



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**Relación entre el potencial bioquímico de
metano y la actividad enzimática medida
con la técnica de Miller en inóculos
anaerobios de purín de vacuno**

Trabajo Fin de Máster

Valencia, Septiembre 2015

Alicia Colos Arango

Directoras:

Dra. Verónica Moset Hernández

(Universidad de Aarhus, Dinamarca)

Dra. María Cambra López

(Universitat Politècnica de València, España)

AGRADECIMIENTO

Al PRONABEC, por ser la entidad que ha hecho posible que lleve a cabo el master, y en ella a Liliana, por su amistad incondicional.

A mis directoras, Verónica y María, por sus conocimientos, dedicación, paciencia y confianza; a quienes admiro y son una referente para mí.

A Martín, por el tiempo brindado y hacer posible toda la documentación para realizar la tesis en Dinamarca.

A Henrik Møller, por la oportunidad brindada y la confianza para el desarrollo de la tesis en la Planta de Biogás del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus (Centro de Investigación Foulum).

A los doctores del Máster en Producción Animal, por compartir sus conocimientos con tanto interés y paciencia. En especial a Salva por el tiempo brindado, a Fernando que me ayudo a definirme a realizar la tesis y a Juanjo por el tiempo brindado.

A mis padres maravillosos y mis hermanos, quienes a pesar de la “distancia”, siempre están junto a mí con todo su amor.

A mis amigos de Perú, por estar siempre pendientes de mí, y demostrar que la amistad traspasa fronteras y que la “distancia” es solo una palabra.

A los amigos que conocí en España y Dinamarca, que aunque fue corto el tiempo que compartimos, son momentos inolvidables e importantes, que originaron nuestra amistad.

A Britt, Doline por el tiempo, los conocimientos y la confianza brindada y a Miguel por colaborar con la toma de los últimos datos.

RESUMEN

Se utilizaron cuatro inóculos diferenciados de la monodigestión del purín de vacuno y la codigestión del purín vacuno con pasto de pradera pretratados y ensilado, de los cuales: primero, se midieron los productos intermedios de hidrólisis de la celulosa y la paja de trigo en el inóculo a través de la producción de azúcares reductores por la técnica de Miller (DNS); y segundo, se estudió el efecto del inóculo sobre los parámetros de degradación anaerobia (biodegradabilidad) de la celulosa y la paja de trigo por el potencial bioquímico de metano (BMP) a través de modelo de Hashimoto y de Gompertz. Finalmente, ambos métodos (DNS y BMP) se relacionaron. Los inóculos procedieron de cuatro digestores de tanque agitado continuo: inóculo 1 (I1, 100% purín de vacuno), inóculo 2 (I2, 95% purín de vacuno con 5% de pasto excoriado), inóculo 3 (I3, 95% purín de vacuno con 5% de pasto picado) e inóculo 4 (I4, 95% purín de vacuno con 5% de pasto sin tratar). Como sustratos se utilizaron celulosa y paja de trigo triturada. La DNS, permitió diferenciar la actividad enzimática de la celulosa y la paja de trigo debido a la influencia de los inóculos. Los resultados de la DNS reflejaron que la tasa de unión microbiana al sustrato depende del tipo de bacterias que contiene el inóculo. Entre sustratos, la concentración de azúcares reductores de la celulosa fue menor a la paja en I2, I3 e I4. El inóculo tiene una gran influencia en la determinación de potencial de metano a 90 días (B0). La celulosa produjo un mayor B0 en el inóculo procedente del I1, mientras que la paja de trigo produjo más B0 en el inóculo I4. La celulosa resultó más biodegradable que la paja en todos los inóculos testados salvo en el I4, donde la paja de trigo resultó más biodegradable que la celulosa. En cuanto a los modelos cinéticos la tasa máxima de producción de CH₄ (μ_m) del modelo de Gompertz está directamente relacionada con la constante de velocidad del BMP (k) del modelo de Hashimoto y con la hidrólisis. Se puede relacionar la información de la técnica de DNS y la λ del modelo de Gompertz para predecir qué inóculo está más adaptado a un determinado sustrato. Sin embargo, no brinda información de la adaptación y/o evolución bacteriana del sustrato en el futuro. Para poder relacionar más estrechamente la DNS con la BMP sería necesario realizar el análisis de DNS en diferentes momentos de la BMP.

