



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

INFLUENCIA DEL ORIGEN DEL INOCULO Y
DE LA RELACION INICIAL
SUSTRATO/MICROORGANISMO (So/Xo)
EN LA PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD
ANAEROBIA



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

PRESENTA
IVAN MORENO ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GERMAN BUITRÓN MENDEZ

MEXICO, D. F.



JULIO 2003

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de junio de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del alumno(a) **Moreno Andrade Iván**, con número de cuenta 501093707, con la tesis titulada: "Influencia del origen del inóculo y de la relación inicial sustrato/microorganismos (So/Xo) en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.", bajo la dirección del(a) **Dr. Germán Buitron Méndez**.

Presidente:	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Vocal:	Dra. Nathalie Cabrol
Secretario:	Dr. Germán Buitrón Méndez
Suplente:	Dr. Carlos Huitrón Vargas
Suplente:	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de junio de 2003.


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

APOYOS RECIBIDOS:

Beca del CONACYT para la realización de los estudio de maestría.

Beca de la DGEP para la realización de los estudio de maestría.

Al patrocinio de la DGAPA-UNAM por medio del proyecto PAPIIT IN112800.

JURADO:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel, Instituto de Ciencias Biomédicas

Dr. Germán Buitrón Méndez, Instituto de Ingeniería

Dra. Natalie Cabirol, Instituto de Ingeniería

Dr. Carlos Huitrón Vargas, Instituto de Ciencias Biomédicas

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, Facultad de Química

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por el apoyo brindado a la realización del presente trabajo.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por sus valiosas enseñanzas, por su amistad y el apoyo que siempre me ha brindado.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel y al Dr. Carlos Huitrón Vargas, miembros del comité tutorial y del jurado por su asesoría y aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Nathalie Cabirol y al Dr. Víctor M. Luna Pabello, miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones.

A mis compañeros del cubículo 411-A del Instituto de Ingeniería: Maribel Quezada, Alejandro Fonseca, Daniel García, Leonardo Jiménez, Lourdes Cruz, Laura Ojeda, Ma-Eve Schoeb, Mario Chew, Emilio Zúñiga, Luis Juárez, Wilder Rodríguez, Rafael Machado, David Martínez, maese Ramón Jiménez, Chucho Balam Jiménez, Ernesto Calderón (Netín), Mario García, por haberme brindado su amistad.

A los compañeros Patricia (Patito), Miguel Ángel (Moroco), Erick, Alejandro, Almita, Laura, Manuel Betancur por brindarme su amistad y hacer ameno el trabajo de laboratorio.

A Gloria Moreno R. por el apoyo técnico en el trabajo de investigación.

A CONACYT y DGEP por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme terminar esta fase de mi vida, por guiarme y estar junto a mi en todo momento.

AL MOTOR DE MI VIDA

A mi esposa Ariane Frinette por ser mi mejor amiga, por apoyarme incondicionalmente, por hacerme el hombre más feliz del mundo, por ser la mayor parte de mi ser y por el amor que me brinda a cada momento.

Te amo.

A MI FAMILIA

A mi papá Juan Manuel Moreno, a mi mamá Esmeralda Andrade, a mis hermanas Esmeralda y Alejandrina por toda una vida de cariño y felicidad con ustedes.

A mi abi Ma. Luisa Buendía, mi tía Blanca Moreno y mi tío Julián Moreno, por su cariño.

A LA FAMILIA ZALDIVAR MARTINEZ

Al Sr. Jaime Zaldívar, a la Sra. Ma. Elena Martínez, a Daniel y Antonio por permitirme ser su amigo y mostrarme su gran corazón.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	IX
OBJETIVOS	X
HIPÓTESIS	X
CAPITULO 1	
CONCEPTOS BÁSICOS	1
1.1 Digestión Anaerobia.....	1
1.1.1 Microorganismos que intervienen en la digestión anaerobia.....	1
1.1.1.1 Bacterias Hidrolíticas Fermentadoras.....	2
1.1.1.2 Bacterias acetógenicas.....	2
1.1.1.3 Bacterias metanogénicas.....	3
1.1.1.4 Bacterias sulfatorreductoras.....	3
CAPITULO 2	
ANTECEDENTES	5
2.1 Pruebas de biodegradabilidad anaerobia.....	5
2.1.1 Factores que afectan la prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	7
2.1.1.1 Origen del inóculo.....	9
2.1.1.2 Relación So/Xo.....	10
2.2 Prueba de inhibición metanogénica.....	12
CAPITULO 3	
METODOLOGÍA	13
3.1 Desarrollo experimental.....	13
3.2 Prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	13
3.3 Influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	15
3.3.1 Fuentes de inóculo.....	15
3.3.1.1 Caracterización del inóculo.....	15
3.3.1.1.1 Cuantificación de los grupos de bacterias anaerobias.....	15
3.3.2 Condiciones iniciales de la prueba.....	16

3.4 Influencia de la relación inicial So/Xo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	16
3.4.1 Fuente de inóculo.....	16
3.4.2. Condiciones iniciales de la prueba.....	16
3.5 Influencia de la relación inicial So/Xo en la prueba de inhibición metanogénica.....	17
3.5.1 Fuente de inóculo.....	17
3.4.2 Prueba de inhibición metanogénica.....	18
3.4.3 Condiciones iniciales.....	18
3.6 Análisis estadístico.....	19

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 20

4.1 Influencia del origen del inóculo.....	20
4.1.1 Caracterización del inóculo.....	20
4.1.1.1 Cuantificación de las bacterias anaerobias.....	20
4.1.2 Prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	21
4.2 Influencia de la relación So/Xo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	23
4.2.1 Influencia de la So/Xo sobre el tiempo de latencia.....	27
4.2.2 Influencia de la So/Xo sobre la Actividad Metanogénica Específica.....	28
4.3 Influencia de la relación So/Xo en la prueba de inhibición metanogénica.....	29
4.3.1 Caracterización del inóculo.....	29
4.3.2 Prueba de inhibición metanogénica.....	30
4.3.3 Influencia de la Actividad metanogénica específica inicial del inóculo en la inhibición.....	30
4.3.4 La inhibición como una función de So/Xo, cuando So es la concentración inicial de sustrato (glucosa).....	31
4.3.5 La inhibición como una función de So/Xo, cuando So es la contracción inicial de 4CF.....	32

CAPITULO 5

CONCLUSIONES..... 35

CAPITULO 6

REFERENCIAS.....37

ANEXOS

ANEXO 1	Prueba de biodegradabilidad anaerobia
ANEXO 2	Prueba del número más probable (NMP)
ANEXO 3	Datos del desarrollo de las pruebas de biodegradabilidad
ANEXO 4	Lista de publicaciones

ABREVIATURAS

AGV	Ácidos grasos volátiles
AME	Actividad Metanogénica Específica
d	Días
DQO	Demanda Química de Oxígeno
F	Fermentativas
FeS	Sulfuro de fierro
g	Gramo
h	Hora
in	pulgada
IVL	Índice volumétrico de lodos
L	Litro
lb	libra
MA	Metanogénicas acetoclásticas
mg	Miligramo
MH	Metanogénicas hidrogenófilas
mL	Mililitro
mmol	Milimoles
NAD	Nicotinamida-adenina dinucleótido
NMP	Número más probable
OPHA	Bacterias acetoclásticas productoras obligadas de hidrógeno
ORP	Potencial de oxido-reducción
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
So	Sustrato inicial
So/Xo	Relación inicial Sustrato/Microorganismo
SR	Sulfato-reductoras
SSF	Sólidos suspendidos fijos
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
ST	Sólidos totales
TL	Tiempo de latencia
TR	Tiempo de retención
UASB	Reactor anaerobio de lecho de lodos y flujo ascendente
VS	Velocidad de sedimentación
Xo	Microorganismos o Biomasa inicial
Yobs	Tasa de crecimiento de los microorganismos
4CF	4-clorofenol



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 Métodos para determinar la biodegradabilidad anaerobia por medio de la medición de biogás.....	6
Tabla 3.1 Condiciones iniciales de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con distintas So/Xo.....	17
Tabla 4.1 Resultados de la caracterización de inóculos de distintos orígenes.....	20
Tabla 4.2 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con dos sustratos (glucosa y fenol) (50 mg/L) y diferentes inóculos (50 mg SSV/L).....	21
Tabla 4.3 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con distintas So/Xo y fenol como sustrato.....	24
Tabla 4.4 Resultados de la prueba de biogegradabilidad anaerobia con distintas So/Xo y fenol como sustrato.....	24
Tabla 4.5 Caracterización del inóculo.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1 Nomenclatura utilizada en la curva de producción de metano de la prueba de biodegradabilidad anaerobia.....	14
Figura 4.1 Resultados de la caracterización del inóculo dependiendo de la cantidad de bacterias de los grupos fisiológicos.....	21
Figura 4.2 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia (promedios): Glucosa (50 mg/L), Biomasa (50 mg/L).....	22
Figura 4.3 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia (promedios): Fenol (50 mg/L), Biomasa (50 mg/L).....	23
Figura 4.4 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con glucosa. $S_o=500$ mg/L y distintas concentraciones iniciales de microorganismos.....	25
Figura 4.5 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con fenol. $S_o=520$ mg/L y distintas concentraciones iniciales de microorganismos.....	25
Figura 4.6 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con glucosa normalizada, $X_o=2000$ mg/L y distintas concentraciones iniciales de sustrato.....	26
Figura 4.7 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con fenol normalizada, $X_o=2000$ mg/L y distintas concentraciones iniciales de sustrato.....	26
Figura 4.8 Comparación de los tiempos de latencia con distintos valores de S_o/X_o con glucosa como sustrato. Los valores de S_o/X_o similares tienen distintos valores de concentración inicial en la sustrato y microorganismos.....	27
Figura 4.9 Comparación de los tiempos de latencia con distintos valores de S_o/X_o con fenol como sustrato. Los valores de S_o/X_o similares tienen distintos valores de concentración inicial en la sustrato y microorganismos.....	27
Figura 4.10 Comparación de la actividad metanogénica específica con distintos valores de S_o/X_o con fenol como sustrato. Los valores de S_o/X_o similares tienen distintos valores de la concentración inicial de sustrato y microorganismos.....	28
Figura 4.11 AME en función de $X_o=1000$ mgSSV/L y distintas concentraciones iniciales de fenol (S_o).....	29
Figura 4.12. Influencia de la S_o/X_o , sobre la AME en la prueba de biodegradabilidad anaerobia, utilizando como sustrato distintas cantidades de fenol.....	29

Figura 4.13	Curva de producción de metano durante la prueba de inhibición metanogénica. $S_o/X_o=2$ (1000 mg/L glucosa/500 mg/L SSV) y diferentes concentraciones iniciales de 4CF.....	30
Figura 4.14	Prueba de inhibición metanogénica para el inoculo con y sin alimentación de etanol con diferentes concentraciones de 4CF y $S_o/X_o = 1$ (1000 mg glucosa/1000 mg SSV).....	31
Figura 4.15	Influencia de S_o/X_o , con respecto a la glucosa (S_o) en la prueba de inhibición anaerobia.....	32
Figura 4.16	Influencia de la S_o/X_o , considerando como S_o al 4CF, en la prueba de inhibición anaerobia.....	33
Figura 4.17	Comparación de la inhibición de valores iguales de S_o/X_o bajo diferentes condiciones iniciales.....	33

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la influencia del origen del inóculo y de la relación de concentración inicial sustrato/microorganismo (S_0/X_0) sobre la prueba de biodegradabilidad anaerobia y la prueba de inhibición metanogénica. Para conocer las diferencias del inóculo por su origen, se evaluó el desarrollo de la prueba con cinco diferentes fuentes de inóculo y dos sustratos, uno fácilmente biodegradable (glucosa) y otro tóxico (fenol). Los inóculos fueron caracterizados por medio de la determinación de la concentración de sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos, actividad metanogénica específica, índice volumétrico de lodos, velocidad de sedimentación, tamaño de gránulos (análisis granulométrico), potencial de oxidación-reducción y la cuantificación de los grupos de bacterias anaerobias con el fin de conocer las condiciones iniciales del inóculo. Se estudio la influencia de la aclimatación del inóculo y la relación S_0/X_0 sobre la inhibición de la producción de metano debido al 4-clorofenol empleando diferentes condiciones iniciales para la prueba. La mejor respuesta en términos de porcentaje de biodegradabilidad, tiempo de latencia y actividad metanogénica específica, para ambos sustratos, se obtuvo con un inóculo obtenido de un reactor anaerobio que degrada aguas residuales de la industria cervecera. Los resultados muestran que uno de los parámetros más importantes que determinan si el inóculo tendrá una buena respuesta en la prueba es la actividad metanogénica específica inicial. Se observó que la relación S_0/X_0 tiene una gran influencia sobre la prueba de biodegradabilidad anaerobia, ya que este determina la Actividad metanogénica específica, los tiempos de latencia e influye en el porcentaje de biodegradabilidad del compuesto a degradar. Se encontraron diferencias en la prueba de inhibición dependiendo de la S_0/X_0 con respecto a la glucosa como sustrato. Cuando los resultados son analizados con respecto al 4-clorofenol se observó que la inhibición disminuye cuando la S_0/X_0 es menor, además, para los mismos valores de S_0/X_0 existe un incremento de la inhibición cuando la cantidad inicial de biomasa disminuye. La aclimatación previa a etanol tiene una gran influencia ya que los porcentajes de inhibición se reducen notablemente. Los resultados subrayan la importancia de elegir adecuadamente las condiciones iniciales bajo las cuales las pruebas anaerobias serán realizadas, además, esto sugiere la necesidad de armonizar los protocolos referentes a estas pruebas con el fin de tener resultados similares sin importar el inóculo o sustratos empleados.

ABSTRACT

The influence of the origin of the inoculum and the initial substrate concentration to microorganism ratio (S_o/X_o) on the anaerobic biodegradability test and the methanogenic inhibition test, was studied. In order to know the differences of the inoculum by his origin, the test development was evaluated with five different sources of inoculum and two substrates, one easy to biodegrade (glucose) and another toxic (phenol). The inoculum were characterized in order to know the initial conditions. The influence to the acclimatization of inoculum and the S_o/X_o in the inhibition of the methane production due to the different concentrations of 4CF was studied. The best answer in terms of biodegradability percentage, lag time and the specific methanogenic activity, for both substrates, was obtained with the inoculum from an anaerobic reactor degrading wastewater of a brewery industry. The results show that one of the most important parameters that indicate the good answer of the inoculum in the anaerobic biodegradability test is the specific methanogenic activity. The S_o/X_o ratio has a great influence on the anaerobic biodegradability test. The results for each condition were different, an important parameter was the methanogenic activity specifies, since when increasing the S_o/X_o , this also increases. It was observed that the lag time also is influenced by the S_o/X_o . The inhibition test depends of the differences in the S_o/X_o ratio with respect to the glucose like substrate. When the results are analyzed with respect to the 4CF was observed that the inhibition diminishes when the S_o/X_o ratio is smaller. in addition, for same values of S_o/X_o an increase of the inhibition exists when the initial amount of biomass decrease. The previous acclimatization to ethanol has a great influence since the inhibition percentage are reduced. The results emphasize the importance of adequately choosing the initial conditions over which the anaerobic tests are conducted, and suggest the necessity to harmonize the referring protocols to these tests with the purpose of having similar results without concerning inoculum or used substrates.

INTRODUCCIÓN

Durante el tratamiento de aguas residuales por vía anaerobia, la materia orgánica utilizada como sustrato por los microorganismos, es transformada en una mezcla de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2), a la que se le conoce como biogás. Éste está constituido por un 70% de CH_4 y el resto por dióxido de carbono y trazas de otros gases como nitrógeno, hidrógeno, amonio y sulfuro de hidrógeno (usualmente menor del 1% del volumen total del biogás) (McInerney *et al.*, 1980). Una manera de llevar a cabo la prueba de biodegradabilidad anaerobia se basa en la medición del biogás producido por el tratamiento anaerobio, esta prueba nos permite evaluar la susceptibilidad de un efluente a ser tratado por esta vía, con lo cual es posible estimar el porcentaje de biodegradabilidad, los posibles efectos inhibidores y los tiempos de latencia.

Se han desarrollado diversas metodologías para medir el desarrollo de estas pruebas por medio de la cuantificación del biogás producido, por la forma manual (Owen, *et al.*, 1979), por medio de transductores de presión (Shelton y Tiedje, 1984) o por la automatización de la medición por sistemas que también involucran transductores de presión (Concannon *et al.*, 1988; Cohen 1992; Baumann y Muller, 1997; Valera *et al.*, 2002), en el presente trabajo, se empleó la metodología descrita por Shelton y Tiedje (1984), ya que pruebas realizadas por Battersby y Wilson en 1988 confirmaron que es una forma confiable de cuantificar el biogás producido durante la degradación de sustratos por vía anaerobia.

Entre las variables más importantes en esta prueba se encuentran el origen del inóculo (tratamientos industriales, municipales, sedimentos marinos, inóculos comerciales, etc.) y la relación sustrato/microorganismo (So/Xo). El origen del inóculo determina la actividad metanogénica inicial y las diferencias en cuanto a su composición microbiana, lo cual influye en el grado de adaptación al sustrato. La relación So/Xo es considerada por varios autores como uno de los factores más importantes ya que determina si las células de multiplicarán durante la biodegradación del sustrato (Chudoba *et al.*, 1992, 1992).

Diversas metodologías han sido propuestas para llevar a cabo las pruebas de biodegradabilidad anaerobia (EPA 712-C-98-090, 1998; ISO 11734, 1995; Pagga y Beinborn, 1993; Birch *et al.*, 1989), en las cuales no existe un control del inóculo ya que no se especifica la cantidad exacta o calidad del inóculo necesaria para la realización de las pruebas, con lo cual la relación So/Xo tampoco es controlada, así pueden existir distintos resultados al evaluar un mismo compuesto. Por lo anterior es importante conocer la influencia que tienen el origen del inóculo y de la relación So/Xo en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia, para poder mejorar y armonizar los protocolos referentes a estas pruebas con el fin de tener resultados similares para los mismos sustratos, independientemente de las condiciones iniciales empleadas.

En el presente trabajo se investigaron factores que no se toman en cuenta al realizar esta prueba como la función de la actividad metanogénica específica inicial en la elección de un inóculo, la variación de las respuestas en las pruebas de biodegradabilidad por las

condiciones iniciales empleada, la influencia de la actividad metanogénica específica inicial sobre la inhibición de microorganismos metanogénicos y el efecto de la cantidad inicial de microorganismos (X_0) sobre la biodegradabilidad, los cuales sin embargo, determinar el desarrollo y los resultados de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la influencia del origen del inóculo y de la relación inicial sustrato/microorganismo (So/Xo) sobre la prueba de biodegradabilidad anaerobia.

Objetivos Particulares

- Determinar la influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.
- Determinar la influencia de la relación sustrato/microorganismo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.
- Determinar la influencia de la relación sustrato/microorganismo sobre la Actividad metanogénica específica.
- Determinar la influencia de la relación sustrato/microorganismo en la prueba de inhibición metanogénica.

HIPÓTESIS

- Las características iniciales de las poblaciones microbianas influirán sobre el tiempo de latencia, la actividad metanogénica específica y el porcentaje de biodegradabilidad en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.

CAPITULO 1

CONCEPTOS BÁSICOS

1.1 Digestión Anaerobia

Los procesos biológicos han sido utilizados desde hace mucho tiempo para el tratamiento de aguas residuales, estos se pueden dividir de acuerdo al aceptor final de electrones involucrados en la vía metabólica de los microorganismos en dos procesos: procesos aerobios, en los cuales el oxígeno es el principal aceptor de electrones y los anaerobios que actúan en ausencia de oxígeno.

