-775.

Kalra M. S. and Panwar J. S. 1986. Anaerobic Digestion of Rice Crop Residues. *Agricultural Wastes*. Vol 17, pp. 263-269.

Ken, K, Don, A, JP, Batmale, John, B, Brad, R, & Dara, S, 2005. *Biomethane from Dairy Waste - A Sourcebook for the Production and Use of Renewable Natural Gas in California*. Prepared for Western United Dairymen Michael Marcsh. Chief Executive Officer.

Khalil, AI, Beheary, MS, Salem, EM. 2001. Monitoring of microbial populations and their cellulolytic activities during the composting of municipal solid wastes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 17, pp. 155-161.

Klass, DL. 1984. Energy from biomass and wastes. *Bio-technology*. Vol. 2, Issue 5, pp. 434-438.

Kole MM, Draper I, Gerson FD. Protease production by bacillus subtilis in oxygen controlled glucose feed batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988; 28:404-408.

Larreta, J, Vallejo, A, Bilbao, U, Arana, G, Zuloaga, O. 2006. Experimental design to optimise the analysis of organic volatile compounds in cow slurry by headspace solid-phase microextraction-gas. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1136, pp. 1-9.

Mah, R, A, 1982. Methanogenesis and Methanogenic partnerships. *Phylosophical Transactions Royal Society London*, B297. Pp. 599-616.

Mansfield SH, Mooney C, Saddler JN. 1999. *Biotechnology Prog* 15:804.

- Mata-Alvarez et al. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. Vol. 74, pp. 3-16.
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, No. 3. pp. 426-428.
- Moosbrugger, RF, Wentzel, MC, Ekama, GA and Marais, GvR. 1993. Weak acid/base and pH controls in anaerobic systems-review. *Water SA*. Vol. 19, pp. 1-10.
- Mosey, F, E, and Fernandez, X. A. 1989. Patterns of hydrogen in biogas from anaerobic digestion of milk-sugars. *Water Science and Technology*. Vol. 21, pp. 187-196.
- Mulholland, KL, Sylvester, RW, Dyer, JA. 2000. Sustainability: Waste minimization, green chemistry and inherently safer processing. *Environmental Progress*. Vol. 19, Issue: 4, pp. 260-268.
- Ndegwa PM, Hamilton DW, Lalman JA, Cumba HJ. 2008. Effects of cycle-frequency and temperature on the performance of Anaerobic Sequencing Batch Reactors (ASBRs) treating swine waste. *Biosource Technology*. Vol. 99, pp. 1972-1980.
- Nyns, E, J, 1986. Biomethanation processes, pp. 207-267. In Schönborn, W. (ed.), *Microbial Degradations*, Vol. 8. Wiley-VCH Weinheim, Berlin.
- Parawira, W. (2004). Anaerobic treatment of agricultural residues and wastewater. Doctoral Dissertation at Department of Biotechnology, Lund University, Sweden.
- Parawira, W., Murto, M., Zvauya, R., & Mattiasson, B. (2004). Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. Lund University, Sweden, *Renewable Energy*. Vol. 29, pp. 1811-1823.
- Patel, M, von Thienen, N, Jochem, E, Worrell, E. 2000. Recycling of plastics in Germany. *Resources Conservation & Recycling*. Vol. 29, pp. 65-90.
- Pérez, J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martinez J, 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*. Vol. 5, pp. 53-63.
- Pind, PF, Angelidaki, I, Ahring, BK. 2003. A new VFA sensor technique for anaerobic reactor systems. *Biotechnol Bioeng* Vol. 82, pp. 56-61.
- Purdy, KJ, Munson MA, Cresswell-Maynard T, Nedwell DB, Embley TM. 2003. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in a UK estuary. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 44, pp. 361-371.