RESUM

Es van utilitzar quatre inòculs diferenciats de la monodigestió del purí de boví i la codigestió dels purins boví amb pastura de praderia pretractats i ensitjat, dels quals: primer, es van mesurar els productes intermedis de hidròlisi de la cel·lulosa i la palla de blat en el inòcul a través de la producció de sucres reductors per la tècnica de Miller (DNS); i segon, es va estudiar l'efecte de l'inòcul sobre els paràmetres de degradació anaeròbia (biodegradabilitat) de la cel·lulosa i la palla de blat pel potencial bioquímic de metà (BMP) a través de model de Hashimoto i de Gompertz. Finalment, els dos mètodes (DNS i BMP) es van relacionar. Els inòculs van procedir de quatre digestors de tanc agitat continu: inòcul 1 (I1, 100% purins de boví), inòcul 2 (I2, 95% purins de boví amb 5% de pastura (excoriacions, picat, sense tractament) , inòcul 3 (I3, 95% purins de boví amb 5% de pastura picat) i inòcul 4 (I4, 95% purins de boví amb 5% de pastura sense tractar). Com substrats es van utilitzar cel·lulosa i palla de blat triturada. La DNS, va permetre diferenciar l'activitat enzimàtica de la cel·lulosa i la palla de blat a causa de la influència dels inòculs. Els resultats de la DNS van reflectir que la taxa d'unió microbiana al substrat depèn del tipus de bacteris que conté l'inòcul. Entre substrats, la concentració de sucres reductors de la cel·lulosa va ser menor a la palla en I2, I3 i I4. El inòcul té una gran influència en la determinació de potencial de metà a 90 dies (B0). La cel·lulosa produir un major B0 en l'inòcul procedent del I1, mentre que la palla de blat va produir més B0 en l'inòcul I4. La cel·lulosa va resultar més biodegradable que la palla en tots els inòculs testats excepte en el I4, on la palla de blat va resultar més biodegradable que la cel·lulosa. Quant als models cinètics la taxa màxima de producció de CH₄ (micres) del model de Gompertz està directament relacionada amb la constant de velocitat del BMP (k) del model de Hashimoto i amb la hidròlisi. Es pot relacionar la informació de la tècnica de DNS i la λ del model de Gompertz per predir què inòcul està més adaptat a un determinat substrat. No obstant això, no brinda informació de l'adaptació i / o evolució bacteriana del substrat en el futur. Per poder relacionar més estretament la DNS amb la BMP caldria realitzar l'anàlisi de DNS en diferents moments de la BMP.

SUMMARY

Four inocula from cow manure monodigestion and the codigestion of cow manure with ensiled and pretreated prairie grass, of which: first, the intermediate products of hydrolysis of cellulose and wheat straw in the inoculum were measured through the production of sugars by the technique of Miller (DNS); and second, the effect of inoculum on the parameters of anaerobic degradation (biodegradability) of cellulose and the wheat straw by the potential of methane biochemist (BMP) through a model of Hashimoto and Gompertz were studied. Finally, both methods (DNS and BMP) were related. The inocula came from four continually stirred tank reactors: inoculum 1 (I1, 100% cow manure), 2 inoculum (I2, 95% cow manure with 5% excoriated excoriated grass), inoculum 3 (I3, 95% cow manure with 5% of chopped grass) and inoculum 4 (I4, 95% cow manure with 5% of untreated grass). As substrates, cellulose and wheat straw were used. The DNS, allowed to differentiate the enzymatic activity of cellulose and the wheat straw due to the influence of the inocula. The results of the DNS showed that the rate of union the microbial substrate depends on the type of bacteria that contains the inoculum. Between substrates, the concentration of reducing sugars from cellulose was less than the straw in I2, I3 and I4. The inoculum has a great influence in the determination of potential of methane at 90 days (B_0). The cellulose showed a higher B_0 in the inoculum from the I1, while the wheat straw produced higher B_0 in the inoculum I4. The cellulose was more biodegradable than the straw in all inocula tested except in the I4, where straw of wheat was more biodegradable that cellulose. In terms of the kinetic models, the maximum methane production rate (μ_m) of the Gompertz model was directly related to the rate constant of the BMP (k) of the model of Hashimoto and hydrolysis. We can link the technical information of the DNS and the λ of the Gompertz model to predict that inoculum is more suited for a given substrate. However, it does not provide information of adaptation and/or evolution of the bacterial substrate in the future. In order to be able to relate more closely the DNS with the BMP would be necessary to perform the analysis of DNS at different times of the BMP.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AD: digestión anaerobia, del inglés *Anaerobic Digestion*

AGV: ácidos grasos volátiles

APHA: Asociación Americana de Salud Pública, del inglés *American Public Health Association*

ATP: trifosfato de adenosina

B₀: producción máximo de metano en mlCH₄/gSV

BMP: potencial bioquímico de metano, del inglés *Biochemical Methane Potential*

CH₄: metano

CO₂: dióxido de carbono

CSTR: Digestor de tanque agitado continuo, del inglés *Continuous Stirred-Tank Reactor*

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico para la Técnica de Miller

e: constante de Euler

GEI: gases efecto invernadero

H₂: hidrógeno

H₂S: sulfuro de hidrógeno

I1: inóculo procedente del Digestor 1

I2: inóculo procedente del Digestor 2

I3: inóculo procedente del Digestor 3

I4: inóculo procedente del Digestor 4

k: constante de velocidad en día⁻¹

Ktep: kilotonelada equivalente de petróleo

MW: megavatio

N: biogás expresado a condiciones estándar de temperatura y presión (Temperatura=273,15 K°, presión=1 atm)

N₂: nitrógeno puro

NH₃: amoníaco

NH₄⁺: amonio

N-NH₄⁺: nitrógeno- amoniacal

R²: coeficiente de determinación

RMSE: error de la raíz cuadrada de la media

ST: sólidos totales

SV: sólidos volátiles

TRH: tiempo de retención hidráulico

t: tiempo (días).

t_0 = tiempo a 0 horas

t_1 = tiempo a 16 horas

t_2 = tiempo a 40 horas

UE: Unión Europea

μ_m : tasa máxima de producción de metano en $\text{mlCH}_4/\text{gSV}/\text{día}$