En los procesos anaerobios los compuestos oxidados como nitratos, sulfatos o CO_2 actúan como aceptores finales de electrones, de esta forma se tienen tres vías de degradación: desnitrificación, sulfato-reducción y metanogénesis.

En los procesos anaerobios el 90% de la energía contenida en la materia orgánica, es convertida en biogás y el 10% restante es asimilado por las células (Rozzi y Remigi, 2002).

Existen varias ventajas el utilizar los procesos anaerobios:

- Bajos costos de operación
- Por vía de la metanogénesis se obtiene metano como subproducto el cual puede ser utilizado como energético
- La biomasa puede permanecer mucho tiempo en ausencia de sustrato sin perder su actividad metabólica además de bajos requerimientos nutricionales
- Una buena retención de biomasa dentro del reactor por la capacidad de formar biopelículas o agregados granulares estos últimos poseen además una alta actividad metanogénica que les permite degradar altas concentraciones de sustrato en tiempos cortos
- Los microorganismos anaerobios pueden adaptarse a diversos tipos de aguas residuales y tiene la capacidad de soportar altas concentraciones de materia orgánica
- Produce un mínimo volumen de lodos de desecho

1.2 Microorganismos que intervienen en la digestión anaerobia

Los procesos de degradación anaerobia son realizados por un consorcio de microorganismos que actúan de una forma secuencial. Para que el proceso se realice adecuadamente debe existir una actividad de todos los grupos bacterianos involucrados puesto que el producto de las reacciones de un grupo sirve de sustrato para el siguiente, así se mantiene un equilibrio en las velocidades de formación y eliminación de intermediarios evitando así su acumulación.

Los microorganismos anaerobios, de acuerdo con el rango de temperatura en que se desarrollan se dividen en: psicrófilos (temperaturas inferiores a 20°C), mesófilos (20 a 40°C) y termófilos (45 a 65°C), en el caso de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia los microorganismos existentes en el consorcio actúan en una temperatura óptima de 35 a 37°C.

Los grupos bacterianos que participan en la degradación anaerobia son los siguientes:

1.2.1 Bacterias Hidrolíticas Fermentadoras

Las bacterias hidrolíticas producen las enzimas que se encargan de degradar los polímeros presentes en el agua residual (carbonatos, proteínas y lípidos) convirtiéndolos a compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, alcoholes, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos.

Las bacterias fermentadoras transforman los azúcares y aminoácidos en ácidos grasos volátiles (acetatos, propionatos, butiratos, valeratos), dióxido de carbono, hidrógeno y células, mientras que los lípidos y los ácidos grasos de cadena larga son convertidos en ácidos grasos volátiles, a través del mecanismo de β -oxidación (Saval, 1996).

Las bacterias fermentadoras e hidrolíticas tienen un funcionamiento ligado a la concentración de hidrógeno en el medio, si se encuentra en valores de 5-50 ppm, existe una preferencia hacia la producción de acetato, si rebasa ciertos valores, la producción de acetato baja y existe un aumento en la producción de otros ácidos grasos volátiles (AGV).

Los géneros de bacterias fermentadoras pertenecientes a este grupo son: *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Sarcina*, *Selenomonas*; y los géneros de bacterias hidrolíticas son: *Clostridium*, *Acetovibrio*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*.

1.2.2 Bacterias acetogénicas

Este grupo de bacterias transforma los ácidos grasos de cadena corta en acetato, dióxido de carbono, e hidrógeno, por un grupo denominado bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OPHA). Las OPHA se ven inhibidas por el hidrógeno que ellas mismas producen así que forman una relación sintrófica con las bacterias metanogénicas hidrogenófilas las cuales consumen el H₂ producido de tal forma que la actividad de las bacterias acetogénicas no sea inhibida, esta relación recibe el nombre de transferencia interespecie de oxígeno.

El hidrógeno es un intermediario importante en los organismos acetogénicos, este se produce durante la fermentación de carbohidratos y otros sustratos, y en la subsiguiente degradación del ácido propiónico y otros AGVs de alto peso molecular.

Los géneros de bacterias pertenecientes a este grupo son: *Syntrophomonas* y *Syntrophobacter*.

1.2.3 Bacterias metanogénicas

Las bacterias metanogénicas son las más sensibles a la temperatura puesto que alcanzan una actividad óptima en un intervalo de 35 a 37°C teniendo como límites de supervivencia de 30 a 40°C, aunque el proceso se puede dar a temperaturas más bajas o altas pero la eficiencia decae notablemente además de necesitar potenciales redox menores a -330 mV para mantener crecimiento de las bacterias y producción de metano (Scott, 1985). Este grupo se divide en dos subgrupos que son: Las bacterias metanogénicas acetoclásticas y las bacterias metanogénicas hidrogenófilas.

Las primeras tienen como función el convertir el ácido acético en biogás compuesto por metano y en menor proporción por dióxido de carbono. Existen fundamentalmente tres géneros de estas bacterias: *Methanosarcina*, *Methanospirillum* y *Methanotrix*.

Las bacterias metanogénicas hidrogenófilas coexisten con las bacterias acetogénicas pues catalizan la reacción entre el hidrógeno producido por estas últimas y el dióxido de carbono para producir metano. Estas bacterias controlan el potencial de oxidación-reducción (ORP) permitiendo a las bacterias acetogénicas recuperar el nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) necesario para la producción de acetato. Estas bacterias poseen seis coenzimas únicas para reducir el dióxido de carbono a metano, una de las más importantes es la Coenzima M la cual es un factor de crecimiento y sirve en la reacción como transportador de un metilo para la producción de metano (Stainer, 1963).

Los géneros pertenecientes a este subgrupo son: *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobrevibacterium* y *Methanoplanus*.

1.2.4 Bacterias sulfato-reductoras

La importancia de este grupo depende de la presencia de sulfatos en el agua residual a tratar. Este grupo se caracteriza por su capacidad para reducir los sulfatos a sulfuro de hidrógeno.

Algunas de estas bacterias realizan una relación sintrófica con las OPHA (de igual forma que las bacterias metanogénicas) para la obtención de los precursores necesarios para llevar a cabo su metabolismo. Así en presencia de sulfatos en el sustrato, las bacterias sulfato-reductoras tienden a sustituir a las metanogénicas.

Existen dos grupos de bacterias sulfato-reductoras. En el grupo I crecen en presencia de lactato y sulfato pero no pueden utilizar acetato, propionato o butirato como único donador

de electrones y fuente de carbono, en este grupo destacan los géneros *Desulfomonas* y *Desulfovibrio*.

Las bacterias del grupo II pueden utilizar los ácidos grasos volátiles y benzoato, también pueden crecer quimioautotórficamente con hidrógeno o formato como donadores de electrones y dióxido de carbono como única fuente de carbono. Los géneros representativos son *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina*.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Pruebas de biodegradabilidad anaerobia

La biodegradación es definida como el proceso de degradación microbiana de sustancias orgánicas complejas en sustancias más sencillas. La degradación puede ser primaria o última. La biodegradación primaria se refiere a la desaparición de la sustancia original, y por lo tanto a los estadios iniciales de este proceso, es decir solo contempla cambios estructurales del compuesto. La biodegradación última o completa se refiere al proceso mediante el cual se lleva a cabo la transformación total de una sustancia orgánica compleja en metano, dióxido de carbono, sales minerales y constituyentes del material celular (biomasa)(Cardinale *et al.*, 1996).

Las biodegradación primaria no nos dice nada sobre el destino final de una sustancia, es decir, si se mineraliza completamente o forma sustancias intermediarias recalcitrantes, en cambio en la biodegradación completa el resultado de la degradación de estos compuestos va a ser total sin producir intermediarios tóxicos, así los beneficios ambientales de una degradación completa, incluyen concentraciones ambientales más bajas, niveles más altos en los márgenes de seguridad y la ausencia de residuos o metabolitos intermediarios persistentes que se pudieran acumular en el ambiente.

Las pruebas de biodegradabilidad anaerobia nos permiten evaluar la susceptibilidad de un efluente a ser tratado por esta vía. En este sentido es posible estimar las máximas concentraciones permitidas, los efectos inhibidores así como las eficiencias máximas de remoción esperadas durante el tratamiento del efluente (Moreno y Buitrón, 1996).

En las pruebas de biodegradabilidad anaerobia la materia orgánica que eventualmente puede ser utilizada como sustrato por los microorganismos es transformada en biogás el cual es una mezcla de metano (55 a 75%), dióxido de carbono (25 a 40%), y trazas de otros gases como son el hidrógeno y nitrógeno. En la composición del biogás también se encuentran presentes el H₂S el cual es proveniente del azufre mineral u orgánico presente en los efluentes brutos y/o el NH₃ proveniente de las proteínas de la biomasa, estos son los responsables del mal olor característico del biogás.

El principio de todos los ensayos que existen para determinar la biodegradabilidad de una sustancia consiste en exponer dicha sustancia a una población mixta de microorganismos ambientalmente representativa y medir su desaparición como consecuencia de la actividad de lo mismos microorganismos. Para lograr esto todas las pruebas de biodegradabilidad incluyen:

- 1) Inóculo (consorcio de microorganismos degradadores)
- 2) Sustrato a degradar

- 3) Forma de detectar la desaparición del sustrato
- 4) Tiempo, el cual se fija

El porcentaje de biodegradación de una sustancia se calcula a partir de la cantidad de biogás teórico y la cantidad de gas producido en el sistema. Si existe una producción de biogás de más del 75% se dice que la sustancia es biodegradable por esta vía, si el porcentaje esta entre 30 y 75% se dice que la sustancia es parcialmente biodegradable.

Las pruebas de biodegradabilidad anaerobia puede desarrollarse correctamente en un intervalo de pH comprendido entre 6.2 y 7.8, aunque el rango óptimo es de 7 a 7.3, fuera de este rango la prueba puede seguir, aunque la eficiencia se verá notablemente reducida (Strotmann, 1993), si el intervalo de pH es mantenido durante toda la prueba se puede decir que existe una actividad bioquímica balanceada. La influencia del pH sobre la producción del metano está relacionada principalmente con la concentración de AGV's provenientes de la fase de acidogénesis.

La temperatura óptima para la incubación de estas pruebas es de 35°C ya que a esta temperatura los microorganismos metanogénicos llevan a cabo sus funciones además de que son muy sensibles a los cambios de temperatura.

Se han realizado varias metodologías para la prueba de biodegradabilidad anaerobia (tabla 1.1) las cuales intentan estandarizarla, el problema es que existen diversos factores los cuales afectan los resultados de la prueba.

2.1.1 Factores que afectan la prueba de biodegradabilidad anaerobia

Existen varios factores que afectan el resultado de la prueba de biodegradabilidad anaerobia, algunos de ellos han sido bien estudiados como la temperatura, el pH, composición del medio, agitación y la forma de medir el biogás. Otros como el origen del inóculo y la relación S_0/X_0 , han sido poco estudiados, pese a ser considerado por varios autores como los más importantes.

La temperatura es un factor importante en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia. la incubación de la prueba se debe realizar a 35°C (+/- 2 °C) ya que a esta temperatura es en la cual los microorganismos metanogénicos realizan su actividad. Esta temperatura es usada por todos los autores que realizan pruebas de biodegradabilidad anaerobia.

En cuanto a la agitación Moreno y Buitrón (1997) observaron que la agitación durante la prueba (un agitador orbital a 150 rpm con ciclos de 2 horas con 30 minutos de reposo), incremento la tasa de degradación y disminuyó el tiempo de reacción, ya que con la agitación se logra que la biomasa tenga mas contacto con el sustrato, así que es recomendable una agitación periódica para optimizar la prueba.

Tabla 1.1 Métodos para determinar la biodegradabilidad anaerobia por medio de la medición de biogás

	Owen, et al., 1979	Shelton y Tiedje, 1984	Birch, et al., 1989	Pagga y Beinborn, 1993	EPA, 1998	ISO, 11374 1995	ASTM, 2001
Origen del inóculo	---	Digestor anaerobio. Agua municipal TR= 15-30 d	Digestor anaerobio planta domestico	Digestor de laboratorio anaerobio	Digestor anaerobio. TR= 15-20 d	Digestor anaerobio planta domestica TR= 15-30 d	Digestor anaerobio planta domestico
Cantidad de sustrato	150 mg de DQO	50 mg de COT	20-50 mg de COT	Tóxicos=20 mg/L de COT No tóxico = 100 mg/L de C	50 mg/L de COT	20-100 mg/L de COT	100 mg/L de COT
Volumen de botella	250 mL	160 mL	100-1000 mL	250-1000 mL	160 mL	---	160 mL
Volumen libre de la botella	130-230 mL	60 mL	10-40%	10-30%	60 mL	---	60 mL
Cuantificación del biogás	Presión manométrica	Transductor de presión	Transductor de presión	Transductor de presión	Transductor de presión	Transductor de presión	Transductor de presión
Temperatura	35°C	35°C	35 +/- 2°C	35 +/- 2°C	35 +/- 1°C	35 +/- 2°C	35 +/- 2°C
Duración de la prueba	30 d o al finalizar la degradación	60 d o al finalizar la degradación	28 d o al finalizar la degradación	60 d o al finalizar la degradación	28 d o al finalizar la degradación	60 d o al finalizar la degradación	60 d o al finalizar la degradación
Tiempos para realizar medición	1 vez al día o semana	---	---	1 vez a la semana	El investigador lo decide	---	---
Indicador de O₂ en el medio	---	Rezarzurina	Rezarzurina	Rezarzurina	Rezarzurina	Rezarzurina	Rezarzurina
pH del medio	7.0 +/- 0.2	7.0 +/- 0.2	7.0 +/- 0.2	7.0 +/- 0.2	7.0 +/- 0.2	7.0 +/- 0.2	7.0 +/- 0.2
Incubación	---	Oscuridad	---	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad
Preaclimatación del inóculo	---	---	Predigestión sin nutrientes	Predigestión sin nutrientes 7 d	Predigestión al compuesto	Predigestión sin nutrientes 7 d	Predigestión sin nutrientes 7 d
Precisión	Errática. Problemas de fuga de biogás	No determinada	Evaluaciones razonables	No determinada	No determinada	No determinada	No determinada

La composición del medio en la prueba es un factor importante ya que de este depende la existencia o ausencia de nutrientes necesarios para la realización de funciones como reproducción, síntesis de compuestos, etc., así mismo, la presencia de vitaminas y oligoelementos en el medio de cultivo son muy importantes ya que estos optimizan la cantidad en la producción de biogás y los incrementos en las tasas de biodegradación. Varios autores proponen distintos medios para la realización de las pruebas de biodegradabilidad anaerobias. Al respecto, Buitrón y Moreno (1997), observaron el efecto de la composición del medio en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia utilizando $S_o/X_o=0.1, 1.0$ y como sustrato glucosa y fenol, evaluando distintos medios minerales (Balch *et al.*, 1979; Owen *et al.*, 1979; Shelton y Tiedje, 1984) llegando a la conclusión de que el mejor medio fue el de Balch *et al.*, 1979, ya que observaron los valores mas altos en las tasas de biodegradación para ambos sustratos debido a la presencia de vitaminas en su composición.

En general las pruebas de biodegradabilidad anaerobia se basan en la cuantificación del biogás producido como resultado de la degradación del sustrato con respecto al tiempo. Para poder hacerlo se han desarrollado diversos métodos para medir la actividad metanogénica específica de los lodos y conocer el porcentaje de biodegradabilidad y los efectos tóxicos de cierta sustancia.

Los métodos para detectar la biodegradabilidad anaerobia por lo general están expuestos a errores por contaminación de oxígeno, por lo que es necesario tomar precauciones para que la prueba no sea afectada.

Los métodos volumétricos se basan en el desplazamiento de volumen de cilindros invertidos en recipientes de agua acidificada con un conducto para gas proveniente de un reactor anaerobio usando un tubo flexible, alternamente el fluido puede ser desplazado del contenedor de almacenaje al contenedor de recibimiento, el volumen desplazado puede ser leído por medio de marcas en el cilindro o bien por cambios en el nivel de superficie en el líquido de barrido. Estos están sujetos a errores considerables, puesto que requieren un control cuidadoso del pH en el líquido de barrido para no producir errores en la medición del biogás producido. Estos sistemas son aplicables a reactores a escala laboratorio los cuales producen entre 10 y 50 mL de biogás por hora, aunque la precisión en los datos de la prueba es limitada (Young, 1991).

Los métodos manométricos se basan en el uso de jeringas, estas son puestas en posición horizontal lubricadas con aceite mineral, glicerina o algún otro fluido de tal manera de que cuando esta sea conectada al reactor anaerobio el gas cause un desplazamiento en el émbolo.

El método propuesto por Owen *et al.* (1978), se basa en la cuantificación manual del biogás producido. Este método presenta problemas en cuanto a errores en la toma de las muestras, puesto que las perforaciones de las agujas en la septa provocando pérdida de biogás (por fugas), lo que genera que los resultados sean aleatorios y poco reproducibles.

Shelton y Tiedje (1984), propusieron medir la presión generada por medio de un transductor de presión equipado con un multímetro con capacidad máxima de 8 psig (lb/in²), gracias al cual existe una gran precisión en la toma de las lecturas, Battersby *et al.* (1988) confirmó la precisión y fiabilidad de esta prueba.

Se han desarrollado diversos sistemas para automatizar la toma de muestras de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia (Concannon *et al.*, 1988; Cohen, A. 1992; Moreno *et al.* 1996; Valera *et al.*, 2002), con el fin de eliminar errores por la forma de medición del biogás. Estos equipos en su mayoría emplean transductores para medir la presión generada por el biogás debido a la degradación del sustrato.

2.1.1.1 Origen del inóculo

El inóculo usado en las pruebas de biodegradabilidad está constituido por un consorcio de microorganismos, este puede ser obtenido de distintos orígenes como pueden ser de digestores anaerobios, lagunas anaerobias, sedimentos de río, agua de mar, etc.

La fuente de inóculo determina la existencia de diferencias en las poblaciones de bacterias (Thouand *et al.*, 1995) y su adaptación al sustrato a degradar (Barkay y Richard, 1988; Thouand y Block, 1993). Además se ha observado que el número de células que serán utilizadas en la prueba van a determinar las tasas de biodegradabilidad (Simpkins y Alexander, 1984), el tiempo de latencia (Chudoba *et al.*, 1992) y la probabilidad de que la degradación del sustrato ocurra durante el desarrollo de la prueba (Thouand *et al.*, 1995). Estas diferencias debidas al origen del cultivo microbiano y grado de adaptación al sustrato, establecerán diferencias en su composición microbiológica y por tanto en su actividad metanogénica (Moreno y Buitrón, 1996).

El contenido de microorganismos degradadores los cuales estarán presentes en la realización de las pruebas de biodegradabilidad es uno de los factores más importantes (Nyholm 1991), por lo cual, la cuantificación de las bacterias de los diversos grupos que realizan la degradación anaerobia es una herramienta importante la cual ayuda a establecer una buena selección del inóculo con el cual se desarrollara la prueba.

Dentro de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia no existe un control total sobre la cantidad o calidad del inoculo ya que el origen del mismo hace que la comunidad de microorganismos varíe, por lo cual debe ser conocida la influencia del mismo para determinar la cantidad necesaria para la prueba.

Las metodologías desarrolladas para evaluar la biodegradabilidad anaerobia (tabla 1.1), tienen el inconveniente de que ninguna menciona las características necesarias que debe tener el inóculo que será utilizado en esta prueba, Algunas metodologías recomiendan el uso de un inóculo de una planta de tratamiento anaerobia de tratamiento de residuos domésticos, descartando el posible uso de otros inóculos que pueden o no tener una mejor respuesta.