Quispe, D., Alvarez, T. & Giménez, A. (2005). Establecimiento de las condiciones para laproducción de biogás a partir de ácidos grasos volátiles obtenidos de la hidrólisis anaeróbica de la papa (*Solanum tuberosum*) a nivel de laboratorio. Tesina de Licenciatura, IIFB, UMSA, La Paz-Bolivia.

Saint-Joly, C, Desbois, S, Lotti, JP. 2000. Determinant impact of waste collection and composition on anaerobic digestion performance: industrial results. *Water Science and Technology*. Vol. 41 Issue: 3, pp. 291-297

Sarapatka, B. 1994. Factors influencing biogas production during full-scale anaerobic fermentation of farmyard manure. *Bioresource Technology*. Vol. 49, pp. 17-23.

Sekiguchi, Y, Kamgata, Y, Harada H. 2001. Recent advances in methane fermentation technology. *Current Options in Biotechnology*. Vol. 12, pp. 277-282

Schanbacher, FL, Willett LB, Borger DC, Neiswander RL, Gratz M. 2005. Bioprocess associated with anaerobic digestion of manures and food wastes for the production of biogas. *Animal Waste Management Symposium*.

Shea, T. G., Pretorius W. A., Cole, R. D. and Pearson, E. A. 1968. Kinetics of Hydrogen assimilation in the methane fermentation. *Water Research*, Vol. 2, pp. 833-848.

Shink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 61, pp. 262-280.

Silversstein, Rebecca Anne. 2004. A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. Master of science thesis. Graduate Faculty of North Carolina State University.

Stroot, PG, McMahon, KD, Mackie, RI, Raskin, L. 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions-I. *Digester Performance Water*. *Water Research*. Vol. 35, No. 7, pp. 1804-1816.

Uzodinma, EO, Ofoefule, AU, Eze, JI, Mbaeyi, I, Onwuka, ND. 2008. Effect of some organic wastes on the biogas yield from carbonated soft drink sludge. *Scientific Research and Essay*. Vol. 3 (9), pp. 401-405.

Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T, R, Sangeeta K, Vineet. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques-a review. *Biosource Technology*. Vol. 95, pp. 1-10.

Yáñez, R, Alonso, JL, Parajó, JC. 2006. Enzymatic saccharification of hydrogen peroxide-treated solids from hydrothermal processing of rice husks. *Process Biochemistry*. Vol 41, pp. 1244-1252.

Ye Sun, Jiayang Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. Vol. 83, pp. 1-11.

Zhang, B, He, P, Lu, F, Shao, L, Wang, P. 2007. Extracellular enzyme activities during regulated Hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Research*. Vol. 41, pp. 4468-4478.