VCO: velocidad de carga orgánica

λ : duración de la fase de latencia en días

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	10
1.1. Digestión anaerobia	11
1.1.1. Evolución histórica	11
1.1.2. Situación del biogás en Europa	11
1.2. El proceso de la digestión anaerobia	13
1.2.1. Fase de hidrólisis	14
1.2.2. Fase acidogénica	15
1.2.3. Fase acetogénica	16
1.2.4. Fase metanogénica	17
1.3. Parámetros ambientales y de control en digestores anaerobios	18
1.3.1. Temperatura	18
1.3.2. Velocidad de carga orgánica y tiempo de retención hidráulico	18
1.3.3. pH y alcalinidad	19
1.3.4. Inhibidores	19
1.3.4.1. Nitrógeno amoniacal	19
1.3.4.2. Hidrogeno	20
1.3.4.3. Ácidos grasos volátiles	20
1.3.4.4. Sulfatos y sulfuros	20
1.4. Técnica DNS	21
1.5. Potencial bioquímico de metano	21
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	24
3.1. Inóculo	24
3.2. Sustrato: celulosa y paja de trigo	25
3.3. Caracterización fisicoquímica del inóculo y sustrato	26
3.3.1. Sólidos Totales y Sólidos Volátiles	26
3.3.2. Nitrógeno Amoniacal	27
3.3.3. Ácidos grasos volátiles	27
3.3.4. pH	27
3.4. Protocolo de medición de la actividad enzimática de inóculos	27

3.4.1. Extracción de enzimas del inóculo	27
3.4.2. Hidrólisis	28
3.4.2.1. Preparación del tampón de citrato de sodio 0,1 M	28
3.4.2.2. Hidrólisis de sustratos	28
3.4.3. Medición de azúcares reductores por la técnica de Miller	28
3.4.3.1. Preparación del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico	28
3.4.3.2. Preparación de muestras	29
3.4.4. Solución estándar de glucosa	30
3.4.4.1. Curva de calibración	30
3.5. Ensayo de biodegradabilidad en digestores de lote	31
3.5.1. Caracterización del biogás	32
3.5.2. Parametrización de modelos cinéticos del BMP	33
4. Resultados y discusión	35
4.1. Actividad enzimática en la celulosa y paja de trigo	35
4.1.1. Composición de los inóculos y sustratos para el ensayo de biodegradabilidad	35
4.1.2. Obtención de azúcares reductores con el DNS	37
4.2. Cinética de la hidrólisis de la celulosa y paja de trigo	39
4.2.1. Determinación del potencial bioquímico de metano	39
4.2.2. Parametrización de modelos	42
4.3. Relación del DNS y las cinéticas de degradación	43
5. Conclusiones	45
6. Referencias bibliográficas	46

1. Introducción

En la actualidad, independientemente del lugar, la elevada cantidad de deyecciones ganaderas que se generan en zonas intensificadas y la dependencia energética de combustibles fósiles con sus variables costes; son factores que contribuyen al riesgo ambiental y a la salud pública de la ganadería. La disponibilidad de biomasa lignocelulósica a partir praderas, desechos agrícolas como los residuos de la cosecha y el estiércol animal son una fuente importante para la producción de bioenergía en forma de biogás.

El desarrollo de la tecnología de digestión anaerobia (del inglés *Anaerobic Digestion*, AD) a través de la degradación biológica de las deyecciones ganaderas, es uno de los más idóneos para el aprovechamiento energético y la reducción de emisiones de gases efecto invernadero (GEI), especialmente por el sector ganadero. Además, de reducir el volumen, minimizar los malos olores y mejorar del valor fertilizante del purín de vacuno. Sin embargo, los potenciales de producción de biogás a partir del purín de vacuno se ven reducidos por su bajo contenido en sólidos volátiles (SV) biodegradables (al contener lignina), pero favorecido por los nutrientes que posee.

Actualmente en las plantas de biogás se siguen dos estrategias para mejorar este problema y promover la producción de biogás a partir de purines ganaderos: la codigestión anaerobia de subproductos ganaderos y residuos orgánicos en sistemas de mezcla completa y la realización de pretratamientos que mejoren la biodegradabilidad de la materia orgánica, especialmente la hidrólisis.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los productos intermedios de degradación y la biodegradabilidad de la celulosa y la paja de trigo con inóculos diferenciados, procedentes de la codigestión de purín de vacuno y pasto de prado pretratados. Este trabajo brinda información valiosa del sustrato a utilizar que optimizará el diseño y funcionamiento de un digestor anaerobio con purín de vacuno.

1.1. Digestión anaerobia

1.1.1. Evolución histórica

La historia en el campo de la AD es amplia, a partir del tratamiento de aguas residuales y desechos orgánicos. La evidencia anecdótica señala que en Mesopotamia en el siglo X a.C, ya se utilizaba el biogás para calentar agua. En 1776, Alessandro Volta investigó la formación de gas en pantanos, Deublein y Steinhäuser (2008). Adicionalmente, con el desarrollo de la microbiología en 1930, al identificarse bacterias anaerobias e investigaciones que favorecían la producción de metano (CH₄). A principios de 1990, los diseños y construcciones de plantas piloto para la AD de residuos orgánicos se hizo conocido a nivel mundial (Karagiannidis y Perkoulidis, 2009).

Posteriormente en países industrializados, el desarrollo de la tecnología de AD, ha estado vinculado a motivaciones emergentes, entre ellos la crisis energética de 1970 como una alternativa al petróleo, o impulsados por razones medioambientales y de sostenibilidad, que puramente energéticas. Un claro ejemplo de ello es Dinamarca, donde en 1985, comenzó un programa de demostración desarrollado conjuntamente por los Ministerios de Agricultura, Energía y Medio Ambiente, en un esfuerzo por demostrar el potencial de producción de energía eléctrica de las grandes plantas de digestión (Angelidaki y Ahring, 1997). De ahí que, Europa en 2013, cuenta con un total de 14563 plantas de biogás, con una capacidad total instalada de 7857 MW (megavatio), cuyo mayor representante es Alemania con 9035 plantas industriales de biogás (EBA, 2015).