A la anterior incertidumbre se agrega que la cuantificación de la biomasa se mide en términos de sólidos suspendidos volátiles (SSV) o sólidos suspendidos totales (SST), presentando el problema de la falta de distinción entre los microorganismos activos y no activos de la biomasa, ni otras partículas orgánicas, además de no dar ninguna idea de la actividad de los microorganismos.

Por la problemática anterior es necesario conocer la influencia del origen del inóculo dentro de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia ya que de este factor dependen en gran parte los resultados que se obtienen de la misma.

2.1.1.2 Relación So/Xo

En las pruebas de biodegradabilidad una concentración inicial del sustrato (So) es puesta en contacto con la cantidad inicial de microorganismos (Xo) a este último también se le llama inóculo. El parámetro So representa la fuente de carbono y energía usada para la biosíntesis, y Xo son los microorganismos que consumen esa fuente de carbono y energía.

La relación inicial sustrato/microorganismos (So/Xo), es uno de los factores más importantes que afectan los experimentos de biodegradación, pues se ha observado que las cinéticas tomadas dependen de esta relación (Chudoba *et al.*, 1991, 1992; Buitrón *et al.*, 1991,). Este parámetro determina si existe o no las condiciones para que tenga lugar la multiplicación de las células durante la remoción exógena del sustrato (Speece *et al.*, 1973; Chudoba *et al.*, 1991, 1992).

La relación So/Xo ha sido más estudiado en ambientes aerobios que en los anaerobios, la mayoría de los estudios referentes a la relación inicial sustrato/microorganismo (So/Xo) han sido realizados en cultivos batch.

El efecto de la relación So/Xo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia ha sido poco estudiado, uno de los primeros en reportar el uso de So/Xo (en mg de DQO/ mg de SSV) dentro de la prueba fue Cornacchio *et al.*, 1988, realizando una modificación a la prueba de Owen *et al.*, 1979 reportando la influencia de esta en el tiempo latencia concluyendo que si la relación So/Xo es de 2.5 el tiempo de latencia es mayor a 5 días, para eliminar el tiempo de latencia se debe utilizar un So/Xo no mayor de 1.5.

Chudoba *et al.*, 1991, al realizar pruebas a distintas So/Xo en un sistema aerobio acoplado con una estabilización anaerobia con reciclado de lodos y lodos activados convencionales en un biofiltro de 15 litros de capacidad operado en batch, observaron que con altos valores de la relación So/Xo gran parte de la energía es utilizada para la multiplicación celular, lo cual resulta en que una gran parte del sustrato es utilizado en el anabolismo.

Si la relación So/Xo es baja, el metabolismo se centra básicamente en la obtención de energía para su sobrevivencia, por lo cual las curvas presentan una disminución de DQO visible, bajo estas condiciones el sustrato es removido linealmente, esto significa que no

existe multiplicación celular y las bacterias preferentemente oxidarán el sustrato en CO_2 y agua (Chudoba, 1992).

Al tener So/Xo altas el metabolismo de las bacterias que consumen el sustrato se va a inclinar a la síntesis de nuevas células, este es indicado por la aceleración de la tasa de crecimiento de biomasa y las tasas de remoción del sustrato van a tener un decremento (Speece, 1973). En estas condiciones Chudoba *et al.* (1992), observaron que Y_{obs} disminuye al aumentar So/Xo , pues bajo estas condiciones mas energía es usada para la multiplicación celular.

Buitrón y Moreno (1997), realizaron pruebas con glucosa como sustrato a distintas So/Xo , confirmaron que la So/Xo tiene una gran influencia en los resultados de la prueba. Observaron las mayores tasas de reacción en la prueba de biodegradabilidad anaerobia fueron obtenidas a mayores So/Xo (obteniendo los mayores valores con la relación 5.0), así mismo se observo existe una relación entre la tasa de producción específica de metano y So/Xo .

Moreno *et al.* (1999), realizaron pruebas de biodegradabilidad anaerobia del colorante azul disperso 79 encontrando diferentes coeficientes cinéticos con las mismas So/Xo pero con diferentes concentraciones de sustrato inicial, obteniendo las mayores tasas de decoloración con las relaciones So/Xo más bajas. Los resultados coinciden con los de Chudoba *et al.* (1992), ya que observaron que So/Xo tiene un efecto significativo en las tasas de reacción y el coeficiente de rendimiento de la biomasa (Y_{obs}), así mismo coinciden en que la producción de biomasa se incrementa cuando So/Xo aumenta. Además los coeficientes cinéticos varían al usar las mismas So/Xo pero con diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Los resultados obtenidos denotan la importancia de elegir las condiciones correctas bajo las cuales se desarrollaran de las pruebas.

En las pruebas de biodegradabilidad anaerobia no ha existido una definición entre los valores de So/Xo bajas y altas, además de la falta de resultados en cuanto a la influencia de distintas So/Xo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.

Lo anterior evidencia la ausencia de estandarización completa de la prueba de biodegradabilidad, derivándose en una escasa reproducibilidad, pues al no cuidar este parámetro los resultados en la prueba los resultados tienen poca fiabilidad. Por lo cual es necesario conocer como influyen los valores de So/Xo en prueba con el fin de minimizar los errores que se pueden presentar por este factor.

2.2. Prueba de inhibición metanogénica

La pruebas de inhibición son parte fundamental de las evaluaciones de contaminación de aguas ya que las pruebas físicas y químicas no son suficientes por si solas para evaluar los posibles efectos que puede tener un contaminante sobre la biota que se encuentra en el cuerpo de agua. Estas pruebas son empleadas en una gran variedad de propósitos entre ellos

por ejemplo la evaluación de la efectividad de aplicar ciertos métodos en el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo, con estas pruebas se puede evaluar las concentraciones inhibitorias máximas que se tendrán en el proceso.

La toxicidad es el potencial o capacidad de un material a causar efectos adversos en los organismos vivos (APHA, 1992). La concentración inhibitoria es la concentración de un tóxico el cual se estima causará un porcentaje específico de inhibición sobre las funciones biológicas de los organismos. En nuestro caso, en el proceso de digestión anaerobia la inhibición en la producción de metano puede ser usada como indicador de la reducción de la actividad microbiana causada por un compuesto tóxico.

Es muy bien conocido que la estructura del sustrato tóxico y su concentración tiene una gran influencia en la prueba de inhibición metanogénica, por ejemplo, Sierra-Alvarez y Lettinga (1991), observaron que el grado de inhibición es influenciado por la estructura aromática del compuesto, aumentando la inhibición cuando se incrementa la longitud de la cadena alifática y el incremento de grupos del número de grupos alquil o clorados del compuesto tóxico. La inhibición no solo está determinada por la concentración del tóxico, la cantidad y tipo de biomasa como es reportado por Rodríguez y Sanz (1998), si no también por la relación inicial S_0/X_0 , la cual no siempre es tomada en cuenta como un parámetro a cuidar dentro del desarrollo de este tipo de pruebas, por lo anterior, es importante conocer los efectos que esta relación tiene sobre la prueba de inhibición metanogénica.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Desarrollo experimental

El presente estudio se dividió en 3 partes:

1. Influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia
2. Influencia de la relación S_0/X_0 en la prueba de biodegradabilidad anaerobia
3. Influencia de la relación S_0/X_0 en la prueba de inhibición metanogénica

Las pruebas de biodegradabilidad anaerobia realizadas para el estudio del origen del inóculo y la relación S_0/X_0 tuvieron condiciones iniciales distintas, sin embargo la metodología de la realización de las pruebas fue la misma.

3.2. Prueba de biodegradabilidad anaerobia

La prueba de biodegradabilidad anaerobia se llevó a cabo en botellas serológicas de 160mL. Se utilizó el medio de nutrientes según Balch *et al.* (1979) (ANEXO 1), adicionando resazurina como indicador de contaminación por oxígeno. Se eliminó el oxígeno en las botellas purgándolas con nitrógeno para asegurar la obtención de ambiente anaerobio. Posteriormente se esterilizó en autoclave para lograr la completa reducción del medio. Se inocularon 10 mL de medio, más la cantidad de inóculo y sustrato necesario para cada prueba, completando el volumen requerido con agua reducida. La inoculación se realizó en una cámara anaerobia McCoy en condiciones de anaerobiosis.

La incubación se llevó a cabo a temperatura controlada de 35°C, con agitación a 130 r.p.m. por medio de un agitador orbital (Lab-line Instruments). La cuantificación del biogás producido se realizó por medio de un transductor de presión de 0-15 psig (Cole Palmer).

La producción teórica de metano se calculó empleando la ecuación de Tarvin y Brusswell (Birch *et al.*, 1989) (Anexo 1). Cada prueba se realizó por duplicado. Adicionalmente por cada prueba con distinto inóculo se efectuaron pruebas únicamente con medio y la cantidad de biomasa necesaria, con el fin de conocer la producción endógena de metano. La composición del gas se determinó por medio de un cromatógrafo de gases (SRI modelo 8610) equipada con un detector de conductividad térmica, con dos columnas acopladas en serie, la primera tipo porapak Q y la segunda de malla molecular 5ª, el gas acarreador fue helio, las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector 120-130°C, temperatura de la columna 50°C, corriente del puente 150mA, flujo de gas acarreador 25 ml/min y un volumen de muestra inyectada de 0.5ml.

Cuando cualquiera de los siguientes tres criterios fue alcanzado, la prueba de biodegradabilidad anaerobia fue concluida:

1. Después de transcurridos 28 días
2. Al obtener una producción de metano de más del 95% en comparación con la producción teórica de metano, aunque no se hayan alcanzado los 28 días. Una vez alcanzado este punto se espera a que la producción de metano sea constante (esperar alrededor de 10% el tiempo transcurrido hasta este momento). Este valor será el tiempo final (TF)
3. Aplicando el criterio de tiempo de paro (TP), el cual se obtiene cuando la curva de producción de metano se vuelve asintótica y no se han cumplido los criterios 1 o 2. En este caso, la producción teórica de metano no es alcanzada en el periodo de duración de la prueba (28 días). El TP se obtiene prolongando la prueba un 50% del tiempo transcurrido al notar que la curva es asintótica, para la obtención del TF (figura 3.1)

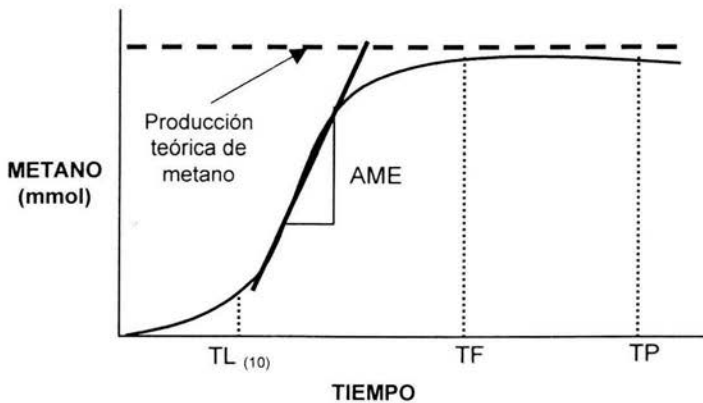


Figura 3.1 Nomenclatura utilizada en la curva de producción de metano de la prueba de biodegradabilidad anaerobia

En el presente trabajo, los resultados se expresan como producción neta de metano, es decir, restando la producción endógena de metano. Los resultados obtenidos de una curva de producción de metano en la prueba de biodegradabilidad anaerobia (figura 3.1) son:

1. Tiempo de latencia, $TL_{(10)}$ el cual es definido como el tiempo necesario para obtener el 10% de la degradación del sustrato

2. La actividad metanogénica específica (AME), la cual se calcula por medio de la pendiente máxima de la curva de producción de metano
3. El porcentaje de biodegradabilidad el cual es calculado con la ecuación 1.

$$\%Biod = \frac{CE}{CT} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$\%Biod$ = % de biodegradabilidad

CE = producción de CH_4 experimental

CT = producción teórica de CH_4

3.3. Influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia

3.3.1. Fuentes de inóculo

Se colectaron inóculos de cinco orígenes distintos: un reactor anaerobio que degrada aguas residuales de una industria cervecera (CER), un reactor anaerobio de una industria química que degrada desechos de la producción de ácido tereftálico (QUI), un reactor UASB que degrada aguas municipales (MUN), una planta municipal de lodos activados (LAC) y estiércol de vaca (EST).

3.3.1.1. Caracterización del inóculo

Cada inóculo fue caracterizado con el fin de conocer las condiciones iniciales del consorcio microbiano, por medio de la determinación de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST), concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV), concentración de sólidos suspendidos fijos (SSF) (de acuerdo a *Standard Methods* APHA, 1992), actividad metanogénica específica (AME), índice volumétrico de lodos (IVL), velocidad de sedimentación (VS), análisis granulométrico, potencial de oxidación-reducción (ORP) y la cuantificación de los grupos de bacterias anaerobias.

3.3.1.1.1. Cuantificación de los grupos de bacterias anaerobias

La cuantificación de las bacterias anaerobias se llevó a cabo utilizando la técnica del número más probable (NMP) descrita por García *et. al.* (1982) (Técnica en el Anexo 2), en la cual se contabiliza el número más probable de bacterias existentes de cada uno de los grupos: fermentativas (F), acetogénicas productoras obligadas de hidrogeno consumidoras de propionatos (OPHAp) y butiratos (OPHAb) metanogénicas hidrogenófilas (MH) y acetoclásticas (MA) y sulfato-reductoras (SR). La preparación de los medios, transferencia de sustratos y técnicas de inoculación fueron realizadas dentro de una cámara anaerobia

marca McCoy. Se realizaron 10 diluciones con 5 repeticiones por dilución para cada uno de los grupos de cada inoculo.

Los grupos F y SR se incuban durante una semana y los otros grupos se incuban de un mes a mes y medio. Al final de la incubación se contabiliza el número de tubos de cada dilución en donde existió crecimiento microbiano, la característica distintiva de este crecimiento en el grupo F es un color lechoso en el medio, las SR deberán mostrar un color negro por la formación de FeS y el indicador positivo de los otros grupos es la producción de metano, la cual es cuantificada por medio de un cromatógrafo de gases. Al tener estos resultados por medio de la tabla de McGrady (Moreno 1994) es posible realizar el cálculo para determinar el número mas probable de bacterias existentes por cada gramo de SSV.

3.3.2. Condiciones iniciales de la prueba

Para determinar la influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia (Técnica en anexo 1) se estudiaron inóculos de distintos orígenes, con los cuales se determinó la biodegradabilidad de dos diferentes sustratos: uno fácilmente biodegradable (glucosa) y uno tóxico (fenol). Una relación S_0/X_0 de 1 (50 mg/L/50 mg/L) fue empleada para todos los inóculos. La cantidad inicial de sustrato (glucosa o fenol) fue de 50 mg/L y la cantidad inicial de cada uno de los inóculos fue de 50 mg/L de SSV, para todas las pruebas.

3.4 Influencia de la relación inicial S_0/X_0 en la prueba de biodegradabilidad anaerobia

3.4.1 Fuente de inóculo

El inóculo empleado para el estudio de la relación inicial S_0/X_0 fue el del reactor anaerobio que degrada aguas residuales de una industria cervecera (CER), el cual fue alimentado diariamente durante dos semanas con 15 mL de etanol por litro, con el fin de aumentar su actividad.

3.4.2 Condiciones iniciales de la prueba

Las condiciones iniciales en cuanto a la cantidad inicial de sustrato (fenol y glucosa) y de inóculo fueron distintas para cada prueba, esto con el fin de comparar las diferencias debidas a la relación inicial S_0/X_0 . En la tabla 3.2 se muestran las condiciones iniciales para cada prueba.

Tabla 3.1 Condiciones iniciales de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con distintas S_o/X_o

SUSTRATO	S_o/X_o	S_o (mg/L)	X_o (mgSSV/L)
GLUCOSA	0.125	125	1000
	0.250	250	1000
	0.5	500	1000
	1	1000	1000
	0.063	125	2000
	0.125	250	2000
	0.250	500	2000
	0.5	1000	2000
	0.083	125	1500
	0.167	250	1500
	0.333	500	1500
	0.667	1000	1500
	0.042	125	3000
	0.083	250	3000
	0.167	500	3000
0.333	1000	3000	
FENOL	0.065	65	1000
	0.131	130	1000
	0.261	260	1000
	0.522	520	1000
	0.033	65	2000
	0.065	130	2000
	0.131	260	2000
	0.261	520	2000
	0.044	65	1500
	0.087	130	1500
	0.174	260	1500
	0.348	520	1500
	0.022	65	3000
	0.044	130	3000
	0.087	260	3000
0.174	520	3000	

3.5 Influencia de la relación inicial S_o/X_o en la prueba de inhibición metanogénica

3.5.1 Fuente de inóculo

El inóculo empleado para el estudio de la relación inicial S_o/X_o fue el del reactor anaerobio que degrada aguas residuales de una industria cervecera (CER), del cual una parte fue utilizada tal cual como fue obtenida del reactor y otra parte fue alimentada con etanol durante dos semanas con el fin de incrementar su actividad.

3.5.2 Prueba de inhibición metanogénica

La prueba de inhibición metanogénica se realizó en botellas serológicas de 160 mL, incubadas a 35°C, con agitación a 130 r.p.m. por medio de un orbital. Los nutrientes fueron adicionados de acuerdo a Balch *et al.* (1979). El inóculo, el medio mineral, el sustrato (glucosa) y el compuesto tóxico (4-clorofenol, 4CF) fueron adicionados a las botellas y con agua desoxigenada se llenaron a un volumen de 100 mL. La cuantificación del biogás producido se realizó por medio de un transductor de presión de acuerdo con Shelton y Tiedje (1984). La producción teórica de metano se calculó empleando la ecuación de Tarvin y Brusswell (Birch *et al.*, 1989).

Cada prueba se realizó por duplicado. La composición del gas se realizó por medio de un cromatógrafo de gases (SRI modelo 8610) equipada con un detector de conductividad térmica. El principio de la prueba de inhibición metanogénica se basa en la reducción o pérdida de la producción de metano cuando existe inhibición por un tóxico, comparado con la producción de metano generada por un sustrato fácilmente biodegradable. El efecto tóxico puede ser medido por la disminución de la producción de metano en un periodo de tiempo en comparación con el control (sin tóxico).

El porcentaje de inhibición metanogénica esta dado por la ecuación 2.

$$\%MI = \frac{CH4_{4CP}}{CH4_{glu}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

%MI: Porcentaje de inhibición metanogénica

CH₄_{4CP}: mmoles de metano producidos durante la degradación de la glucosa en presencia de 4CF

CH₄_{glu}: mmoles de metano producidos durante la degradación de la glucosa

3.5.3 Condiciones iniciales

El sustrato utilizado para esta prueba fue la glucosa y el compuesto tóxico empleado fue el 4-clorofenol (4CF). La prueba de inhibición se llevo a cabo con una misma concentración inicial de glucosa (1000 mg/L), tres condiciones iniciales de SSV (500, 1000 y 3000 mg/L) y ocho concentraciones iniciales de 4-CF (0.1.5.10.15.20.30.50 mg/L). Además una prueba fue conducida con el inoculo alimentado con etanol y otra con el inoculo sin tratamiento previo.