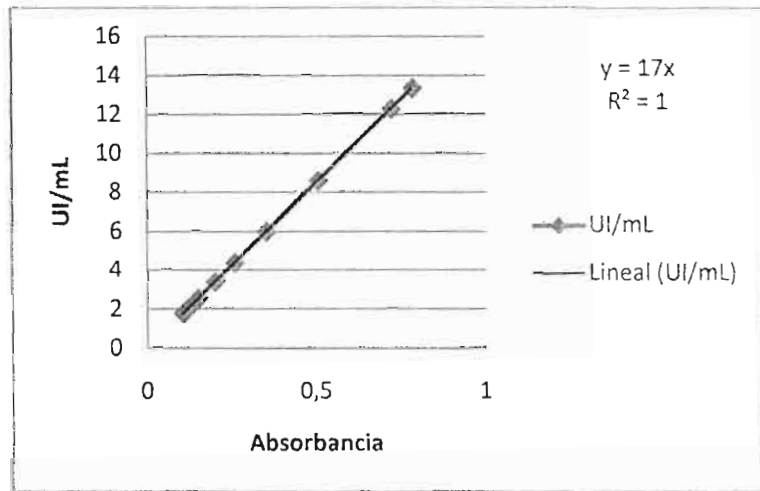
Capítulo XI

ANEXOS

ANEXO A

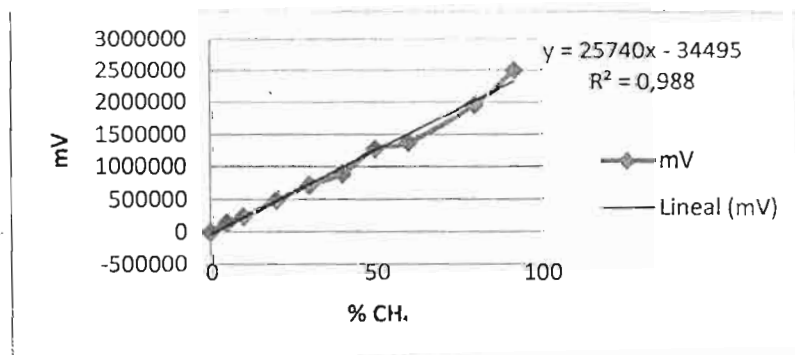
CURVA DE CALIBRACION PARA LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Abs	UI/mL
0.7855	13.3535
0.7234	12.2978
0.5064	8.6088
0.3532	6.0044
0.2586	4.3962
0.1996	3.3932
0.1494	2.5398
0.1275	2.1675
0.1194	2.0298
0.1059	1.8003
0.1137	1.9329



CURVA DE CALIBRACION DE PORCENTAJE DE METANO

% CH ₄	mV
0	0
5	145999
10	240376
20	492620
30	727238
40	895466
50	1275832
60	1373099
80	1960583
92	2505256



ANEXO B

PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO BASAL PARA CULTIVOS ANAEROBICOS

Se preparan las siguientes soluciones y reactivos.

Solución A

- ✓ NH_4Cl 100 g/L
- ✓ NaCl 10 g/L
- ✓ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L
- ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L

Solución B

- ✓ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 200 g/L

Solución 2

- ✓ $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L
- ✓ H_3BO_3 60 mg/L
- ✓ HCl (25%) 6,5 mL/L
- ✓ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 120 mg/L
- ✓ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100mg/L
- ✓ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25mg/L
- ✓ $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25mg/L
- ✓ ZnCl_2 70 mg/L
- ✓ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L

Solución 3

- ✓ NaSeO_3 3 mg/L
- ✓ NaOH 0,5 g/L

Solución 4

- ✓ NaHCO_3 8,5 g/100 mL

Solución 7

- ✓ Biotina 1 mg
- ✓ PABA 5 mg
- ✓ Vit. B12 5 mg
- ✓ Tiamina 10 mg

Tioglicolato de sodio 2,5 g/100 mL

Preparación final

Para un litro de medio de cultivo

- ✓ Solución A: 10 mL
- ✓ Solución B: 2 mL
- ✓ Solución 2: 1 mL
- ✓ Solución 3: 1 mL
- ✓ Solución 4: 30 mL

Llevar a un volumen final de 1 L y esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C y 1,5 atm de presión. Añadir en condiciones de esterilidad:

- ✓ Solución 7: 1 mL
- ✓ Solución de tioglicolato de sodio: 2 mL

Referencia:

Kole MM, Draper I, Gerson FD. Protease production by bacillus subtilis in oxygen controlled glucose feed batch fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988; 28:404-408.

ANEXO C

EFFECTO DEL TIPO DE CONSORCIO, SUBSTRATO Y TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCION DE AGVs COMO PRODUCTO FINAL DE HIDRÓLISIS ANAERÓBICA Y SOBRE LA ALCALINIDAD DEL MEDIO

Análisis de regresión múltiple para determinar que variables influyen en la producción de AGVs

Regression Summary for Dependent Variable: VFA mg/L (Spreadsheet1)