1.1.2. Situación del biogás en Europa

En 2013, Europa alcanzó 13378,7 ktep (kilotonelada equivalente de petróleo) en producción primaria de energía procedente del biogás, superior a los 12137,1 ktep registrado en 2012. Entre los distintos miembros de la Unión Europea (UE) existen variaciones en la distribución de la procedencia del biogás y su disponibilidad. De ahí que, la producción primaria de energía de biogás procede un 69 % del conglomerado de plantas industriales denominado “biogás otros” (plantas agrícolas descentralizadas, plantas municipales de metanización de residuos sólidos y plantas centralizadas de codigestión), el

22 % de vertederos y el 9 % restante procede de plantas depuradoras de aguas residuales urbanas e industriales. Alemania, Reino Unido e Italia son los mayores productores de biogás. En la figura 1, se muestra la producción y el porcentaje de la procedencia del biogás (en escalas de verde) de los países integrantes de la UE (EurObserv'ER, 2014).

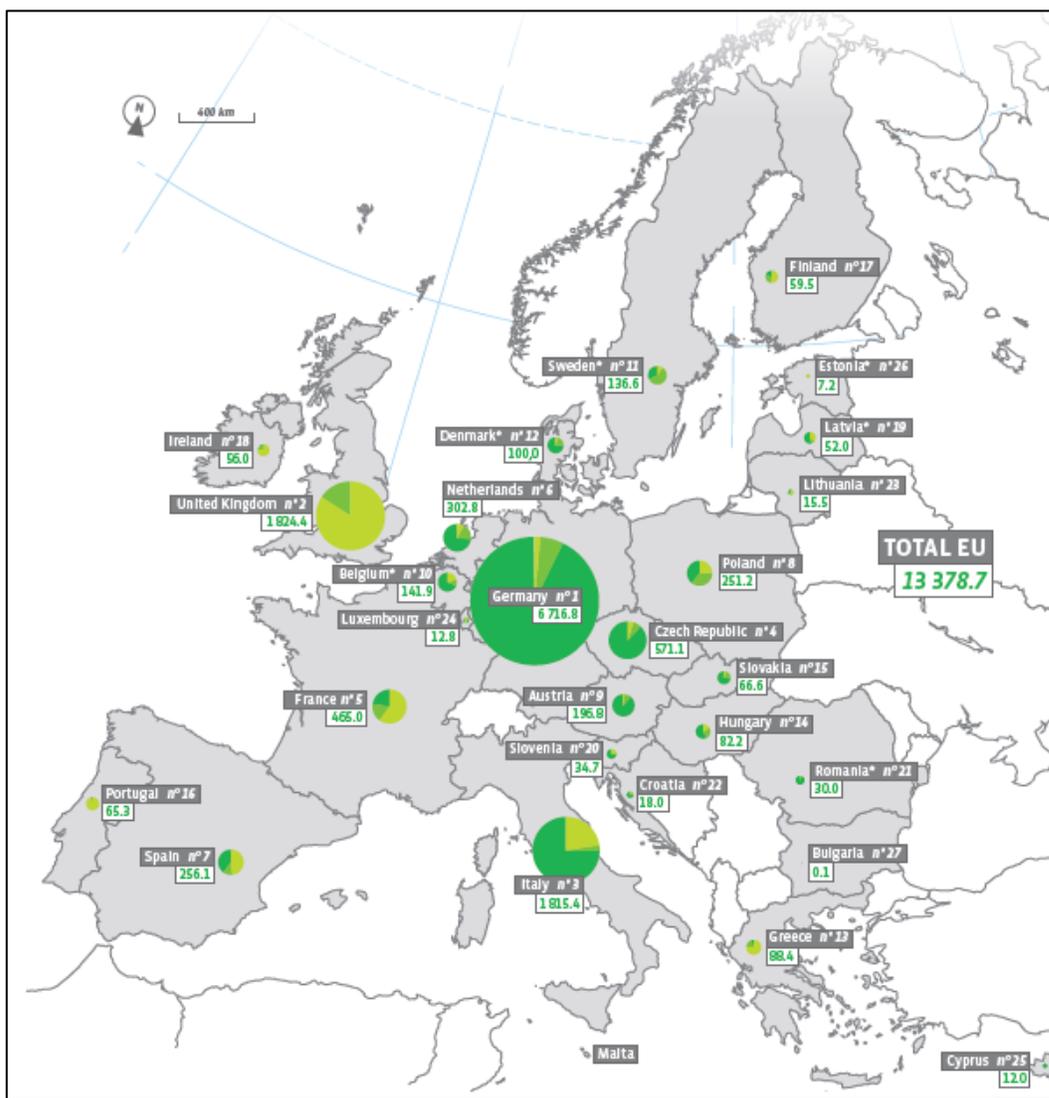


Figura 1. Producción primaria de biogás en la Unión Europea en 2012 y 2013* (ktep) Números en verde muestran la producción total de biogás en ktep.