3.6 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de todos los resultados con una prueba de análisis de varianza para conocer si existían diferencias significativas o no significativas entre los resultados de las repeticiones de los experimentos y entre los resultados de las diferentes condiciones iniciales evaluadas, por medio del programa STATGRAPHICS 5.0 (Manugistics, 2000), con un nivel de confianza de 95%, homogeneidad de grupo, y contrastes entre cada uno de los grupos evaluados. Además se realizaron contrastes para conocer el efecto de los inóculos en los porcentajes de biodegradabilidad y tiempo de latencia.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Influencia del origen del inóculo

4.1.1 Caracterización del inóculo

La caracterización de los inóculos mostró diferencias en cada uno de los parámetros determinados, sobresaliendo las diferencias encontradas en la actividad metanogénica específica inicial (tabla 4.1). La caracterización mostró que el inóculo con la mayor actividad metanogénica específica fue el inóculo CER, en caso contrario, el inóculo EST presentó el menor valor en la actividad metanogénica específica.

Tabla 4.1 Resultados de la caracterización de inóculos de distintos orígenes

Inóculo	CER	QUI	MUN	EST	LAC
SST (g/L)	25.2	32.7	121.8	28.4	3.8
SSF (g/L)	11.4	15.3	74.32	17.06	0.82
SSV (g/L)	13.8	17.4	47.48	11.34	2.98
IVL (ml/gSSV)	82.51	43.23	13.95	---	98.4
VS (m/h)	8.77	1.019	0.76	---	11.4
ORP	-312	-232.1	-258.7	4.6	-204.6
AME (gCH ₄ /gSSV-d)	0.48	0.42	0.34	0.14	0.23
Granulometría (%):					
<0.6 mm	20.32	20.47	33.2	---	4.7
>0.6 -<0.42 mm	11.37	21.33	22.3	---	12.45
>0.42-<0.149 mm	23.49	28.87	17.9	---	36.72
>0.149 mm	44.73	29.36	26.6	---	48.13

CER: Inóculo de un reactor anaerobio de una industria cervecera

QUI: Inóculo de un reactor anaerobio de una industria química

MUN: Inóculo de un reactor UASB que degrada aguas municipales

LAC: Inóculo de una planta municipal de lodos activados

EST: Estiércol de vaca

4.1.1.1 Cuantificación de las bacterias anaerobias

La cuantificación de bacterias anaerobias por medio de la prueba de NMP demostró que existen diferencias en la composición microbiológica entre cada uno de los grupos de los inóculos (figura 4.1). Existe una mayor cantidad de bacterias por gramo de SSV en los grupos del inóculo CER que en los demás inóculos, lo que concuerda con los resultados de la AME mostrado en la tabla 1. El inóculo LAC presentó el menor número de bacterias por grupo de los inóculos estudiados. El grupo SR fue el grupo con menor cantidad de bacterias, debido a que las reacciones de sulfato-reducción no son la principal ruta de

degradación en los inóculos evaluados, debido a la falta de sustratos ricos en sulfatos, además de que compiten con las bacterias metanogénicas.

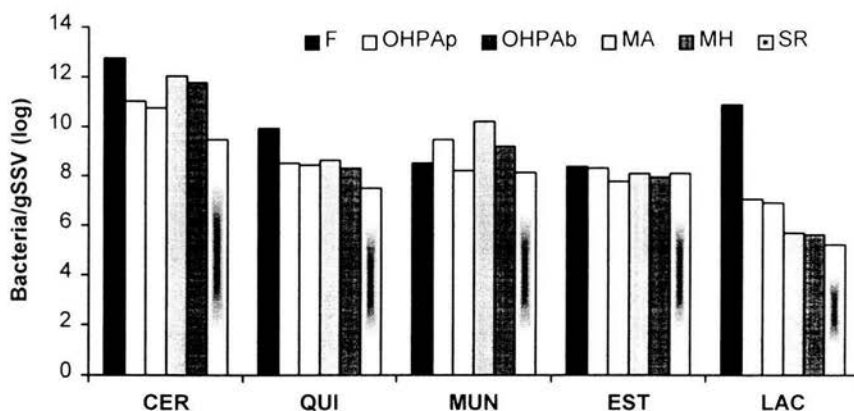


Figura 4.1 Resultados de la caracterización del inóculo dependiendo de la cantidad de bacterias de los grupos fisiológicos

4.1.2 Prueba de biodegradabilidad anaerobia

Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de biodegradabilidad y los tiempos de latencia para ambos sustratos (glucosa y fenol) en cada uno de los inóculos evaluados. El inóculo CER presentó los mejores resultados en el porcentaje de biodegradabilidad, actividad metanogénica específica y el menor tiempo de latencia (tabla 4.2).

Tabla 4.2 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con dos sustratos (glucosa y fenol) (50 mg/L) y diferentes inóculos (50 mg SSV/L)

Inóculo	Biodegradabilidad (%)	LT ₍₁₀₎ tiempo de latencia (h)	AME* (gCH ₄ /gVSS-d)
Glucosa (32 h)			
CER	100 ± 0.14	1.7 ± 0.3	0.603
QUI	78.9 ± 0.12	3.5 ± 0.36	0.258
MUN	95.2 ± 0.9	5.6 ± 0.8	0.308
EST	55.5 ± 0.07	3.9 ± 0.12	0.124
LAC	35.0 ± 0.1	8.5 ± 0.82	0.064
Fenol (650 h)			
CER	56.8 ± 1.04	70.8 ± 2.4	0.018
QUI	18.5 ± 0.84	310 ± 8.4	0.009
MUN	21.5 ± 0.92	230 ± 8.0	0.009
EST	7.4 ± 0.52	>650	0.004
LAC	16.0 ± 0.73	150 ± 12.6	0.006

*AME: Actividad metanogénica específica de la glucosa o el fenol.

El inóculo LAC presentó la menor actividad metanogénica específica durante la degradación de la glucosa, esto se tradujo en un menor porcentaje de biodegradabilidad, y un mayor tiempo de latencia. Resultados similares fueron obtenidos con el EST y la degradación del fenol el cual mostró los peores resultados en la degradación del compuesto. Es interesante notar que existe una correlación entre el porcentaje de biodegradación y la actividad metanogénica específica, lo cual indica que el inóculo con la mayor actividad metanogénica específica puede tener un buen resultado en la degradación de un compuesto.

En general, la actividad metanogénica específica inicial de los inóculos determinada usando acetato se encuentra acorde con los resultados de la biodegradación. Se observa que a mayor actividad metanogénica específica, mayor es la capacidad de degradación de un inóculo. Por lo cual, este parámetro puede ser usado como indicador, cuando se debe decidir que inóculo se va a emplear en una prueba de biodegradabilidad anaerobia.

La figura 4.2 muestra la curva de producción de metano para un sustrato fácilmente biodegradable (glucosa). El inóculo CER mostró los mejores resultados en el porcentaje de biodegradabilidad y el menor tiempo de latencia debido a su mayor número de bacterias por gramo de SSV. Se puede observar que a pesar de tener las mismas condiciones iniciales en la prueba, existen grandes diferencias en el comportamiento de la degradación en comparación con los otros inóculos.

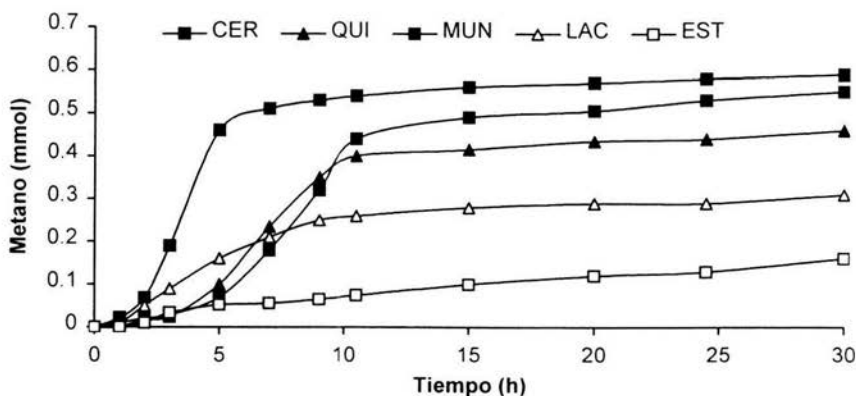


Figura 4.2 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia (promedios): Glucosa (50 mg/L), Biomasa (50 mg/L). Producción teórica de metano = 0.59 mmol

La figura 4.3 muestra la curva de producción de metano para un sustrato tóxico (fenol). El inóculo CER presentó los mejores resultados en el porcentaje de biodegradabilidad, el cual fue tres veces mayor comparado con los otros inóculos. Los resultados obtenidos con este sustrato coinciden con los de la glucosa, excepto por el porcentaje de biodegradabilidad del estiércol de vaca, el cual fue menor para el fenol, esto puede ser debido al tipo de

microorganismos presentes en el inóculo, los cuales posiblemente sean mayormente inhibidos por el fenol.

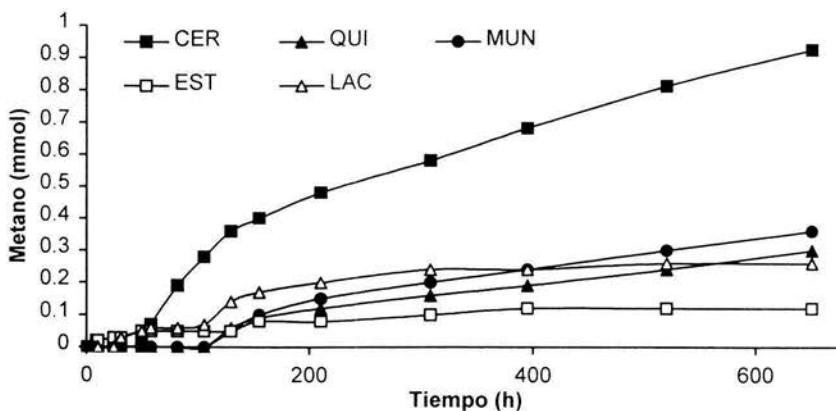


Figura 4.3 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia (promedios): Fenol (50 mg/L). Biomasa (50 mg/L). Producción teórica de metano = 1.62 mmol

El inóculo QUI no mostró una buena degradación del fenol ya que este inóculo estaba aclimatado a la degradación de compuestos derivados de la producción del ácido tereftálico (ácido acético, ácido p-tolúico, ácido benzoico, 4-carboxibenzaldehído y ácido tereftálico), lo cual provocó una selección previa de los microorganismos, por lo cual la diversidad de microorganismos en este tipo de inóculo pudo ser limitada. Esto muestra que un inóculo de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales no es necesariamente la mejor opción para degradar un compuesto tóxico.

El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas en los resultados del porcentaje de biodegradabilidad final para cada uno de los inóculos, para ambos sustratos. Estas diferencias son debidas al origen del inóculo, el cual, no solo determina la composición microbiológica del inóculo, sino además la actividad metanogénica específica inicial. Lo cual es muy importante al seleccionar la mejor fuente de inóculo con la cual se va a desarrollar la prueba de biodegradabilidad anaerobia.

4.2 Influencia de la relación S_0/X_0 en la prueba de biodegradabilidad anaerobia

Para esta parte de la experimentación se empleó inóculo aclimatado a etanol, con una actividad metanogénica específica inicial al acetato de 0.54 mg CH_4 /mg SSV-d. se variaron las concentraciones iniciales de biomasa y de sustrato con el fin de comparar las respuestas de distintas S_0/X_0 en la prueba de biodegradabilidad anaerobia. En los resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con glucosa (tabla 4.1) y fenol (tabla 4.2), se

observa que para cada condición los resultados fueron distintos, siendo uno de los mas notables la actividad metanogénica específica.

Tabla 4.3 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con distintas So/Xo y glucosa como sustrato

So/Xo	So	Xo	AME	Biodegradabilidad (%) 378 h	Tiempo de latencia (h)
0.125	125	1000	0.083	100 ± 0.4	6.5 ± 0.4
0.250	250	1000	0.27	100 ± 0.21	7.2 ± 0.3
0.5	500	1000	0.47	100 ± 0.14	7 ± 0.5
1	1000	1000	0.97	100 ± 0.28	9 ± 0.7
0.063	125	2000	0.075	100 ± 0.12	8 ± 0.8
0.125	250	2000	0.21	100 ± 0.42	6.7 ± 0.4
0.250	500	2000	0.354	100 ± 0.36	7.5 ± 0.8
0.5	1000	2000	0.94	100 ± 0.15	7.8 ± 0.4
0.083	125	1500	0.073	100 ± 0.23	6 ± 0.6
0.167	250	1500	0.184	100 ± 0.32	6.4 ± 0.5
0.333	500	1500	0.35	100 ± 0.34	8.4 ± 0.5
0.667	1000	1500	0.88	100 ± 0.50	7.2 ± 0.7
0.042	125	3000	0.073	94.4 ± 0.54	5.6 ± 0.5
0.083	250	3000	0.155	96.6 ± 0.73	6 ± 0.6
0.167	500	3000	0.366	98.7 ± 0.44	6.5 ± 0.7
0.333	1000	3000	0.785	97.5 ± 0.74	8.2 ± 0.5



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

Tabla 4.4 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia con distintas So/Xo y fenol como sustrato

So/Xo	So	Xo	AME	Biodegradabilidad (%) 672 h	Tiempo de latencia (h)
0.065	65	1000	0.22	42.5 ± 0.63	22 ± 1.3
0.131	130	1000	0.30	46.4 ± 0.72	32 ± 1.5
0.261	260	1000	0.43	54.8 ± 1.05	48 ± 0.6
0.522	520	1000	0.57	62.6 ± 1.18	74 ± 3.5
0.033	65	2000	0.26	45.8 ± 0.74	30 ± 1.4
0.065	130	2000	0.39	55.4 ± 0.85	48 ± 1.6
0.131	260	2000	0.55	64.5 ± 0.72	76 ± 3.3
0.261	520	2000	0.71	75.4 ± 0.98	98 ± 5.0
0.044	65	1500	0.30	53.8 ± 0.82	26 ± 0.6
0.087	130	1500	0.44	62.3 ± 0.85	34 ± 0.6
0.174	260	1500	0.58	70.8 ± 0.54	54 ± 1.5
0.348	520	1500	0.79	81.4 ± 2.31	88 ± 1.6
0.022	65	3000	0.43	62.5 ± 0.94	32 ± 0.6
0.044	130	3000	0.58	71.4 ± 0.85	50 ± 2.5
0.087	260	3000	0.77	78.2 ± 1.58	86 ± 4.5
0.174	520	3000	0.84	83.3 ± 1.16	108 ± 7.3

El análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas en los resultados con cada una de las condiciones iniciales de concentración de sustratos y microorganismos, obteniendo distintos resultados en cuanto a el tiempo de latencia ambos sustratos, sin embargo, en el porcentaje de biodegradabilidad de la glucosa no se observaron diferencias

ya que por ser un sustrato fácilmente biodegradable el sustrato es consumido totalmente, no así el fenol, donde se observan diferencias en estos resultados.

Las diferencias encontradas en los resultados se pueden discutir de dos formas, comparando la producción de metano de la misma cantidad de sustrato y distintas cantidades de microorganismos (figura 4.4, curvas de degradación de la glucosa) (figura 4.5, curvas de degradación del fenol) o comparando la producción de metano de distintas cantidades de sustrato con la misma cantidad de biomasa inicial (figura 4.6, curvas de degradación de la glucosa normalizadas) (figura 4.7, curvas de degradación del fenol normalizadas).

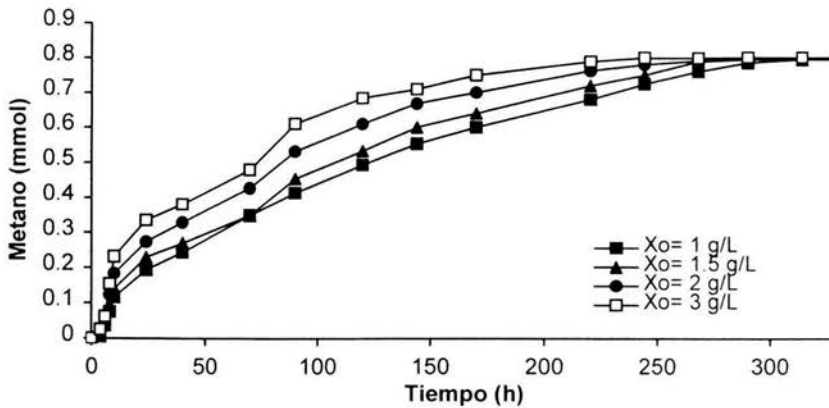


Figura 4.4 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con glucosa, $S_o=500$ mg/L y distintas concentraciones iniciales de microorganismos. Producción teórica de metano = 0.8 mmol

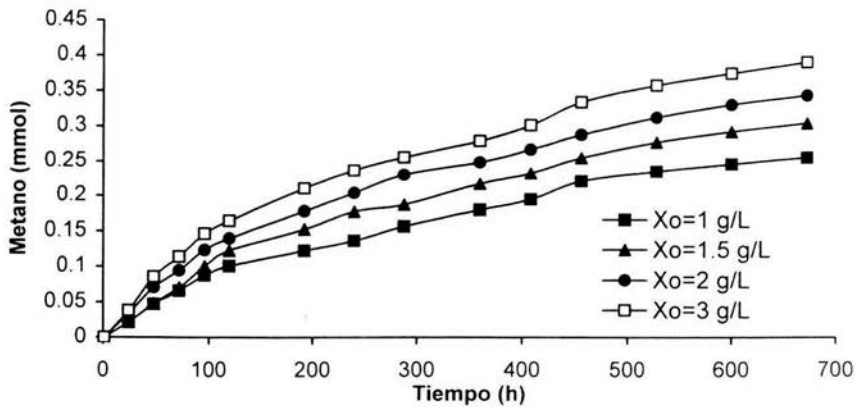


Figura 4.5 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con fenol, $S_o=130$ mg/L y distintas concentraciones iniciales de microorganismos. Producción teórica de metano = 0.48 mmol

En la primer forma de presentar los resultados se aprecia claramente que para la misma cantidad de sustrato inicial, al aumentar la cantidad de biomasa inicial, la producción de metano aumenta para ambos sustratos. Por ejemplo, en el caso del fenol (figura 4.5), para la el valor inicial de sustrato de 130 mg/L, al aumentar la biomasa de 1000 a 3000 mg/L, el porcentaje de biodegradabilidad aumento en un 25%.

Al normalizar los resultados se observa que para la misma cantidad inicial de microorganismos, al aumentar la cantidad de sustrato, la producción de metano aumenta para ambos casos (glucosa y fenol), por lo cual el desarrollo de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia tienen distintos resultados al variar la cantidad inicial de sustrato (figuras 4.6 y 4.7).