R= .94851397 R²= .89967876 Adjusted R²= .86205829

F(3,8)=23.915 p<.00024 Std.Error of estimate: 489.36

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(8)	p-level
Intercepto			-224953	33687.56	-6.67762	0.000156
Consortio	-0.088673	0.111983	-137	173.01	-0.79184	0.451290
Substrato	0.940423	0.111983	2373	282.53	8.39792	0.000031
Temperatura	0.086142	0.111983	24	31.39	0.76924	0.463855

Análisis de regresión múltiple para determinar que variables influyen en la alcalinidad

Regression Summary for Dependent Variable: pH (Spreadsheet1)

R= .97492060 R²= .95047018 Adjusted R²= .93189649

F(3,8)=51.173 p<.00001 Std.Error of estimate: .25183

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(8)	p-level
Intercepto			176.5845	17.33630	10.1858	0.000007
Consorcio	0.095001	0.078684	0.1075	0.08904	1.2074	0.261771
Substrato	-0.965995	0.078684	-1.7850	0.14540	-12.2768	0.000002
Temperatura	-0.091098	0.078684	-0.0187	0.01616	-1.1578	0.280357

EFEECTO DE LA PROPORCION DE LA MATERIA ORGANICA Y EL TIPO DE CONSORCIO HIDROLITICO SOBRE LA PRODUCCION DE AGVs

Regresión múltiple

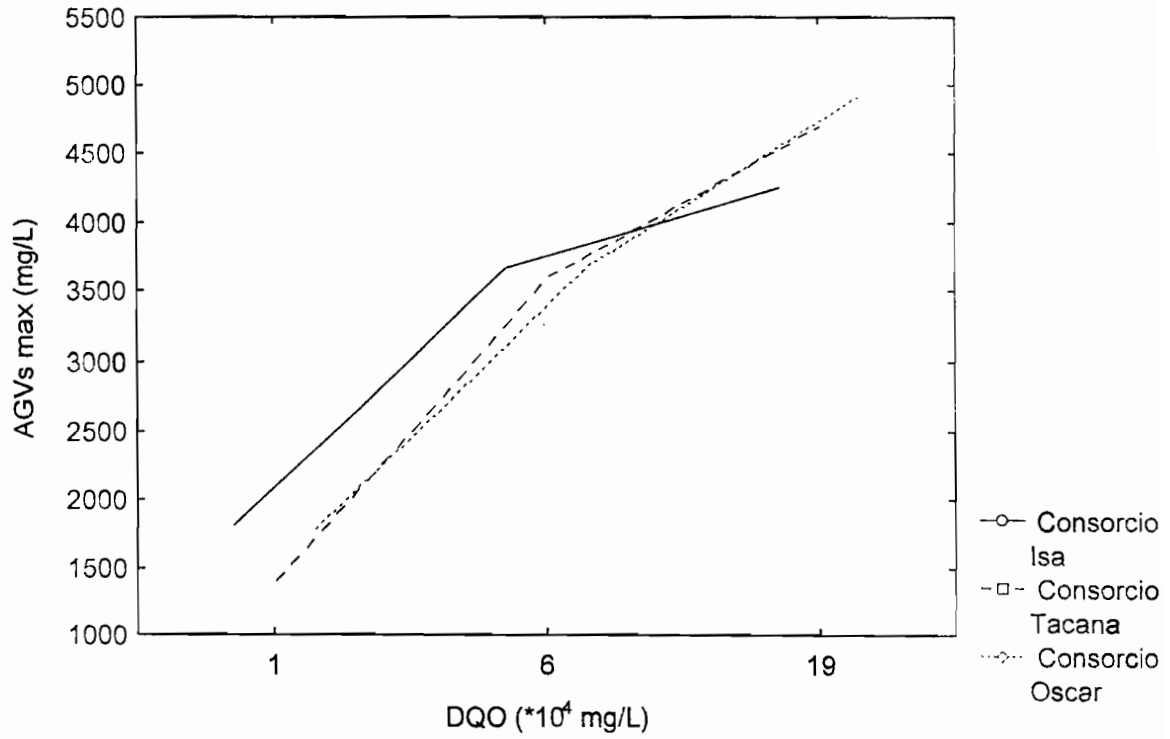
Regression Summary for Dependent Variable: AGVs max (mg/L) (proporción y consorcios)