- El gas de vertedero.
- Lodo de depuradora (aguas residuales urbanas y lodos de efluentes industriales)
- Biogás Otros (plantas agrícolas descentralizadas, plantas municipales de metanización de residuos sólidos y plantas centralizadas de codigestión)

* Las primeras estimaciones. Siempre que la información no estaba disponible, la distribución entre los diferentes tipos de biogás se estimó por EurObserv'ER para el año 2013 sobre la base de la ruptura observada en 2012. Fuente: EurObserv'ER 2014.

De aplicaciones energéticas, el biogás almacenado en gasómetros, es utilizado generalmente a través de motores de co-generación para la producción conjunta de energía eléctrica y térmica; además puede ser inyectado en la red de gas natural, como combustible para vehículos, o en pilas de combustible. Pero, dependiendo del uso final, los requerimientos en cuanto al refinado son mayores, debiendo ser depurado previamente para eliminar sulfuro de hidrógeno (H_2S), amoníaco (NH_3), agua y partículas sólidas (MARM, 2010).

1.2. El proceso de la digestión anaerobia

La AD es el proceso biológico por el cual se descompone la materia orgánica para dar lugar a un gas combustible (biogás), formado principalmente por CH_4 en un 55 - 70%, y dióxido de carbono (CO_2). Estos gases son productos de desecho por la respiración microbiana y la composición depende del residuo degradado y del propio proceso (Coombs, 1990; Flotats, 2010; Jørgensen, 2009).

En la AD de materia orgánica compleja intervienen diferentes poblaciones bacterianas de manera coordinada (figura 2), que establecen relaciones simbióticas entre ellas, realizando un proceso secuencial y/o simultáneo para la degradación de la materia orgánica. En esta degradación intervienen cuatro fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y la metanogénesis (Campos, 2001). La degradación anaerobia permite estabilizar la materia orgánica y de ese modo prevenir o retardar la liberación de productos químicos nocivos en el medio ambiente (Bouskova *et al.*, 2005).

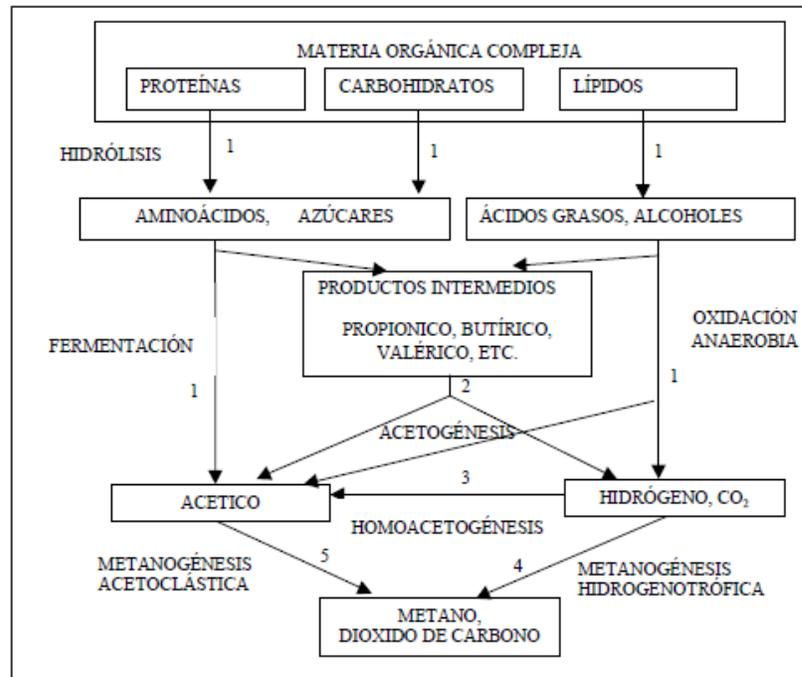


Figura 2. Esquema de las etapas de la digestión anaerobia. Los números indican la población bacteriana responsable del proceso: 1. Bacterias fermentativas hidrófilicas-acidogénicas; 2. Bacterias acetogénicas que producen hidrogeno; 3. Bacterias homoacetogénicos; 4. Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas; 5. Bacterias metanogénicas acetoclásticas. Fuente: Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991.

1.2.1. Fase de hidrólisis

La fase de hidrólisis es el primer paso previo fundamental en la degradación anaerobia de la materia orgánica. Desde la década de 1970, se ha investigado intensamente la hidrólisis de materia celulósica (Sun y Cheng, 2002), pretratamientos físicos en materia lignocelulósica (triturado, molienda o picado) debido a su abundancia y energía potencial (Chen *et al.*, 2008; Hendriks y Zeeman, 2009), aplicados comúnmente en digestores de granja, para reducir el tamaño de partícula y aumentar la superficie de contacto, por lo tanto, acelerando la hidrólisis (Deublein y Steinhauser, 2008; Sanders, 2001). Wen *et al.* (2004) investigaron la relación de la hidrólisis de la lignocelulosa presente en el estiércol, mediante la conversión de su componente lignocelulósico en azúcares fermentables.

Durante la hidrólisis, bacterias celulolíticas, bacterias hidrolíticas y bacterias acidógenas excretan exoenzimas en el ambiente líquido, para degradar sustancias de alto peso

molecular, es decir, polímeros de proteínas, carbohidratos y grasas, hasta compuestos de bajo peso molecular (monómeros), tales como aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y glicerol, que serán fácilmente transportadas a través de las membranas celulares bacterianas y ser sometidos a diversos procesos metabólicos intracelulares (Guyot, 1992; Sanders, 2001).