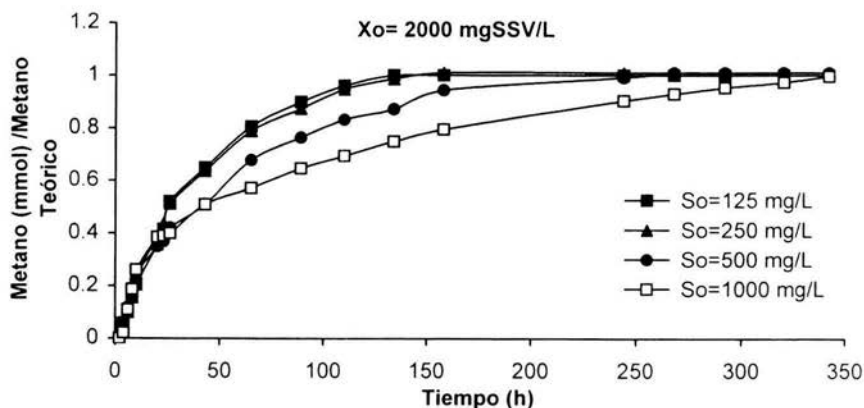


Figura 4.6 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con glucosa normalizada. Xo=2000 mg/L y distintas concentraciones iniciales de sustrato

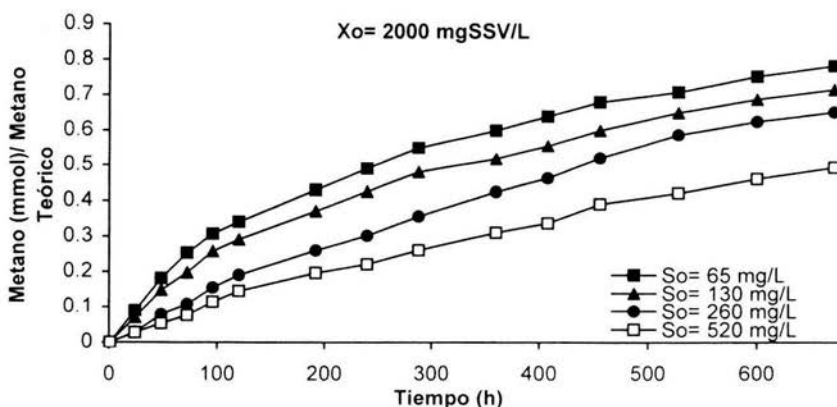


Figura 4.7 Prueba de biodegradabilidad anaerobia con fenol normalizada. Xo=2000 mg/L y distintas concentraciones iniciales de sustrato

4.2.1 Influencia de la S_o/X_o sobre el tiempo de latencia

Al analizar los resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia realizada con glucosa (figura 4.8) y fenol (figura 4.9) tomando como referencia la relación S_o/X_o , se observa que para los mismos valores de S_o/X_o (aunque con distintas cantidades iniciales de sustrato y biomasa), el tiempo de latencia fue similar (variaciones de menos de una hora), además de que al aumentar el valor de S_o/X_o el tiempo de latencia es mayor, lo cual indica que el tiempo de latencia esta determinado por la relación S_o/X_o .

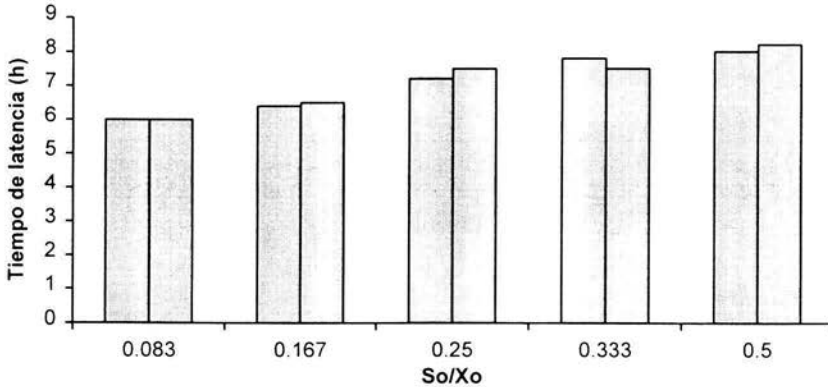


Figura 4.8 Comparación de los tiempos de latencia con distintos valores de S_o/X_o con glucosa como sustrato. Los valores de S_o/X_o similares tienen distintos valores de concentración inicial en la sustrato y microorganismos

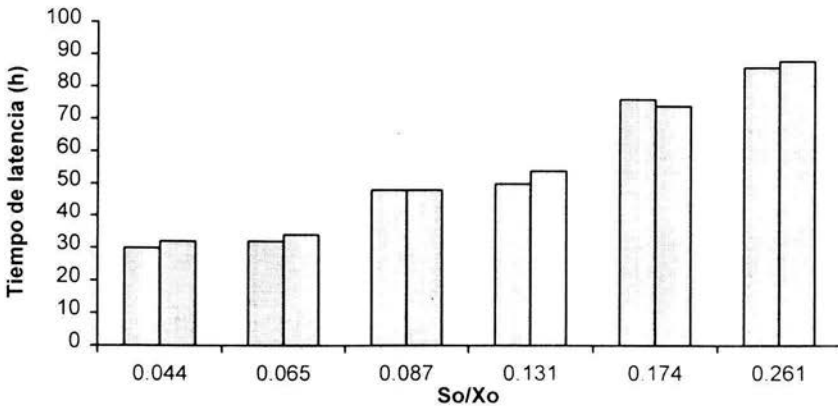


Figura 4.9 Comparación de los tiempos de latencia con distintos valores de S_o/X_o con fenol como sustrato. Los valores de S_o/X_o similares tienen distintos valores en la concentración inicial de sustrato y microorganismos

4.2.2 Influencia de la S_o/X_o sobre la Actividad Metanogénica Específica

Los resultados demostraron que la relación S_o/X_o tiene influencia sobre la actividad metanogénica específica, haciendo que los valores de esta varieran al cambiar la relación. Así mismo se observó que en los resultados del fenol la actividad metanogénica específica fue similar (variación de menos de 0.04 mg CH_4 -DQO/mg SSV) para una misma relación inicial S_o/X_o , aunque los valores iniciales de la concentración inicial de sustrato y microorganismos sean diferentes (figura 4.10)

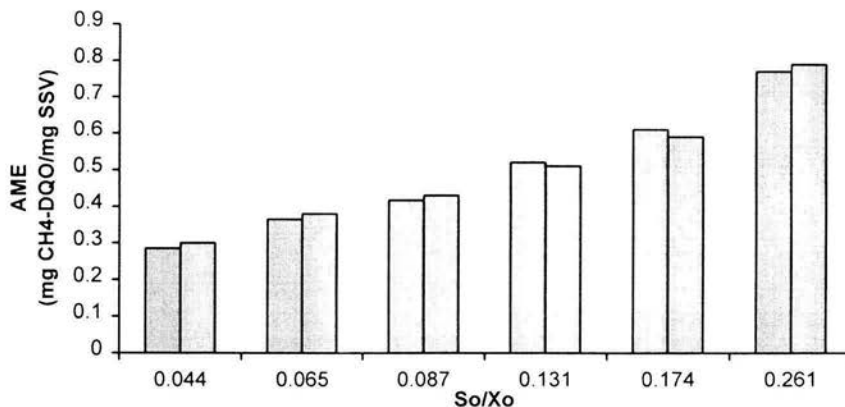


Figura 4.10 Comparación de la actividad metanogénica específica con distintos valores de S_o/X_o con fenol como sustrato. Los valores de S_o/X_o similares tienen distintos valores de la concentración inicial de sustrato y microorganismos

En la figura 4.11 se muestra la gráfica donde con una misma concentración de $X_o=1000$, pero distintas concentraciones iniciales de sustrato (por lo tanto distintas S_o/X_o). Cuando la cantidad de la concentración inicial de microorganismos permanece constante pero se aumenta la concentración inicial de sustrato, la actividad metanogénica específica también aumenta, en otras palabras, cuando de la S_o/X_o aumenta. Por ejemplo, para los valores de $S_o=65$ (AME=0.43 mg CH_4 -DQO/mg SSV-d) y $S_o=520$ (AME=0.84 mg CH_4 -DQO/mg SSV-d), con la misma $X_o=1000$, la diferencia en la actividad metanogénica específica es casi del doble.

Al comparar la misma S_o/X_o con diferentes cantidades iniciales de sustrato y microorganismos se observó que existen diferencias en los resultados de la AME, al aumentar el valor de la relación S_o/X_o aumenta el valor de la AME (figura 4.12).

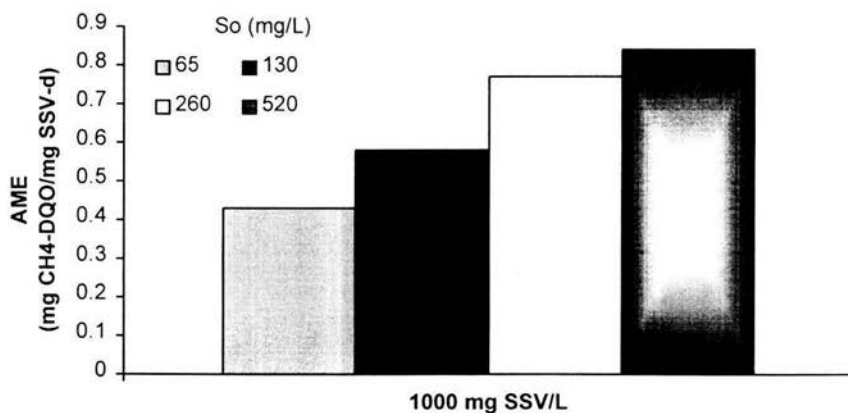


Figura 4.11 AME en función de $X_o=1000$ mgSSV/L y distintas concentraciones iniciales de fenol (S_o)

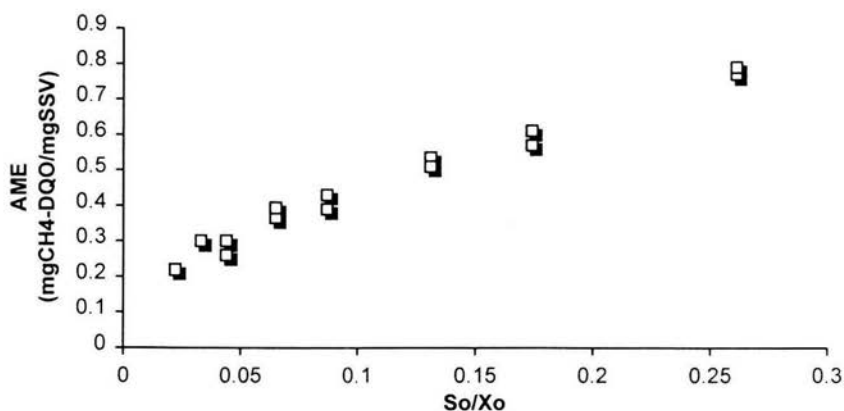


Figura 4.12. Influencia de la S_o/X_o , sobre la AME en la prueba de biodegradabilidad anaerobia, utilizando como sustrato distintas cantidades de fenol

4.3 Influencia de la relación S_o/X_o en la prueba de inhibición metanogénica

4.3.1 Caracterización del inóculo

La tabla 4.5 presenta los resultados de la caracterización del inóculo utilizado en la prueba de inhibición metanogénica donde se observa de forma clara que después de alimentar con etanol, la actividad metanogénica específica inicial se incrementó en un 27%. La actividad inicial del inóculo se incremento de 0.41 a 0.52 mg CH₄/mg VSS-d después de alimentarlos

durante dos semanas de alimentarlos con etanol, con lo se aumentó el número de bacterias por gramo de SSV.

Tabla 4.5 Caracterización del inóculo

Parámetro	Inóculo sin alimentación	Inóculo alimentado con etanol
AME, mg CH ₄ /mg SSV-d	0.41	0.52
SSV, g/L	18.4	27.2
IVL, mL/g	82	74
% de gránulos con diámetro mayor a 0.6 mm	20.3	28.4

4.3.2 Prueba de inhibición metanogénica

La figura 4.13 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos durante la prueba de inhibición metanogénica para el caso de S_o/X_o de 2 (mg glucosa/ mg SSV) y diferentes concentraciones de 4CF. Se puede observar que la producción de metano es inhibida por el 4CF. Cuando la concentración del tóxico (4CF) aumenta, la producción de metano disminuye. Los porcentajes de inhibición fueron evaluados de resultados similares obtenidos de las distintas condiciones estudiadas.

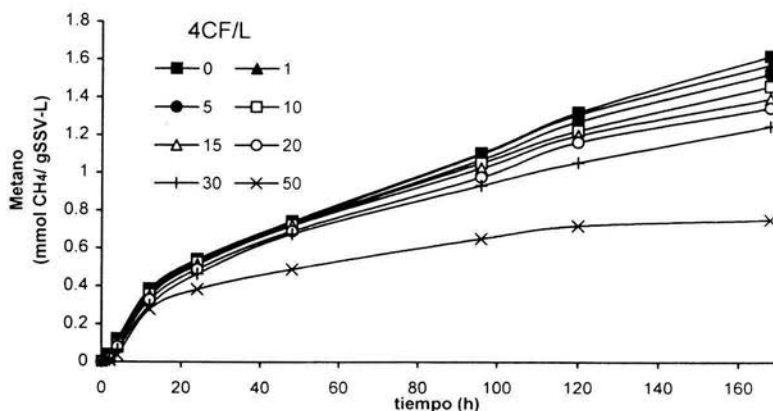


Figura 4.13 Curva de producción de metano durante la prueba de inhibición Metanogénica (promedios). $S_o/X_o=1$ (1000 mg/L glucosa/1000 mg/L SSV) y diferentes concentraciones iniciales de 4CF

4.3.3 Influencia de la Actividad metanogénica específica inicial del inóculo en la inhibición

El uso del inóculo con una alimentación con etanol durante dos semanas presentó una gran influencia en los resultados de la prueba de inhibición (figura 4.14). A pesar de que la

misma concentración de inóculo fue empleada en cada prueba, la inhibición fue mayor en el inóculo sin alimentación previa en comparación con el que fue alimentado con etanol. Este comportamiento puede ser explicado por la diferencia en la actividad metanogénica específica inicial, la cual en el inóculo alimentado con etanol fue mayor. Como la inhibición fue menor en el inóculo alimentado con etanol, las siguientes pruebas fueron realizadas con este inóculo.

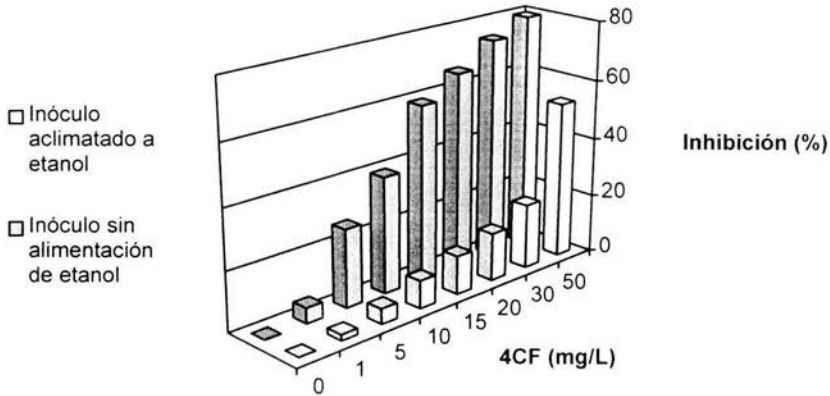


Figura 4.14 Prueba de inhibición metanogénica para el inóculo con y sin alimentación de etanol con diferentes concentraciones de 4CF y $So/Xo = 1$ (1000 mg glucosa/1000 mg SSV)

4.3.4 La inhibición como una función de So/Xo , cuando So es la concentración inicial de sustrato (glucosa)

Se encontraron diferencias significativas en la prueba de inhibición anaerobia las cuales dependían de la relación inicial So/Xo con respecto a la glucosa como sustrato. Para concentraciones similares de tóxico, se observó que la inhibición se incrementa cuando la So/Xo se incrementa, en otras palabras cuando la concentración inicial de biomasa disminuye (figura 4.15). Esto significa que la inhibición no solo depende de la concentración del compuesto tóxico, si no también de la concentración inicial de biomasa con la que se va a realizar la prueba.

Para este caso, la concentración de 4CF la cual causa una inhibición inferior o igual a 5% varía de 1 a 20 mg/L, dependiendo de la concentración inicial de la biomasa (inferior a 1 mg 4CF/L para una concentración inicial de biomasa de 3000 mg/L, 10 mg 4CF/L para una concentración inicial de microorganismos igual a 1000 mg/L y 20 mg 4CF/L para una concentración inicial de microorganismos igual a 500 mg/L). Desde un punto de vista práctico, esto significa que para un caso, 20 veces más clorofenol tiene el mismo grado de inhibición que para otro caso. Esto puede ser explicado considerando que al incrementar el número de bacterias, disminuye la probabilidad de que todas las bacterias puedan ser

inhibidas por el compuesto tóxico, con lo cual las bacterias que no han sido inhibidas pueden metabolizar la glucosa y seguir produciendo mas metano.

Otros resultados en la literatura indican que la concentración inicial de biomasa influye en los resultados de las pruebas de inhibición. Vallecillo *et al.* (1999) determinaron la inhibición del 4CF en lodos anaerobios, ellos obtuvieron un 25% de inhibición en la actividad metanogénica para una concentración de 4CF de 200 mg/L, pero usaron la concentración de la biomasa de 30.000 mg SSV/L ($So/Xo = 0.0066$). Esto significa que utilizando una alta concentración de biomasa se puede utilizar una alta concentración del compuesto tóxico sin que sea altamente inhibitorio.

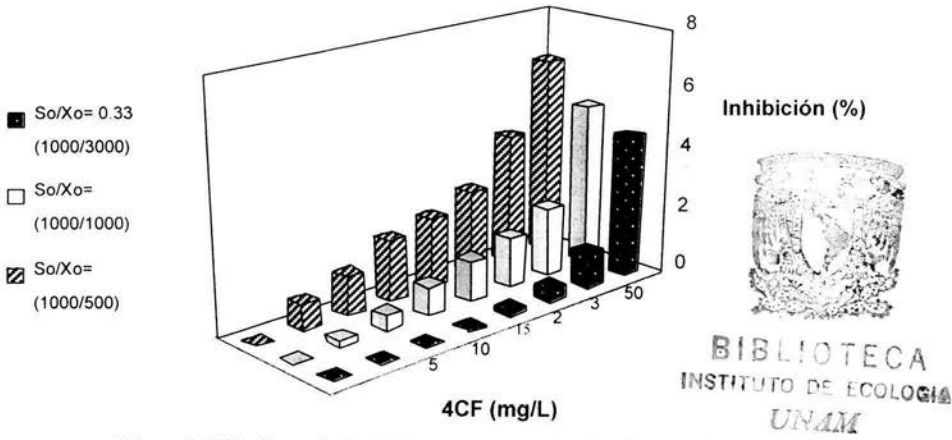


Figura 4.15 Influencia de So/Xo , con respecto a la glucosa (So) en la prueba de inhibición anaerobia

4.3.5 La inhibición como una función de So/Xo , cuando So es la concentración inicial de 4CF

Cuando los resultados fueron analizados con respecto al 4CF como So , se observó que la inhibición se incrementa cuando la So/Xo se incrementa (figura 4.16). Es interesante notar que en esta forma de presentar los resultados, se observa que la cantidad inicial de biomasa no tuvo influencia. Tradicionalmente uno esperaría que al aumentar la concentración inicial de tóxico (So) tendría un efecto de aumento en el grado de inhibición, debido a que la concentración inicial de biomasa fue constante.

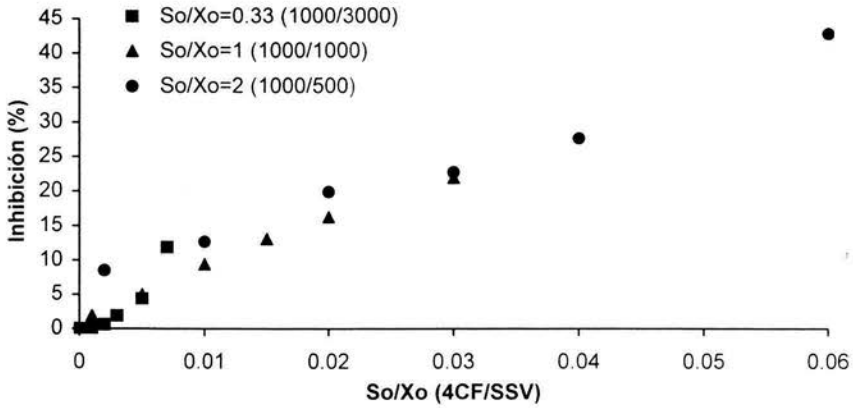


Figura 4.16 Influencia de la So/Xo, considerando como So al 4CF, en la prueba de inhibición anaerobia

Cuando los resultados son analizados desde otra perspectiva, se puede observar que para valores similares de So/Xo existe un incremento de la inhibición cuando la cantidad de Xo disminuye (figura 4.17). Para el caso de la prueba de biodegradabilidad aerobia se ha demostrado que la relación inicial So/Xo tiene una importante influencia (Vazquez-Rodriguez *et al.*, 1999).