R= .88830296 R²= .78908215 Adjusted R²= .71877620

F(2,6)=11.224 p<.00938 Std.Error of estimate: 700.31

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(6)	p-level
Intercept			-9298.24	29164.18	-0.318824	0.760667
Consortio	0.072137	0.187491	110.00	285.90	0.384750	0.713691
DQO (*10⁴ mg/L)	0.885369	0.187491	152.31	32.25	4.722188	0.003251

Consortio*DQO ($\cdot 10^4$ mg/L); LS Means
Current effect: $F(4, 0)=-$, $p=-$
Effective hypothesis decomposition
Vertical bars denote 0.95 confidence intervals



Análisis estadístico de la velocidad de producción de AGVs (Qp)

Análisis de regresión múltiple

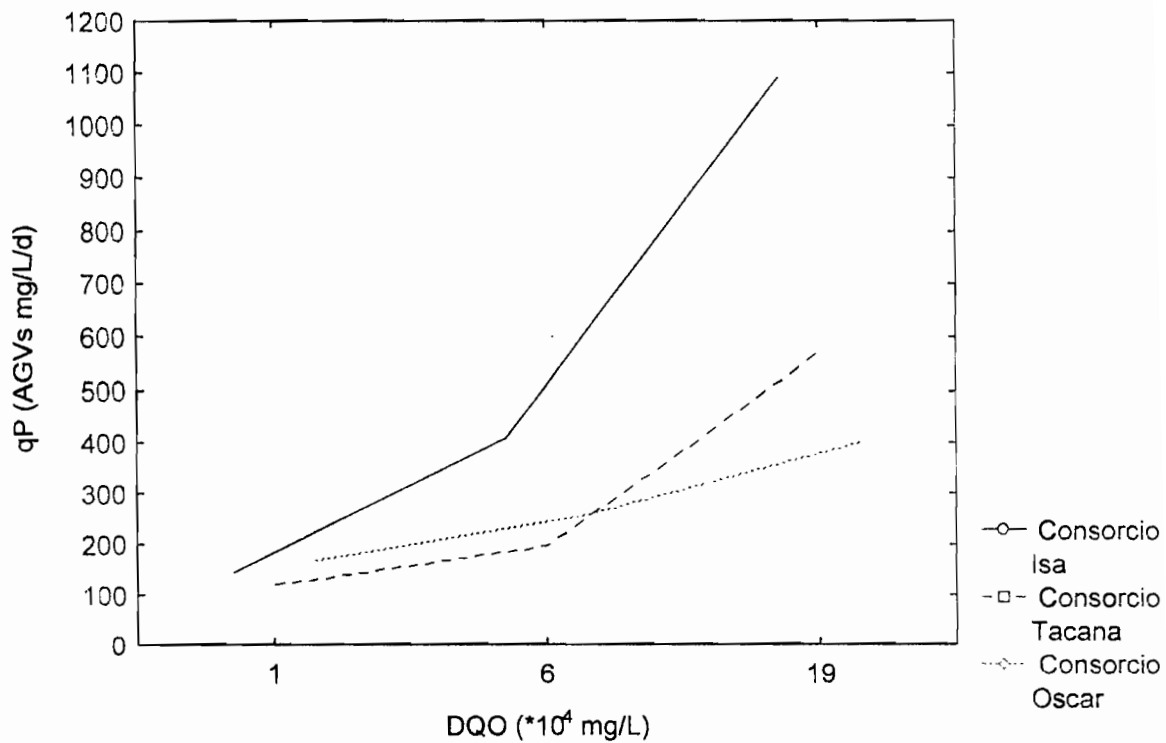
Regression Summary for Dependent Variable: Qp (AGVs mg/L/d) (proporción y consorcios)