La hidrólisis, es una fase indispensable, dado que los microorganismos de las etapas posteriores sólo son capaces de actuar sobre la materia orgánica disuelta. Pero, la AD de residuos complejos (contenido lignocelulósico) tales como estiércol, residuos agrícolas, cultivos energéticos, etc., refractarios a la hidrólisis, es considerada la fase limitante del proceso, pudiendo suponer que la velocidad de producción de biogás es proporcional a la velocidad de solubilización de materia orgánica (Guyot, 1992; Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991). Según El-Mashad (2003), para diseñar correctamente digestores anaeróbicos, no sólo se necesita determinar el potencial bioquímico de metano (del inglés *Biochemical Methane Potential*, BMP) de residuos complejos, sino también, se necesita comprobar la velocidad de hidrólisis, para determinar la tasa de producción de biogás.

El estudio de la cinética puede proporcionar una medida cuantitativa de la hidrólisis de sustratos poliméricos de partículas biodegradables (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991; Sanders, 2001) simplificando esta fase compleja. Para Angelidaki y Sanders (2004), que la eficiencia de hidrólisis y la tasa de velocidad se evalúan principalmente en digestores anaerobios continuos y de lote, permiten llevar a cabo la hidrólisis y degradabilidad de los sustratos.

1.2.2. Fase acidogénica

Proceso equilibrado, generado por bacterias acidogénicas para la degradación intracelular de monómeros liberados en la hidrólisis, originando una gran variedad de productos de fermentación. Los productos finales son principalmente ácidos grasos volátiles (AGV) como el acetato, propionato, butirato, succinato; así como pequeñas cantidades de ácido láctico y etanol, CO₂ e hidrógeno (H₂) (Jørgensen *et al.*, 2003). El acetato y el hidrógeno producidos en las primeras etapas puede ser usado directamente por bacterias generadoras de CH₄, mientras que otras moléculas como ácidos grasos volátiles con una longitud de

cadena mayor a la del acetato deben pasar por un proceso de catabolización para ser transformados a compuestos que pueden ser usados por bacterias productoras de CH₄.

Las proporciones entre los productos de la fermentación varían en función del consumo de H₂ por parte de las bacterias que utilizan hidrógeno. Según Pavlostathis y Giraldo-Gómez (1991), cuando el H₂ es eliminado de forma eficiente las bacterias fermentativas no producen compuestos reducidos como el etanol, favoreciendo la producción de H₂ y la liberación de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP).

Los microorganismos predominantes que utilizan la fermentación incluyen miembros de los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Propionibacterium*. Las principales bacterias son del género *Clostridium*, que producen butírico o butanol, básicamente, convierten la glucosa y algunos aminoácidos en ácido butírico, acético, CO₂ y H₂. Las proporciones de los diversos productos se modifican por la duración y las condiciones de la fermentación, siendo el butírico y el acético los productos mayoritarios si el pH se mantiene alcalino (Guyot, 1992).

1.2.3. Fase acetogénica

Durante esta etapa actúan las bacterias acetogénicas productoras de hidrogeno, las cuales producen ácido acético, CO₂ y H₂ a partir de AGV (sobre todo los ácidos propiónico y butírico), aminoácidos y el etanol. Esta fase involucra a tres grupos de microorganismos:

1. *Bacterias homoacetogénicas*, representados principalmente por *Clostridium acetium*, *Acetobacterium woodii* estas bacterias son capaces de crecer heterotróficamente en presencia de azúcares o compuestos monocarbonados (como la mezcla H₂/CO₂), produciendo únicamente acetato, a partir de una mezcla de H₂-CO₂ y algunos de un amplio espectro de compuestos multi o monocarbonados. Cabe indicar que al contrario de las bacterias acetogénicas, estas bacterias, no producen hidrogeno como resultado de su metabolismo, sino que lo consumen como sustrato, lo que permite mantener bajas presiones parciales del H₂ y, por tanto, facilita la actividad de las bacterias acidogénicas y acetogénicas (Guyot, 1992).

2. *Bacterias acetogénicas*, representadas por *Syntrophobacter wolini* y

Syntrophomonas wolfei, actúan oxidando los productos de la fermentación en acetato, H₂ y CO₂. Estas bacterias son anaerobias estrictas y dependen para su crecimiento de la eliminación del H₂ presente en el medio (Guyot, 1992).

3. *Bacterias sulforeductoras*, entre sus exponentes se tiene al *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas*; estas bacterias son capaces de establecer una relación sintrófica (transferencia interespecífica de hidrógeno) con las bacterias metanógenas (hidrogenoflicas), para eliminar H₂, con un balance energético favorable (Cadi, 1994).

Hasta esta fase del proceso de la AD, la mayoría de las bacterias anaerobias han extraído todo el alimento de la biomasa y, como resultado de su metabolismo, han de eliminar sus propios productos de desecho de sus células. Estos productos, ácidos volátiles sencillos, son los que van a utilizar como sustrato las bacterias metanogénicas en la siguiente fase.