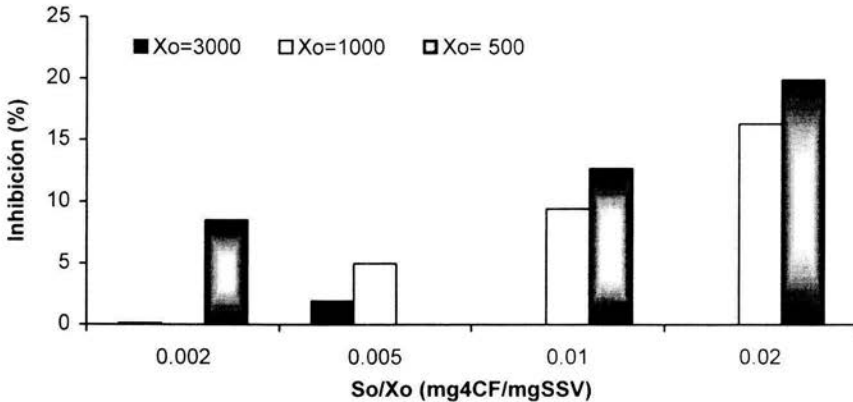


Figura 4.17 Comparación de la inhibición de valores iguales de So/Xo bajo diferentes condiciones iniciales

En general se observó que el origen del inóculo y la relación So/Xo tuvieron una gran influencia sobre las pruebas de biodegradabilidad anaerobia, existiendo una gran variabilidad de los resultados debido a las condiciones iniciales de la prueba.

Debido a que la prueba fue conducida bajo condiciones controladas con respecto a la cantidad de biomasa inicial como SSV, las diferencias observadas en los porcentajes de biodegradabilidad para los inóculos evaluados, pueden ser atribuidas a la actividad metanogénica específica inicial. Se encontró una correlación entre los porcentajes de biodegradación y la actividad metanogénica específica inicial, lo cual indica que un inóculo con una alta actividad va a generar mejores resultados en la prueba debido a la disminución de la inhibición y al aumento en los porcentajes de biodegradabilidad. Así de esta manera, la actividad metanogénica específica inicial puede ser utilizada como un indicador al tomar la decisión de que inóculo emplear en la prueba de biodegradabilidad anaerobia.

El inóculo con la mayor cantidad de bacterias por gramo de SSV y con mayor AME mostró tener los mejores resultados en la degradación de los sustratos aquí evaluados, demostrando que el origen del inóculo determina las características de presencia y cantidades de microorganismos degradadores necesarios para consumir el sustrato y transformarlo en metano, por lo cual este es un factor a tomar en cuenta al realizar las pruebas de biodegradabilidad anaerobia.

Al aumentar la So/Xo la AME también aumenta, esto concuerda con lo obtenido con Moreno et al 1999, donde al aumentar la So/Xo de 0.05 a 5 la AME aumento de 0.32 a 7.04 $mgCH_4/gSSV-h$. También se observó que el tiempo de latencia esta determinado por la relación So/Xo ya que al aumentar el valor de So/Xo el tiempo de latencia es mayor.

Existe influencia de la relación inicial So/Xo sobre los resultados de la prueba de inhibición metanogénica. En general, cuando la relación So/Xo disminuye, el porcentaje de inhibición también sufre un decremento. El valor inicial de la concentración inicial de microorganismos mostró ser la variable más importante, ya que cuando la concentración inicial de biomasa disminuye, la inhibición se incrementa, aún para valores similares de So/Xo . Por lo tanto se debe trabajar con valores de So/Xo bajos o Xo altos. El valor inicial de Xo es un factor importante dentro de las pruebas anaerobias, sin embargo, normalmente el valor de Xo no había sido relacionado con el resultado de la concentración de inhibición.

La actividad metanogénica específica inicial es un factor que debe ser tomado en cuenta durante la realización de las pruebas de inhibición., ya que cuando el inóculo tiene una mayor actividad, la inhibición es menor. Esta actividad se puede aumentar por medio de la aclimatación a un sustrato fácilmente asimilable por las bacterias metanogénicas, o al compuesto a degradar, ya que con la aclimatación a un sustrato específico se puede estabilizar la comunidad microbiana y aumentar y/o mantener la actividad (Buitrón *et al.* 1997)

En general los resultados muestran la gran variabilidad en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia debido a la relación inicial So/Xo y al origen del inóculo, incluso para un sustrato fácilmente biodegradable como lo es la glucosa y subrayan la importancia de elegir las condiciones iniciales adecuadas bajo las cuales las pruebas anaerobias serán realizadas.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El origen del inóculo determina las características iniciales con las cuales será llevada a cabo una prueba de biodegradabilidad anaerobia.
- La actividad metanogénica específica es un buen indicativo para elegir el inóculo a emplear en una prueba de biodegradabilidad anaerobia.
- En la caracterización del inóculo el que presentó el mayor valor en la actividad metanogénica específica, así como la mayor cantidad de bacterias por gramo de SSV en los diferentes grupos tróficos determinados fue el inóculo proveniente de un reactor anaerobio que degrada aguas residuales de una industria cervecera. Este inóculo obtuvo los mayores porcentajes de biodegradabilidad, menor tiempo de latencia y mayor actividad metanogénica específica ($0.48 \text{ gCH}_4/\text{gSSV-d}$), en la realización de pruebas de biodegradabilidad anaerobia con glucosa y fenol como sustrato.
- Se observó que la aclimatación del inóculo a etanol aumenta la actividad metanogénica específica inicial. Si la actividad metanogénica específica inicial mayor a $0.5 \text{ gCH}_4/\text{gSSV-d}$, la inhibición por sustratos tóxicos es menor.
- La relación inicial S_0/X_0 determina el porcentaje de biodegradabilidad, el tiempo de latencia y la actividad metanogénica específica dentro de la prueba de biodegradabilidad anaerobia.
- El tiempo de latencia esta determinado por la relación S_0/X_0 ya que al aumentar el valor de S_0/X_0 el tiempo de latencia es mayor, además, para los mismos valores de S_0/X_0 (aunque con distintas cantidades iniciales de sustrato y biomasa), el tiempo de latencia fue similar.
- Existe influencia de la relación inicial S_0/X_0 en los resultados de la prueba de inhibición. En general, cuando la relación S_0/X_0 disminuye, el porcentaje de inhibición también sufre un decremento. El valor de la concentración inicial de microorganismos (X_0), mostró ser la variable más importante, ya que cuando la concentración inicial de biomasa disminuye, la inhibición se incrementa, aún para valores similares de S_0/X_0 .
- Los resultados muestran la gran variabilidad en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia debido a la relación inicial S_0/X_0 y al origen del inóculo, incluso para un sustrato fácilmente biodegradable como lo es la glucosa.

RECOMENDACIONES

- Antes de conducir una prueba de biodegradabilidad anaerobia se deben realizar evaluaciones de la actividad metanogénica específica inicial en los inóculos disponibles y elegir el de mayor actividad.
- Se deben emplear inóculos con una actividad metanogénica específica inicial mayor a $0.5 \text{ gCH}_4/\text{gSSV-d}$, para evitar problemas de inhibición.
- Se recomienda el uso de relaciones iniciales S_0/X_0 bajas (valores de X_0 altos) para obtener los mejores resultados en el porcentaje de biodegradabilidad y menores tiempos de latencia y reducir la posibilidad de inhibición de los microorganismos metanogénicos.

CAPITULO 6

REFERENCIAS

- APHA, AWWA, WPCF.(1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation. 18th ed.. New York, USA.
- ASTM E 2170. (2001). *Standard test method for determining anaerobic biodegradation potential of organic chemicals under methanogenic conditions*. American Society for Testing and Material. EUA
- Balch W., Fox G., Magrum L., Woese C. and Wolfe R. (1979). Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, **43**, 260-269.
- Barkay T. and Pitchard T. (1988). Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. *Microbiology Sci.*, **5**, 165-169.
- Battersby N. and Wilson V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere.*, **17** (12), 2441-2460.
- Birch R., Biver C., Campagna R., Gledhill W., Pagga U., Steber J., Reust H. and Bontinck W. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradability. *Chemosphere.* **19** (10-11), 1527-1550.
- Buitrón G. and Moreno G. (1997) Influence of So/Xo ratio and medium composition on anaerobic biodegradability test. Proc. of 52th *Industrial Waste Conference*, chap. Purdue University, 5-7 May.
- Cardinale P., Bookland E., Cowan C., Larson R. (1996). El significado de las pruebas de biodegradabilidad, y un ensayo recomendado para América latina. *XXV Congreso de AIDIS*.
- Cohen A. (1992). Effects of some industrial chemicals on anaerobic activity measured by sequential automated methanometry (SAM). *Wat. Sci Tech.*, **25** (7), 11-20.
- Concannon F., Reynolds P., Hennigan A., Colleran E. (1988). Development of a computerized continuous assay for specific methanogenic activity measurement. *Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*. Bologna. Italy. May 22-26. 177-181.

- Cornacchio L., Hall E., Trevora J. (1988). Modified anaerobic serum bottle testing procedures for industrial wastewaters. *Water Poll. Res.*, **21** (3), 450-459.
- Chudoba P., Capdeville B. and Chudoba J. (1992). Explanation of biological meaning of the So/Xo ratio in batch culture. *Wat. Sci. Tech.*, **26** (3-4), 743-751.
- Chudoba P., Chevalier J.J., Chang J. and Capdeville B. (1991). Effect of anaerobic stabilization of activate sludge on its production under batch conditions at various So/Xo ratios. *Wat. Sci. Tech.*, **23** (4-6), 917-926.
- EPA OPPTS 835.3400. (1998). *Fate transport and transformation test guidelines. OPPTS 835.3400. Anaerobic biodegradability of organics chemicals*. Environmental Protection Agency. USA
- García J.L., Guyot J.P., Oliver B., Trad M. and Paycheng C. (1982). Ecologie de la digestion anaerobia. Cha. ORSTOM. *Ser. Biol.*, **45**, 3-15.
- Henze M. and Harremoes (1983). Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors- A literature reviews. *Wat. Sci. Tech.*, **15**, 1-101.
- ISO 11734 (1995). *Water quality- Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digester sludge- Method by measurement of the biogas production*. International Organization of Standardization, Switzerland.
- Manugistics Inc. (2000). Statgraphics 5.0 plus. Manugistics Inc., 1 ed. Maryland, USA.
- McInerney M.J., Bryant M.P., Stafford D.A. (1980). Methabolic stages and energetics of microbial anaerobic digestion. *Anaerobic Digestion*. Applied Science, 1 ed, London, 91-98.
- Moreno G. (1994). Obtención de lodos granulares en un reactor UASB a partir de lodos de purga. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), UNAM, México, D.F.
- Moreno G., Buitrón G. (1996). Efecto de la composición del medio en la prueba de biodegradabilidad anaerobia. En memorias del *XXV Congreso Interamericano de Ingeniería Ambiental y Sanitaria*. Vol. 1 (2), 678-685.
- Moreno G., Cruz A., Buitrón G. (1999). Influence of So/Xo ratio on anaerobic activity test. *Wat. Sci. Tech.*, **40** (8), 9-15.
- Moreno G., Sánchez C., Noyola, A., Santiago L., Buitrón G. (1996). Automatización de una prueba de biodegradabilidad anaerobia. En memorias del *X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. SMISAAC*. Toluca, México. 14-16.

- Nyholm N. (1991). The european system of standaided legal test for assessing the biodegradability of chemicals. *Environ. Tox. Chem.*, **10**, 1237-1246.
- Owen, W., Stuckey, D., Healy, J., Young, L., McCarty, P. (1978). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Wat. Res.*, **13**, 485-492.
- Pagga U., Beimborn D.B. (1993). Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere.*, **27** (8), 1499-1509.
- Rodriguez N., Sanz J.L. (1998). Response of an anaerobic granular sludge to chlorinated aliphatic hydrocarbons in different conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, **86** (23), 226-232.
- Rozzi A., Remigi E. (2002). Activity asesment. En Workshop on harmonization of anaerobic biodegradation, activity and inhibition assays. Institute for Environment and Sustainability, Italy, European Commission. Jun 7-8. 31-50.
- Saval S.(1996). Biotecnología aplicada al tratamiento de aguas residuales. *La situación ambiental de México, Programa universitario del medio ambiente*. UNAM. México DF. 370-379.
- Saval S., Noyola A. (1992). Aportaciones da la biotecnología al tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Biotecnología.*, **2** (5-6), 155-172.
- Scott R., Norman T., Whitmore T., LLoyd D. (1985). In Microbial gas metabolism: Mechanistic, Metabolic and biotechnological aspects. *Special publications of society for general microbiology* 14, London, UK, 263-270.
- Shelton D. and Tiedje J. (1984). General method for determining anaerobia biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47** (4), 850-857.
- Sierra-Alvarez R; Lettinga G (1991) The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34** (4), 544-550.
- Simkins S. and Alexander M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1299-1306.
- Speece R.E.; Engelbrrrecht R.S.; Aukamp D.R. (1973) Cell replication and biomass in the activate sludge process. *Wat. Research.* **7**, 361-374.
- Stainer R., Doudorof M., Adelberg E. (1963). *The Microbial Word*, 4 ed. Prentice- Hall inc. Englewood Cliffs, NJ., USA., 675-683.

- Strotmann U., Eismann F., Hauth B., Bias W. (1993). An integrated test strategy for the assessment of anaerobic biodegradability of wastewaters. *Chemosphere*, **26** (12), 2241-2254.
- Thouand G. and Block J.C. (1993). The use of precultured inocula for biodegradability test. *Environ. Tech.*, **14**, 601-614.
- Thouand G., Friant P., Bois F., Cartier A., Maul A. and Block J.K. (1995). Bacterial inoculum density and probability of para-nitrophenol biodegradability test response. *Ecotox. Environ. Safety*, **30**, 274-282.
- Valera C., Santiago L., Moreno I. Y Buitrón G. (2002). Equipo automatizado para la determinación de la biodegradabilidad anaerobia. En memorias del *VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia*. Mérida, Yucatán, México. 22-25 de Octubre. Vol. 2, 119-122.
- Vallecillo A., García-Encina P.A. and Peña M. (1999). Anaerobic Biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Wat. Sci. Tech.*, **40** (8), 161-168.
- Vazquez-Rodriguez G., Palluy F., Goma G. and Rols J.L. (1999). Procedures in ready biodegradability testing: Effects of the inoculation and monitored parameter. *Environ. Tech.* **20**, 301-308.
- Young J., Kuss M., Nelson M. (1991). Use of anaerobic respirometers for measuring gas production in toxicity and treatability tests, 84th *Annual meeting of the air and waste water management association*, Vancouver, B.C., Jun.16-21.

ANEXO 1

PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA

Recomendada como resultado del trabajo de esta tesis

1. Composición de las soluciones para el cultivo de bacterias anaerobias (Balch *et al.*, 1979)

Soluciones minerales

La preparación de las soluciones minerales se puede llevar a cabo en condiciones aerobias, con agua destilada (neutralizada previamente con KOH), se debe preservar a 4°C.

Solución mineral 1 (1000 mL)

K_2HPO_4 6.0 g

Solución mineral 2 (1000 mL)

KH_2PO_4 6.0 g

NH_4Cl 2.4 g

$NaCl$ 12.0 g

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.1 g

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.16 g

$CaCl_2$ (cuando no hay la anterior) 0.12 g

Solución de Vitaminas (1000 mL)

Biotina 2.0 mg

Ácido fólico 2.0 mg

Pridoxina 10.0 mg

Tiamina 5.0 mg

Riboflavina 5.0 mg

Ácido nicotínico 5.0 mg

Pantotenato de calcio 5.0 mg

Vitamina B_{12} 0.1 mg

Ácido p-aminobenzóico 5.0 mg

Ácido lipóico 5.0 mg

Solución de oligoelementos (1000 mL)

Ácido nitrilotriacético 1.5 g

Ajustar el pH a 6.5 con KOH antes de agregar lo siguiente:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0 g

$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.5 g

$NaCl$ 1.0 g

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g

$CoSO_4$ 0.1 g

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄	0.1 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.01 g
AlK (SO ₄) ₂	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ Mo ₄ · 2H ₂ O	0.01 g

Preparación del medio de nutrientes

Cantidades para preparar 1000 ml

Solución mineral 1	50 mL
Solución mineral 2	50 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Resazurina (0.1%) en agua destilada	1.0 mL
Extracto de levadura	1.0 g
Peptona de caseína	1.0 g
Bicarbonato de sodio	3.0 mg
Sol. FeSO ₄ · 7 H ₂ O (2%)	1.0 mL
Sol. NiCl ₂ (5 mg/100 ml)	10.0 mL
Cisteína	0.5 g

2. Preparación del medio de cultivo

1. Colocar los reactivos excepto la cisteína en un matraz de 1000 ml (lavados con una solución de HCl al 1%), aforar con agua destilada.
2. Repartir el medio en dos matraz de 1000 ml y adicionar un excedente de 150-200 ml de agua destilada a cada matraz.
3. Colocar dentro de cada matraz una jeringa sin aguja, conectada con una manguera a un sistema de distribución de gas (nitrógeno), mantener la jeringa por encima del nivel del líquido y tapar con papel aluminio.
4. El medio se pone a calentar en una parrilla y una vez que comienza a ebullición se introduce la jeringa a una altura aproximada de 1.5 cm por debajo del nivel del líquido con una corriente de nitrógeno constante, hasta que el medio vire de rosa a incoloro (reducción completa).
5. Se procura mantener en caso necesario, el volumen requerido con agua destilada hasta completar la reducción del medio.
6. Una vez reducidos se enfrían en un recipiente con agua manteniendo la corriente de nitrógeno.

7. Una vez tibio el medio (aproximadamente a 30°C) se agrega la cisteína rápidamente dejándola caer por las paredes del matraz. Evitar en lo posible la introducción del aire, tapar y burbujear con la corriente de nitrógeno durante 10 minutos adicionales.
8. Quitar la corriente de nitrógeno y tapar con un tapón de hule sellando el perímetro del matraz con cinta adhesiva. Dejar un extremo libre de la cinta para quitarlo una vez dentro de la cámara anaerobia.
9. Esterilizar 15 minutos en autoclave a 15 lb/in².
10. Medir el pH final (6.8-7.5).
11. Guardar en la cámara anaerobia hasta el momento de inocular.

3. Fuente de inóculo

El inóculo se deberá obtener preferentemente de una planta anaerobia de tratamiento de aguas residuales, se debe realizar una preaclimatación a etanol o al sustrato a degradar con el fin de aumentar la AME a un mínimo de 0.5 gCH₄/gSSV-d, con el fin de aumentar la degradación del compuesto y disminuir los posibles efectos inhibitorios.

Antes de realizar la inoculación se deberá dejar el lodo granular en la précamara de vacío de la cámara anaerobia con el fin de eliminar el sustrato remanente y así disminuir la producción endógena dentro de la prueba.

Se recuerda que en ningún momento se debe poner en contacto al inóculo con aire ya que esta exposición puede reducir parcial o totalmente la actividad de los microorganismos.