R= .87973004 R²= .77392494 Adjusted R²= .69856659

F(2,6)=10.270 p<.01155 Std.Error of estimate: 169.08

	Beta	Std.Err. B	Std.Err. t(6)	p-level		
Intercept		13955.55	7041.264	1.98197	0.094765	
Consorcio	-0.382450	0.194111	-136.00	69.026	-1.97026	0.096315
DQO (*10⁴ mg/L)	0.792248	0.194111	31.78	7.787	4.08141	0.006492

Consorcio*DQO ($\cdot 10^4$ mg/L); LS Means
Current effect: $F(4, 0) = \dots$, $p = \dots$
Effective hypothesis decomposition
Vertical bars denote 0.95 confidence intervals



ANEXO D

EFFECTO DE LA PROPORCION DE LOS SUBSTRATOS EN LOS ENSAYOS DE CODIGESTION.

Efecto sobre la producción final de AGVs

Regression Summary for Dependent Variable: AGVs (Spreadsheet3)

R= .17437238 R²= .03040573 Adjusted R²= -----

F(1,5)=.15680 p<.70846 Std.Error of estimate: 580.82

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			3593.857	490.8851	7.321178	0.000745
Experimento	0.174372	0.440362	43.464	109.7652	0.395975	0.708456

Efecto sobre la productividad volumétrica Qv

Regression Summary for Dependent Variable: Qv (Spreadsheet3)

R= .29831112 R²= .08898952 Adjusted R²= -----

F(1,5)=.48841 p<.51580 Std.Error of estimate: 45.548

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			164.3529	38.49545	4.269410	0.007943
Experimento	-0.298311	0.426851	-6.0157	8.60785	-0.698864	0.515801

Efecto sobre la actividad amilolítica

Regression Summary for Dependent Variable: Amilasas (Spreadsheet3)

R= .20672385 R²= .04273475 Adjusted R²= -----

F(1,5)=.22321 p<.65651 Std.Error of estimate: .24400

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			0.421429	0.206218	2.043603	0.096425
Experimento	-0.206724	0.437553	-0.021786	0.046112	-0.472454	0.656505

Efecto sobre la actividad celulolítica.

Regression Summary for Dependent Variable: Celulasas (Spreadsheet3)

R= .30239884 R²= .09144506 Adjusted R²= -----

F(1,5)=.50324 p<.50978 Std.Error of estimate: .14386

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			0.338571	0.121580	2.784769	0.038683
Experimento	-0.302399	0.426276	-0.019286	0.027186	-0.709397	0.509779

Efecto sobre la actividad xilanolítica

Regression Summary for Dependent Variable: Xilanasas (Spreadsheet3)

R= .41389498 R²= .17130906 Adjusted R²= .00557087

F(1,5)=1.0336 p<.35596 Std.Error of estimate: .10967

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			0.348571	0.092689	3.76064	0.013149
Experimento	-0.413895	0.407110	-0.021071	0.020726	-1.01667	0.355955

Efecto sobre la actividad pectinolítica

Regression Summary for Dependent Variable: Pectinasas (Spreadsheet3)

R= .01450647 R²= .00021044 Adjusted R²= ----

F(1,5)=.00105 p<.97538 Std.Error of estimate: .00583

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			0.038714	0.004923	7.863335	0.000534
Experimento	-0.014506	0.447167	-0.000036	0.001101	-0.032441	0.975376

Efecto sobre la actividad proteolítica

Regression Summary for Dependent Variable: Proteasas (Spreadsheet3)

R= .98237121 R²= .96505320 Adjusted R²= .95806384

F(1,5)=138.07 p<.00008 Std.Error of estimate: .10261

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(5)	p-level
Intercepto			1.134286	0.086720	13.07982	0.000047
Experimento	0.982371	0.083602	0.227857	0.019391	11.75052	0.000079