1.2.4. Fase metanogénica

Son los responsables de la formación de CH₄ y de la eliminación del medio de los productos de los grupos anteriores. La metanogénesis es llevada a cabo por un grupo particular de microorganismos productores de CH₄, representados por 83 especies (García *et al.*, 2000; Jørgensen *et al.*, 2003): las arqueobacterias, estas bacterias poseen varias coenzimas especiales, siendo la coenzima M, la que participa en el paso final de la formación de CH₄ (Ferry, 1992). Todas estas bacterias son anaerobias obligatorias y su tasa de crecimiento es menor que del resto de microorganismos implicados en la digestión. Las arqueobacterias metanógenas pueden utilizar sólo un número restringido de sustratos, principalmente acetato, H₂ y CO₂. Pueden clasificarse, según el sustrato que utilizan en dos grupos:

1. Bacterias metanógenas *hidrogenotróficas*, como *Methanobacterium*, *Ethanococcus* y *Methanobrevibacter*; que utilizan el H₂ y CO₂ permitiendo disminuir la presión parcial de H₂ (Ferry, 1992) y producen aproximadamente un 30% del CH₄, además de agua.
2. *Bacterias metanógenas acetoclásticas* (metilotrópicos), se encuentran reagrupadas

sólo en 9 especies y los géneros *Methanosaeta* (*Methanotrix*) y *Methanosarcina*, son los que se encuentran con mayor frecuencia en un digestor (Morgan *et al.*, 1991), siendo el principal exponente el *Methanosarcina barkeri*, que es capaz de crecer en diversos sustratos, entre los que están H₂ y CO₂, acetato, metanol, metilaminas. A partir del acetato, metanol y algunas aminas producen el 70 % del CH₄ restante y CO₂ (Jørgensen *et al.*, 2003).

La mayor parte de los microorganismos implicados en la digestión se desarrollan en una gama de pH que varía entre 6 y 8, con un óptimo para los productores de CH₄ entre 6,5 y 7,2 (Ahring *et al.*, 1995).

1.3. Parámetros ambientales y de control en digestores anaerobios

1.3.1. Temperatura

La temperatura es el factor de mayor importancia junto a la composición del sustrato, que podrían afectar el rendimiento y la estabilidad del proceso de AD (Labatut *et al.*, 2014). Existen tres rangos de temperaturas: psicrófilo: por debajo de 20 °C; mesófilo, de 30°- 40 °C; termófilo, de 45-60 °C, siendo más óptimos cercanos a los 37° y 55 °C (Van Lier *et al.*, 2001).

Para Moset *et al.* (2015) la AD termofílica muestra mayor degradación de la materia orgánica (especialmente fibra). Además de coincidir con Pavlostathis y Giraldo-Gómez (1991), y Veecken y Hamelers (1999) que el aumento en el rango de temperaturas, aumenta la hidrólisis, la velocidad de crecimiento de las bacterias y con esto la velocidad en la producción de biogás; pero también la sensibilidad a algunos inhibidores como el NH₃, por lo que requiere de mayor control (Flotats, 2010).

1.3.2. Velocidad de carga orgánica y tiempo de retención hidráulico

La velocidad de carga orgánica (VCO), es la relación de la cantidad de materia orgánica, introducida en el digestor por unidad de volumen del digestor y tiempo.

El tiempo de retención hidráulico (TRH), se define como el tiempo que el sustrato está sometido a la acción de las bacterias en el digestor. En sistemas discontinuos en digestores

de lote, el tiempo de retención coincide con el tiempo de permanencia del sustrato dentro del digestor. En digestores continuos de mezcla completa, es el cociente entre el volumen del digestor y el caudal de tratamiento (Flotats, 2010)

Los principales parámetros de diseño de un digestor son el TRH y el VCO, determinados por el tipo de sustrato que define el volumen del digestor, debido a que a mayor TRH aumenta la fracción de materia orgánica degradada; sin embargo, la producción volumétrica de CH₄ (producción por unidad de digestor) disminuye, una vez superado el óptimo, siendo necesario determinar para cada tipo de residuo y de digestor el tiempo de retención que optimiza el proceso.

1.3.3. pH y alcalinidad

El rango del pH es determinado por la aclimatación de la población bacteriana y puede conseguirse un proceso estable a valores mayores. Aunque se necesite un pH en torno a la neutralidad para que el proceso de desarrolle satisfactoriamente, el pH no debe bajar de 6,0 ni subir de 8,3 (Lay *et al.*, 1997).

1.3.4. Inhibidores

1.3.4.1. Nitrógeno amoniacal

La inhibición de la AD de residuos de alta carga orgánica depende de diferentes variables como residuos ganaderos (especie animal, sistema de alimentación, tipo de granja), del inóculo, sustrato y tiempo de retención hidráulica (Hansen *et al.*, 1998). En la AD termofílica de residuos ganaderos, el NH₃ es el principal modulador del sistema, cuya concentración varía en función directa a los niveles de pH y temperatura. El NH₃ afecta principalmente a bacterias metanogénica acetoclásticas, donde, al aumentar la concentración de NH₃ aumenta la concentración de acético (Angelidaki y Ahring, 1993; Hansen *et al.*, 1998), que a su vez puede inhibir la acetogénesis y la consiguiente acumulación de otros AGV, como propiónico, butírico y valérico (Fukuzaki *et al.*, 1990), lo que puede provocar un bajo pH en el sistema.

Para Sawayama *et al.* (2004), la producción de CH₄ decrece a concentraciones de NH₃ de 6,0 g/L en el seno del digestor, representando una mayor toxicidad para los metanógenos

frente al resto de poblaciones bacterianas. Según Hashimoto (1986), el umbral de toxicidad se sitúa en 2,5 g/L de NH_3 en poblaciones no adaptadas, tanto en mesofílico como termofílico, aunque al trabajar con digestores adaptados previamente la concentración inicial de inhibición fue de 4 g N-NH_4^+ /L en el rango termofílico.