4. Inoculación

1. Se emplearán botellas serológicas de 160mL (el volumen puede ser diferente), se agregan 10 mL de medio de nutrientes, se tapan con septos de hule y arillos metálicos
2. Se elimina el oxígeno en las botellas purgándolas con una mezcla de nitrógeno y bióxido de carbono para asegurar la obtención de ambiente anaerobio
3. Las botellas se esterilizan en autoclave para lograr la completa reducción del medio. El medio deberá tener un color paja o transparente. La presencia de una coloración rosada indica contaminación por oxígeno, con lo cual estas serán descartadas para realizar la prueba

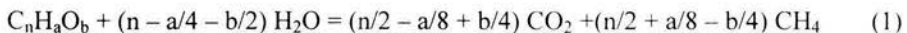
4. Los sustratos y el inóculo se ingresan a la cámara anaerobia en condiciones de anaerobiosis estricta. Una vez dentro se inoculan más la cantidad de sustrato y lodo necesario para cada prueba (se recomienda utilizar de 1000 a 3000 mg SSV/L), completando el volumen requerido con agua reducida
5. Adicionalmente por cada prueba con distintas condiciones iniciales se corren botellas únicamente con medio y la cantidad de biomasa necesaria con el fin de conocer la producción endógena de metano
6. La incubación se lleva a cabo a temperatura controlada de 35°C, con agitación a 130 rpm por medio de un agitador orbital
7. La cuantificación del biogás producido se realiza por medio de un transductor de presión de acuerdo con Shelton y Tiedje (1984)
8. La composición del gas se realiza por medio de un cromatógrafo de gases

5. Cálculos

5.1. Producción teórica de metano

La producción teórica de metano se puede calcular de dos formas:

- Cuando se conoce el compuesto a degradar, empleando la ecuación de Tarvin y Brusswell (Birch *et al.*, 1989), con la cual los materiales que contienen Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, son convertidos a dióxido de carbono y metano de acuerdo a la siguiente fórmula empírica:



- Cuando no se conoce el compuesto a degradar o cuando es un agua residual compuesta de varias sustancias, la producción teórica de metano se calcula determinando la DQO de la muestra a degradar y se emplea la ecuación 2 de acuerdo con Henze y Harremoës (1983):

$$0.35 \text{ m}^3 \text{ de CH}_4/\text{Kg de DQO removida} \quad (2)$$

Posteriormente los m^3 de CH_4 son transformados a moles de CH_4 .

5.2. Número de moles de biogás en la botella

El número de moles de biogás en la botella se calcula asumiendo que tiene un comportamiento de gas ideal, por medio de la ecuación de los gases ideales(3):

$$PV=nRT \quad (3)$$

Sustituyendo:

$$n = \frac{PV}{RT}$$

Donde:

- N Número de moles en la fase gaseosa
- P Presión en la lectura del transductor de presión (en atm)
- V Volumen del espacio de la fase gaseosa (en litros)
- T Temperatura (en grados Kelvin)
- R Constante de los gases ideales (0.08205 litros*atm/moles/grados Kelvin)

Para obtener el porcentaje de metano se debe calcular en relación al porcentaje de metano obtenido del análisis del biogás realizado por medio de un cromatógrafo de gases.

Se construye una curva de producción de metano de donde se obtiene:

1. **Tiempo de latencia, $TL_{(10)}$** el cual es el tiempo necesario para obtener el 10% de la degradación del sustrato
2. **Actividad metanogénica específica**, calculada por medio de la pendiente máxima de la curva de producción de metano
3. **Porcentaje de biodegradabilidad**, el cual es calculado con la ecuación 4.

$$\%Biod = \frac{CE}{CT} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

%Biodeg = % de biodegradabilidad

CE = producción de CH₄ experimental (total)

CT = producción de CH₄ teórico

ANEXO 2

PRUEBA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

1. Preparación del medio de nutrientes

La preparación de las soluciones minerales se puede llevar a cabo en condiciones aerobias, con agua destilada (neutralizada previamente con KOH), se debe preservar a 4°C.

Solución mineral 1 (1000 mL)

K_2HPO_4	6.0 g
------------	-------

Solución mineral 2 Con sulfatos (1000 mL)

KH_2PO_4	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	6.0 g
NaCl	12.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.6 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.16 g
$CaCl_2$ (cuando no hay la anterior)	0.12 g

Solución mineral 2 Sin sulfatos (1000 mL)

KH_2PO_4	6.0 g
NH_4Cl	2.4 g
NaCl	12.0 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.1 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.16 g
$CaCl_2$ (cuando no hay la anterior)	0.12 g

Solución de Vitaminas (1000 mL)

Biotina	2.0 mg
Ácido fólico	2.0 mg
Pridoxina	10.0 mg
Tiamina	5.0 mg
Riboflavina	5.0 mg
Ácido nicotínico	5.0 mg
Pantotenato de calcio	5.0 mg
Vitamina B_{12}	0.1 mg
Ácido p-aminobenzóico	5.0 mg
Ácido lipóico	5.0 mg

Solución de oligoelementos (1000 mL)

Ácido nitrilotriacético	1.5 g
Ajustar el pH a 6.5 con KOH antes de agregar lo siguiente:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0 g

MnSO ₄ · H ₂ O	0.5 g
NaCl	1.0 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g
CoSO ₄	0.1 g
CoCl ₂ (cuando no hay la anterior)	0.1 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄	0.1 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.01 g
AlK (SO ₄) ₂	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ Mo ₄ · 2H ₂ O	0.01 g

2. Medio general

Cantidades para preparar 1000 ml

Solución mineral 1	50 mL
Solución mineral 2*	50 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Resazurina (0.1%) en agua destilada	1.0 mL
Extracto de levadura	1.0 g
Peptona de caseína	1.0 g
Bicarbonato de sodio	3.0 mg
Sol. FeSO ₄ · 7 H ₂ O (2%)	1.0 mL
Sol. NiCl ₂ (5 mg/100 ml)	10.0 mL
Cisteína	0.5 g

*Con sulfatos o con cloruros (sin sulfatos), dependiendo del grupo bacteriano.

3. Preparación de los medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo se realiza de la misma forma que para la realización de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia.

3.1. Medio para bacterias acetocásticas, fermentativas e hidrogenófilas

Se utiliza el medio general, pero se emplea la solución mineral 2 con sulfatos. En el caso de las bacterias acetoclásticas se adiciona además 5.0 g/L de acetato de sodio, antes de comenzar a reducir el medio de cultivo.

3.2. Medio para bacterias sintróficas consumidoras de propionato y butirato (OHPA_p y OHPA_b)

Se utiliza el medio general, pero se emplea la solución mineral 2 sin sulfatos

3.3. Medio para bacterias sulfato-reductoras (SR)

Solución mineral 1	100 mL
Solución mineral 2 con sulfatos	100 mL
Resazurina	1.0 mL
Extracto de levadura	1.0 g
Sol. $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (2%)	0.5 g
Sol. De ácido láctico neutralizado	8.5 mL
Cisteína	0.25 g

1. Colocar todas las sustancias en un matraz incluso la cisteína
2. Adicionar aproximadamente 300 mL de agua destilada y medir el pH, que generalmente es ácido, ajustar con una solución de NaOH 0.01 M, a un pH de 7.8
3. Aforar a 1000 mL
4. Reducir el medio de la misma forma que el medio general, hasta obtener condiciones reductoras
5. Enfriar el medio en baño de agua manteniendo la corriente de nitrógeno. Una vez frío, medir el pH y ajustar a 7.8

4. Sustratos para la determinación del NMP

La preparación de los sustratos requeridos se lleva a cabo colocando en un tubo tipo Hungate lo siguiente:

- a) Ácido butírico: 1 mL del ácido más una lenteja de NaOH
- b) Ácido propiónico: 1 mL del ácido más una lenteja de NaOH
- c) Glucosa: 2.5 g de dextrosa

4.1. Procedimiento de preparación

1. Los tubos se tapan y en el septo se colocan dos agujas antes de meter a la precámara anaerobia, con el propósito de lograr el cambio de atmósferas dentro del tubo
2. Poner a reducir aproximadamente 300 mL de agua destilada bajo una corriente de nitrógeno
3. Enfriar y tapar de la manera ya descrita
4. dentro de la cámara anaerobia poner 9 mL de agua reducida a cada tubo de los ácidos butírico y propiónico y 10 mL a los tubos de glucosa

5. Tapar cada tubo con tapón de rosca y septo, sacar y esterilizar 15 minutos a 15 psig. Estos sustratos deben almacenarse a 4°C

5. Preparación de la solución de sulfuro de sodio

Se prepara a una concentración aproximada de 2.5%, se utiliza para reducir el medio al momento de inocularlo. Se prepara de la siguiente forma:

1. A 100 mL de agua destilada agregar 1 lenteja de NaOH
2. Reducir y enfriar bajo corriente de nitrógeno
3. En un frasco lavar 3g de Na₂S con agua destilada, hasta que queden de 2.0 a 2.5 g
4. Agregar el Na₂S al agua reducida y fría, retirar corriente de nitrógeno y tapar
5. En la cámara anaerobia repartir la solución en tubos con 10 mL en cada uno
6. Esterilizar a 15 psig durante 15 minutos

6. Inoculación

6.1. Inoculación de los tubos

1. Introducir en la cámara anaerobia los medios, tubos de cultivo y el equipo necesario para su dosificación, Hacer tres cambios de vacío antes de introducir el material
2. Poner 5 mL de medio a cada tubo y 9 mL en los tubos de dilución
3. Fuera de la cámara anaerobia, cambiar atmósferas utilizando un sistema distribuidor de gases, con la mezcla requerida durante 2 minutos, una vez introducida la corriente de gas, se coloca otra aguja que servirá para la evacuación de la aguja interna. Las mezclas de acuerdo al grupo bacteriano son las siguientes:
Hidrogenófilas: H₂-CO₂ (20%-80%)
Fermentativas, acetoclásticas, OHPA y SR: N₂-CO₂ (20%-80%)
4. Esterilizar en autoclave a 15 psig durante 15 minutos
5. Medir el pH final (6.8-7.5)
6. Guardar en la cámara anaerobia hasta el momento de inocular

6.2. Preparación de diluciones de la muestra problema

1. En caso de no procesar de inmediato la muestra, hacer cambio de atmósferas con una mezcla de H_2 - CO_2 durante 15 minutos y tapar
2. Introducir una muestra homogénea a la cámara anaerobia haciendo tres cambios de vacío. Macerar la muestra con un macerador de tejidos y vaciar en un recipiente
3. Preparar diluciones de la muestra en tubos de 9 mL de medio general de la siguiente manera: Tomar 1 mL de lodo con jeringa estéril y aguja hipodérmica de 23 X 24 mm, inyectar en el tubo marcado como 10^{-1} y agitar. Con otra jeringa estéril tomar 1 mL de esta dilución e inyectarla al tubo marcado como 10^{-2} , seguir así sucesivamente, hasta terminar con la última dilución requerida

6.3. Inoculación de los medios (NMP con 5 tubos por dilución)

1. Fuera de la cámara anaerobia flamear el septo de los tubos con alcohol. Inocular entre dos mecheros para asegurar condiciones asépticas
2. Adicionar 0.1 mL de la solución de Na_2S a cada tubo, con jeringa, purgando con nitrógeno entre cada adición (excepto a los tubos de las SR)
3. Agregar 0.1 mL del sustrato requerido (en el caso de las $OHPA_b$ ácido butírico, para las $OHPA_p$ ácido propiónico y para las demás glucosa, excepto en las SR ya que el sustrato está incorporado en el medio) lo más rápidamente posible, purgando la jeringa entre cada toma de sustrato. Utilizar una jeringa para cada sustrato. La inoculación de las bacterias fermentativas deberá hacerse necesariamente entre 2 mecheros
4. Con otra jeringa agregar 0.2 mL de la dilución requerida, empezando por la máxima, purgar con nitrógeno y agitar la dilución con un Vortex, entre cada toma de muestra. Si se desconoce la muestra trabajar con 10 diluciones, en caso contrario inocular por lo menos 6 diluciones por muestra
5. Agitar los tubos e incubarlos a $35^\circ C$ de 1 a 1.5 meses a excepción de las fermentativas y las SR que son durante 1 semana
6. Las bacterias hidrogenófilas deben incubarse horizontalmente y alimentarse cada tercer día mediante la introducción de una corriente de H_2 - CO_2 sin colocar aguja para el desalajo de gas
7. La característica distintiva de crecimiento es la producción de metano que se cuantifica por cromatografía de gases, a excepción de las bacterias fermentativas en donde se observa una turbiedad blanquecina en el medio y de las bacterias SR en donde la característica de crecimiento la da una coloración negra debida a la formación de FeS

7. Cálculo del Número más probable (NMP)

Al finalizar el periodo de incubación se evalúa la cantidad de tubos con crecimiento bacteriano (positivos) y los que no tuvieron crecimiento (negativos). Los resultados de cada serie se enlistan de menor a mayor dilución en los que todos los tubos resulten positivos, cuantificar el número de tubos positivos para las siguientes diluciones y tomar 3 cifras.

Ejemplo:

Bacterias en series de 5 tubos (fermentativas)

Dilución	No. De Tubos	
	Positivos	Negativos
1×10^{-5}	5	0
1×10^{-6}	5	0
1×10^{-7}	5	0
1×10^{-8}	5	0
1×10^{-9}	5	0
1×10^{-10}	2	3
1×10^{-11}	0	5

CÓDIGO: 5 2 0



Esta combinación de números se localiza en la tabla de Mc Grady (Tabla A) y se obtiene el número de bacterias que en este caso es 5.0

Proceder al cálculo del NMP con los siguientes datos:

Máxima dilución en que todos fueron positivos: 10^{-9}

No. De bacterias en la tabla de Mc Grady: 5.0

SSV del inóculo en cada tubo: 11.2 g/L

Volumen de inóculo en cada tubo: 0.2 mL

Ecuación para determinar el NMP:

$$\text{NMP} = \frac{(\text{No. En tablas})(\text{Máxima dilución positiva})(1000)}{(\text{volumen del inóculo})(\text{SSV})}$$

Sustituyendo:

$$\text{NMP} = \frac{(5.0)(10^9)(1000)}{(0.2)(11.2)} = 2.23 \times 10^{13}$$

$$\text{NMP} = 2.23 \times 10^{13} \text{ bacterias/g SSV}$$

Tabla A. Tabla de Mc Grady para la lectura del código, del NMP de bacterias anaerobias, por pruebas en tubo múltiple

A	B	A	B	A	B	A	B
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	26.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0

Donde:

A = Código de la lectura de tubos positivos

B = Número de bacterias

ANEXO 3

DATOS DEL DESARROLLO DE LAS PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD

1. Influencia del origen del inóculo

Sustrato: Glucosa (50 mg/L)

Biomasa: 50 mgSSV/L

Dh= Tiempo de muestra (h)

Resultados:

Promedio (mmol)

Dh (h)	CER	QUI	MUN	EST	LAC
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.07	0.00	0.02	0.02	0.01
3	0.19	0.03	0.04	0.04	0.03
5	0.45	0.08	0.05	0.17	0.05
7	0.50	0.23	0.07	0.21	0.05
9	0.53	0.37	0.34	0.24	0.06
10.5	0.53	0.39	0.48	0.25	0.07
24.5	0.53	0.40	0.51	0.26	0.11
31	0.55	0.41	0.53	0.27	0.15
49.5	0.56	0.42	0.54	0.28	0.17
57.5	0.57	0.43	0.54	0.29	0.18
81.5	0.58	0.44	0.56	0.31	0.19
105.5	0.59	0.45	0.57	0.32	0.20
129.5	0.59	0.46	0.56	0.32	0.20

Desviación estándar

Dh (h)	CER	QUI	MUN	EST	LAC
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.002	0.002	0.005	0.000	0.002
3	0.007	0.001	0.002	0.007	0.002
5	0.004	0.002	0.005	0.003	0.006
7	0.002	0.003	0.002	0.002	0.012
9	0.012	0.004	0.004	0.006	0.006
10.5	0.002	0.002	0.007	0.004	0.011
24.5	0.003	0.008	0.014	0.004	0.002
31	0.004	0.002	0.007	0.000	0.002
49.5	0.002	0.007	0.004	0.008	0.005
57.5	0.004	0.010	0.002	0.006	0.003
81.5	0.002	0.010	0.002	0.000	0.001
105.5	0.021	0.009	0.004	0.005	0.002
129.5	0.024	0.015	0.012	0.035	0.029

Sustrato: Fenol (50 mg/L)

Biomasa: 50 mgSSV/L

Dh= Tiempo de muestra (h)

Resultados:

Promedio (mmol)

Dh (h)	CER	QUI	MUN	EST	LAC
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0.02	0
10.5	0	0	0	0.02	0
24.5	0	0	0	0.03	0
31	0	0	0	0.03	0.03
49.5	0.01	0	0	0.05	0.05
57.5	0.07	0	0	0.05	0.06
81.5	0.19	0	0	0.05	0.06
105.5	0.28	0	0	0.05	0.07
129.5	0.36	0.06	0.05	0.05	0.14
155	0.4	0.09	0.1	0.08	0.17
210	0.48	0.12	0.15	0.08	0.2
308	0.58	0.16	0.2	0.1	0.24
395	0.68	0.19	0.24	0.12	0.24
520	0.81	0.24	0.3	0.12	0.26
650	0.92	0.3	0.36	0.12	0.26

Desviación estándar

Dh (h)	CER	QUI	MUN	EST	LAC
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000
10.5	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000
24.5	0.000	0.000	0.000	0.049	0.035
31	0.000	0.000	0.000	0.049	0.049
49.5	0.028	0.000	0.000	0.035	0.035
57.5	0.007	0.000	0.000	0.035	0.064
81.5	0.078	0.000	0.000	0.035	0.064
105.5	0.085	0.071	0.106	0.035	0.057
129.5	0.099	0.064	0.035	0.113	0.042
155	0.141	0.042	0.035	0.085	0.092
210	0.014	0.057	0.035	0.085	0.071
308	0.057	0.028	0.071	0.071	0.042
395	0.014	0.078	0.113	0.057	0.042
520	0.064	0.042	0.071	0.057	0.028
650	0.057	0.071	0.099	0.057	0.170

2. Influencia de So/Xo (inhibición)

Sustrato: Glucosa 1000 mg/L

Biomasa: 500 mgSSV/L

Dh= Tiempo de muestra (h)

So/Xo=2

Resultados:

Promedio (mmol)

Dh/mg4-CF	0	1	5	10	15	20	30	50	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.03	0.026	0.022	0.016	0.014	0.008	0	0	0
4	0.097	0.097	0.081	0.073	0.065	0.061	0.036	0.032	0.024
12	0.365	0.343	0.327	0.311	0.301	0.283	0.262	0.196	0.141
24	0.505	0.48	0.46	0.444	0.424	0.412	0.367	0.279	0.145
48	0.666	0.654	0.646	0.618	0.594	0.561	0.521	0.367	0.145
96	0.997	0.967	0.925	0.878	0.85	0.795	0.731	0.428	0.149
120	1.175	1.11	1.062	1.005	0.941	0.892	0.775	0.456	0.166
168	1.417	1.292	1.232	1.131	1.09	1.022	0.812	0.491	0.182

Desviación estándar

Dh	0	1	5	10	15	20	30	50	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.003	0.003	0.003	0	0.003	0.001	0.04	0.012	0.001
4	0.002	0	0.004	0.001	0	0.006	0.006	0.003	0.001
12	0.003	0.006	0.006	0.006	0.003	0.001	0.006	0.003	0.006
24	0.006	0.006	0.004	0	0.006	0.011	0.006	0.006	0.011
48	0.006	0	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.011
96	0.006	0.003	0.006	0.003	0.003	0.006	0.006	0.001	0.006
120	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.001	0.006	0.006
168	0.006	0.005	0.002	0	0.001	0.006	0.002	0.003	0.006

Sustrato: Glucosa 1000 mg/L

Biomasa: 1000 mgSSV/L

Dh= Tiempo de muestra (h)

So/Xo=1

Resultados:

Promedio (mmol)

Dh/mg4-CF	0	1	5	10	15	20	30	50	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.038	0.032	0.032	0.024	0.024	0.016	0.008	0.008	0.006
4	0.121	0.119	0.107	0.091	0.081	0.081	0.065	0.036	0.032
12	0.386	0.38	0.369	0.357	0.347	0.329	0.299	0.279	0.178
24	0.541	0.537	0.529	0.525	0.513	0.489	0.464	0.384	0.182
48	0.743	0.735	0.727	0.723	0.719	0.69	0.674	0.489	0.182
96	1.104	1.098	1.07	1.052	1.024	0.977	0.933	0.65	0.198
120	1.32	1.308	1.272	1.223	1.199	1.163	1.054	0.719	0.214
168	1.619	1.571	1.522	1.458	1.393	1.345	1.248	0.751	0.214

Desviación estándar

Dh	0	1	5	10	15	20	30	50	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.003	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0.003	0.003	0.003	0.001	0	0	0.006	0
12	0.003	0	0.003	0.003	0	0.003	0.001	0.006	0
24	0.004	0.006	0.006	0	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
48	0.008	0.001	0	0.006	0.011	0.006	0.006	0.006	0.006
96	0.003	0	0.006	0.003	0.003	0.011	0.006	0.006	0.006
120	0.006	0.008	0.006	0.017	0.006	0.011	0.006	0.011	0.006
168	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.011	0.006

Sustrato: Glucosa 1000 mg/L

Biomasa: 3000 mgSSV/L

Dh= Tiempo de muestra (h)

So/Xo=0.33

Resultados:

Promedio (mmol)

Dh/mg4-CF	0	1	5	10	15	20	30	50	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.04	0.036	0.032	0.028	0.024	0.02	0.016	0.012	0.012
4	0.133	0.125	0.115	0.097	0.089	0.081	0.065	0.04	0.04
12	0.464	0.46	0.452	0.444	0.428	0.418	0.376	0.279	0.202
24	0.65	0.646	0.634	0.61	0.614	0.598	0.533	0.367	0.202
48	0.977	0.965	0.925	0.88	0.848	0.828	0.707	0.489	0.202
96	1.458	1.454	1.324	1.236	1.191	1.163	1.013	0.666	0.206
120	1.603	1.601	1.482	1.401	1.353	1.312	1.191	0.739	0.226
168	1.655	1.643	1.619	1.595	1.571	1.534	1.417	0.868	0.262

Desviación estándar

Dh	0	1	5	10	15	20	30	50	100
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0.006	0	0.006	0	0.006	0	0.005	0.006
4	0.006	0.006	0.003	0	0.005	0.001	0.004	0	0.002
12	0.006	0.008	0	0.001	0.003	0.003	0.006	0.044	0.005
24	0.006	0.001	0.006	0.006	0.004	0	0.011	0.096	0.001
48	0.011	0.006	0.006	0.011	0.011	0.006	0.006	0.166	0.004
96	0.006	0	0.011	0.011	0.006	0.011	0.006	0.266	0.006
120	0.006	0.003	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.296	0.002
168	0.011	0.006	0.006	0.006	0.006	0.004	0.006	0.35	0.006

3. Influencia de la relación So/Xo (biodegradabilidad)

Sustrato: Glucosa (G) A=125 mg/L B=250 mg/L C=500 mg/L D=1000 mg/L

Biomasa: 1=1000 mgSSV/L 1.5=1500 mgSSV/L 2=2000 mgSSV/L 3=3000 mgSSV/L

Dh= Tiempo de muestra (h)

Resultados:

Promedio (mmol)

Dh	GA1	GA1.5	GA2	GA3	Dh	GB1	GB1.5	GB2	GB3	Dh	GC1	GC1.5	GC2	GC3	Dh	GD1	GD1.5	GD2	GD3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.008	0.008	0.008	0.008	4	0.008	0.008	0.008	0.013	4	0.015	0.021	0.024	0.027	4	0.026	0.03	0.034	0.034
6	0.026	0.032	0.038	0.041	6	0.033	0.041	0.047	0.057	6	0.052	0.068	0.076	0.083	6	0.068	0.078	0.083	0.084
8	0.036	0.046	0.057	0.061	8	0.064	0.075	0.086	0.101	8	0.097	0.117	0.128	0.146	8	0.144	0.177	0.206	0.23
10	0.06	0.072	0.089	0.103	10	0.099	0.113	0.13	0.156	10	0.154	0.18	0.199	0.23	10	0.241	0.283	0.337	0.384
24	0.161	0.183	0.217	0.254	24	0.227	0.249	0.284	0.33	24	0.305	0.342	0.385	0.439	24	0.472	0.547	0.624	0.69
40	0.197	0.227	0.266	0.315	40	0.276	0.3	0.339	0.401	40	0.353	0.391	0.443	0.515	40	0.551	0.65	0.738	0.8
70	0.241	0.271	0.307	0.362	70	0.322	0.354	0.399	0.467	70	0.419	0.452	0.503	0.592	70	0.64	0.734	0.824	0.903
90	0.276	0.312	0.357	0.413	90	0.375	0.413	0.459	0.53	90	0.487	0.541	0.624	0.729	90	0.713	0.818	0.912	1.005
120	0.3	0.336	0.382	0.44	120	0.414	0.452	0.5	0.568	120	0.578	0.629	0.711	0.804	120	0.84	0.943	1.037	1.129
144	0.325	0.359	0.401	0.455	144	0.45	0.492	0.544	0.608	144	0.65	0.704	0.778	0.86	144	0.902	1.011	1.109	1.204
170	0.348	0.38	0.416	0.465	170	0.483	0.528	0.576	0.635	170	0.709	0.768	0.837	0.902	170	0.985	1.109	1.203	1.291
220	0.365	0.397	0.426	0.469	220	0.509	0.549	0.6	0.653	220	0.8	0.852	0.91	0.965	220	1.051	1.182	1.279	1.363
244	0.373	0.401	0.426	0.469	244	0.547	0.575	0.61	0.659	244	0.848	0.903	0.957	1.006	244	1.254	1.396	1.486	1.555
268	0.373	0.401	0.426	0.469	268	0.558	0.581	0.61	0.659	268	0.89	0.94	0.994	1.035	268	1.302	1.454	1.551	1.61
290	0.373	0.401	0.426	0.469	290	0.558	0.581	0.61	0.659	290	0.924	0.966	1.007	1.041	290	1.355	1.505	1.598	1.653
314	0.373	0.401	0.426	0.469	314	0.558	0.581	0.61	0.659	314	0.94	0.976	1.007	1.041	314	1.4	1.553	1.649	1.696
330	0.373	0.401	0.426	0.469	330	0.558	0.581	0.61	0.659	330	0.94	0.976	1.007	1.041	330	1.498	1.634	1.708	1.743
354	0.373	0.401	0.426	0.469	354	0.558	0.581	0.61	0.659	354	0.94	0.976	1.007	1.041	354	1.567	1.698	1.761	1.768
378	0.373	0.401	0.426	0.469	378	0.558	0.581	0.61	0.659	378	0.94	0.976	1.007	1.041	378	1.647	1.742	1.776	1.776

Desviación estándar

Dh	GA1	GA1.5	GA2	GA3	Dh	GB1	GB1.5	GB2	GB3	Dh	GC1	GC1.5	GC2	GC3	Dh	GD1	GD1.5	GD2	GD3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	4	0	0	0	0.007	4	0.009	0.005	0.005	0	4	0.005	0.005	0.005	0.005
6	0.003	0	0.002	0	6	0.002	0	0	0.007	6	0.014	0.005	0.006	0.004	6	0.001	0.006	0.006	0.006
8	0.009	0	0.005	0.003	8	0.004	0.004	0.004	0.007	8	0.014	0.009	0.013	0.008	8	0.006	0.009	0.011	0.011
10	0.009	0.003	0.008	0.006	10	0.006	0.005	0.009	2E-09	10	0.009	0.005	0.01	0.008	10	0.002	0.02	0.011	0.027
24	0.006	0.006	0.005	0.01	24	0.006	0.007	0.013	0.004	24	0.007	0.011	9E-04	9E-04	24	0.013	0.009	0.022	0.021
40	0.003	0.005	0.008	0.005	40	0.006	0.009	0.018	0.011	40	0.004	0.017	0.009	0	40	0.021	0.001	0.035	0.029
70	0.003	0.007	0.002	0.001	70	7E-04	0.013	0.019	0.001	70	9E-04	0.02	0.005	0.003	70	0.015	0.004	0.025	0.033
90	0.006	0.011	0.002	0.005	90	7E-04	0.005	0.015	0.005	90	0.01	0.025	0.007	0.005	90	0.015	0.006	0.009	0.026
120	0.004	0.013	0.008	0.005	120	0.004	0.004	0.015	0.001	120	0.018	0.019	0.016	0.007	120	0.021	0.002	0.025	0.024
144	0.007	0.011	0.01	0.005	144	0.001	0.009	0.015	0.001	144	0.011	0.012	0.029	0.004	144	0.022	0	0.027	0.005
170	0.009	0.007	0.01	0.005	170	0.014	0.013	0.017	0.005	170	0.004	0.005	0.033	0.004	170	0.037	0.01	0.035	0.002
220	0.013	0.005	0.01	0.005	220	0.007	0.017	0.017	0.005	220	0.004	0.003	0.037	0.004	220	0.027	0.026	0.032	0.007
244	0.013	0.005	0.01	0.005	244	0.013	0.017	0.017	0.005	244	9E-04	0.005	0.044	9E-04	244	0.037	0.042	0.025	0.006
268	0.013	0.005	0.01	0.005	268	0.013	0.017	0.017	0.005	268	0.004	0.004	0.039	9E-04	268	0.042	0.042	0.027	0.016
290	0.013	0.005	0.01	0.005	290	0.013	0.017	0.017	0.005	290	0.004	0.004	0.039	9E-04	290	0.045	0.041	0.031	0.013
314	0.013	0.005	0.01	0.005	314	0.013	0.017	0.017	0.005	314	0.008	0.004	0.039	9E-04	314	0.047	0.04	0.026	0.013
330	0.013	0.005	0.01	0.005	330	0.013	0.017	0.017	0.005	330	0.008	0.004	0.039	9E-04	330	0.052	0.042	0.032	0.013
354	0.013	0.005	0.01	0.005	354	0.013	0.017	0.017	0.005	354	0.008	0.004	0.039	9E-04	354	0.058	0.045	0.032	0.013
378	0.013	0.005	0.01	0.005	378	0.013	0.017	0.017	0.005	378	0.008	0.004	0.039	9E-04	378	0.047	0.045	0.032	0.013

Sustrato: Fenol (F) A=65 mg/L B=130 mg/L C=260 mg/L D=560 mg/L
 Biomasa: 1=1000 mgSSV/L 1.5=1500 mgSSV/L 2=2000 mgSSV/L 3=3000 mgSSV/L
 Dh= Tiempo de muestra (d)

Resultados:
 Promedio (mmol)

Dh	FA1	FA1.5	FA2	FA3	Dh	FB1	FB1.5	FB2	FB3	Dh	FC1	FC1.5	FC2	FC3	Dh	FD1	FD1.5	FD2	FD3
0.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0
1	0.0192	0.017	0.0215	0.028	1	0.0214	0.0214	0.0339	0.0384	1	0.0275	0.014	0.027	0.0506	1	0.0294	0.0356	0.0531	0.0661
2	0.0367	0.0353	0.0435	0.0591	2	0.0472	0.0485	0.0711	0.086	2	0.0566	0.0546	0.0751	0.0981	2	0.0644	0.0814	0.1029	0.1362
3	0.0523	0.0495	0.0608	0.0746	3	0.0662	0.0707	0.0949	0.1143	3	0.0796	0.0811	0.1036	0.1257	3	0.0944	0.1148	0.1464	0.1928
4	0.0616	0.0591	0.0735	0.0879	4	0.0876	0.1005	0.1236	0.1466	4	0.1217	0.1167	0.1487	0.1577	4	0.1425	0.1588	0.2182	0.2691
5	0.0709	0.0715	0.0817	0.0961	5	0.1009	0.1227	0.1397	0.1643	5	0.1527	0.1467	0.1587	0.1913	5	0.2216	0.2125	0.2781	0.3369
8	0.0766	0.0808	0.0938	0.106	8	0.1223	0.153	0.1781	0.2108	8	0.1777	0.1993	0.2138	0.2704	8	0.2826	0.3002	0.377	0.45
10	0.0822	0.0907	0.1051	0.1224	10	0.1365	0.1773	0.2043	0.237	10	0.2103	0.2554	0.2889	0.338	10	0.3363	0.3934	0.4234	0.5319
12	0.0916	0.1037	0.1167	0.1337	12	0.1567	0.1874	0.2306	0.256	12	0.2328	0.2919	0.342	0.4156	12	0.3787	0.4601	0.4997	0.593
15	0.102	0.1179	0.1337	0.1481	15	0.1801	0.2176	0.2487	0.2794	15	0.2629	0.342	0.3795	0.4832	15	0.4042	0.5252	0.5953	0.7117
17	0.1148	0.1297	0.1481	0.167	17	0.195	0.233	0.2669	0.3016	17	0.2904	0.382	0.4446	0.5432	17	0.4296	0.5902	0.6461	0.7795
19	0.1241	0.1422	0.1634	0.1846	19	0.2213	0.2552	0.2883	0.3339	19	0.333	0.4246	0.5147	0.6013	19	0.4647	0.6371	0.7507	0.8756
22	0.134	0.1555	0.1702	0.1916	22	0.2354	0.2774	0.3125	0.3577	22	0.368	0.4747	0.5648	0.6514	22	0.4958	0.6981	0.8101	0.9406
25	0.1453	0.1682	0.1809	0.2052	25	0.2463	0.2927	0.3307	0.3747	25	0.4056	0.5072	0.6008	0.6914	25	0.5195	0.7422	0.8864	1.0367
28	0.1509	0.1738	0.188	0.2145	28	0.2564	0.3049	0.344	0.3913	28	0.4356	0.5347	0.6269	0.7215	28	0.5421	0.7835	0.9474	1.0933

Desviación estándar

Dh	FA1	FA1.5	FA2	FA3	Dh	FB1	FB1.5	FB2	FB3	Dh	FC1	FC1.5	FC2	FC3	Dh	FD1	FD1.5	FD2	FD3
0.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0
1	0.0024	0	0.0016	0.0036	1	0.0006	0.0017	0.0034	0.0029	1	0.0035	0.0014	0.0014	0.0007	1	0.0016	0.0024	0.0048	0.0024
2	0.0016	0.002	0.0008	0.0028	2	0.0017	9E-10	0.0046	0.0017	2	0.0021	0.0007	0.0014	0.0042	2	0	0	0.0016	0.0056
3	0.0004	0.002	0.0012	0.0016	3	0.0011	0.0029	0.0017	0.0029	3	0.0021	0.0028	0.0035	0.0035	3	0.0024	0.0008	0.0008	0.0056
4	0.0016	0.0028	0.0008	0.0004	4	0.0029	0.0017	0.0011	0.0029	4	0.0064	0.0021	0.0007	0.0007	4	0.0016	0.0024	0.0016	0.0016
5	0.0004	0.0036	0.0036	0	5	0.0011	0.0011	0.0011	0.0006	5	0.005	0.005	0.0007	0.0028	5	0.0016	0.0064	0.0032	0.0016
8	0.0004	0.0024	0.0032	0.002	8	0.0029	0.004	0.0017	0.0023	8	0.0021	0.0014	0.0064	0.0042	8	0.0048	0.0104	0.0008	0.0176
10	0.0044	0.0044	0.0032	0.0028	10	0	0.004	0.0046	0.0051	10	0.0057	0.0071	0.0135	0.0078	10	0.0008	0.0224	0.0008	0.0216
12	0.0056	0.006	0.0024	0.0028	12	0	0.0069	0.0017	0.0034	12	0.0092	0.0191	0.0092	0.0113	12	0.0048	0.024	0.0048	0.012
15	0.0084	0.01	0.0036	0.0032	15	0.0011	0.0097	0.0011	0.0023	15	0.0092	0.0191	0.0014	0.0078	15	0.0008	0.012	0.0024	0.004
17	0.0104	0.0082	0.0032	0.002	17	0.0029	0.0108	0.0017	0.0051	17	0.0014	0.012	0.0085	0.0078	17	0.0128	0.016	0.0136	0.004
19	0.0116	0.0076	0.004	0.0028	19	0	0.0137	0	0.0029	19	0.0021	0.0156	0.0085	0.0106	19	0.0144	0.0104	0.0256	0.012
22	0.0136	0.0072	0.004	0.0048	22	0.0029	0.0166	0	0.0034	22	0.0092	0.0156	0.0085	0.0106	22	0.0184	0.0168	0.0136	0
25	0.0136	0.0052	0.0032	0.0056	25	0.0011	0.0154	0.0029	0.0046	25	0.0057	0.012	0	0.0106	25	0.0168	0.0184	0.0256	0.008
28	0.0136	0.0052	0.0012	0.0068	28	0.0017	0.0154	0.0011	0.004	28	0.0057	0.0085	0.0057	0.0106	28	0.0168	0.0208	0.0352	0.008

ANEXO 4

LISTA DE PUBLICACIONES GENERADA EN ESTE TRABAJO

En revistas internacionales

1. **Moreno I.** and Buitrón G. (2003). Influence of the inoculum origin on the anaerobic biodegradability test. *Wat. Sci. Tech.* Aceptada, en prensa
2. **Moreno I.** and Buitrón G. (2003). Influence of the initial substrate to microorganisms ratio on the anaerobic inhibition test. *Wat. Sci. Tech.* Aceptada, en prensa

En memorias de congresos internacionales

1. **Moreno I.** and Buitrón G. (2002). Influence of the initial substrate to microorganisms ratio on the anaerobic inhibition test. Oral presentation. VII Latin-American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. 22-25/Oct/2002. Mérida, México
2. **Moreno I.** and Buitrón G. (2002). Cuantificación de los grupos bacterianos de cinco inóculos usados en la prueba de biodegradabilidad anaerobia. XXVIII Inter-American Congress of the Environmental Engineering and Environmental Sciences. Oral presentation. 27 Oct -1 Nov/ 2002. Cancún, México
3. **Moreno I.** and Buitrón G. (2002). Influence of the inoculum origin on the anaerobic biodegradability test. Oral presentation. 5th IWA Conference on Chemical Industry. 13-15/ Nov/ 2002. Nimes, France
4. Valera C., Santiago L., **Moreno I.** and Buitrón G. (2002) Prototipo automatizado para la determinación de pruebas de biodegradabilidad anaerobia. VII Latin-American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. 22-25/Oct/2002. Mérida, México

En memorias de congresos nacionales

1. **Moreno I.** y Buitrón G. (2002). Influencia del origen del inóculo en la prueba de biodegradabilidad anaerobia. XIII Congreso Nacional de Ingeniería Ambiental y Ciencias Ambientales. 17-20/Abr/2002. Guanajuato, México
2. **Moreno I.** y Buitrón G. (2003). Influencia de la relación inicial sustrato/microorganismo (So/Xo) en la prueba de biodegradabilidad anaerobia. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 8-12/Abr/2003. Sometido