1.3.4.2. Hidrógeno

Siendo el H_2 , un importante compuesto intermediario del proceso anaerobio, su acumulación puede provocar la inhibición de la acetogénesis, con la consiguiente acumulación de AGV con más de dos átomos de carbono (Fukuzaki *et al.*, 1990; Hill y Cobb, 1993). Las mayores concentraciones de H_2 dirigirán el flujo de electrones de la producción de CH_4 a la producción de butirato, propionato, lactato o el etanol (Schink, 1997).

1.3.4.3. Ácidos grasos volátiles

Los AGV juegan un papel muy importante en la monitorización y control de digestores anaerobios, mostrando una rápida respuesta a las variaciones en el sistema, en el caso de sobrecargas orgánicas o en la introducción de tóxicos (Ahring *et al.*, 1995).

En el digester, la acumulación de propiónico y acético, puede causar la inhibición de la acetogénesis (Fukuzaki *et al.*, 1990). Para Ahring *et al.* (1995), para afectar la producción de CH_4 se recitarían concentraciones de acético superiores a 4000 mg/L.

1.3.4.4. Sulfatos y sulfuros

La AD puede ser inhibida por concentraciones elevadas de sulfato, especialmente la fase metanogénica, en la que bacterias metanogénicas y sulfato reductoras compiten por los mismos sustratos útiles (acetato e H_2), mostrando las últimas, ventajas termodinámicas y cinéticas sobre las primeras (Hulshoff Pol *et al.*, 1998), cuyo resultado determinara la proporción de sulfhídrico y CH_4 en el biogás producido (Omil *et al.*, 1995).

El sulfuro puede producirse durante la degradación de la materia orgánica que contiene azufre (proteínas). Una concentración alta de sulfuro resulta tóxica para muchos grupos bacterianos; principalmente para bacterias metanogénicas no aclimatadas a sulfuros a partir

de una concentración de 50 mg/L. Se considera que la forma tóxica es la no ionizada (H_2S), ya que es la que puede atravesar la membrana celular, por lo que la inhibición se ve favorecida a una baja temperatura y pH (predomina la forma no ionizada y una mayor solubilidad en la fase líquida). Por lo que, a un alto pH la inhibición de las metanogénicas es mayor que las sulfato reductoras, mientras que a un bajo pH no hay diferencia entre ambos grupos (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

1.4. Técnica DNS

El DNS determina la cantidad de glucosa liberada de la actividad enzimática en el complejo celulolítico. Demuestra la presencia del grupo carbonilo libre ($C=O$) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa (Miller, 1959).

En este método el ácido 3,5- dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos. La reducción del ácido genera un color amarillo el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro en la zona de 540 - 600 nm, lo que implica la aplicación de la ley de Beer Lambert (Miller, 1959).

La lectura de la prueba de DNS es altamente influenciada por las mismas condiciones del ensayo, como la temperatura del agua de calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción, la proporción de glucosa, celobiosa, etc. presentes y el tiempo de preparación del reactivo, el cual con frecuencia es ignorado (Zhang *et al.*, 2006).

1.5. Potencial bioquímico de metano

Es un procedimiento desarrollado para determinar la producción de CH_4 de un sustrato orgánico dado durante su descomposición anaeróbica. El BMP ha demostrado ser un método relativamente simple y fiable para obtener la extensión y tasa de conversión de la materia orgánica a CH_4 (Chynoweth *et al.*, 1993). Pero el tiempo de duración del ensayo (90 días) representa una desventaja al no proporcionar resultados a corto plazo.

Consiste en un proceso de digestión en discontinuo, donde el digestor de lote se llenan una única vez con el inóculo y el sustrato orgánico en condiciones de operación definida, se produce el proceso de degradación hasta completar la biometanización y el gas desprendido se cuantifica mediante una medición específica hasta que la producción de gas está prácticamente cesada. Por tanto, la determinación del BMP permite determinar la producción máxima de metano (B_0), que es el BMP a tiempo infinito (Moller *et al.*, 2004; Raposo *et al.*, 2011). Este valor se calcula dividiendo la producción neta de CH_4 en condiciones estándar de presión y temperatura (273,15°K y 1 atm) mediante el peso de la muestra añadida SV (Raposo *et al.*, 2011).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue evaluar la hidrólisis y la biodegradabilidad de la celulosa y la paja de trigo con inóculos procedentes de la codigestión de purín de vacuno y pasto de prado pretratados. Para ello, se utilizaron cuatro inóculos procedentes de la codigestión de purín de vacuno y pasto de prado pretratados, de los cuales: *primero*, se midieron los productos intermedios de hidrólisis de la celulosa y la paja de trigo en el inóculo a través de la producción de azúcares reductores por la técnica DNS; y *segundo*, se estudió el efecto del inóculo sobre los parámetros de degradación anaerobia (biodegradabilidad) de la celulosa y la paja de trigo por el BMP. Ambos métodos (DNS y BMP) se relacionan para investigar si es posible utilizar la técnica DNS como un método rápido para evaluar el grado de hidrólisis de un inóculo y para obtener información sobre su potencial para degradar sustratos. Esta información contribuiría a optimizar el diseño y funcionamiento de un digester anaerobio con purín de vacuno.

En concreto, los objetivos fueron los siguientes:

1. Determinar la actividad enzimática en la celulosa y paja de trigo con distintos inóculos anaerobios a través de la técnica de DNS.
2. Evaluar la velocidad de hidrólisis de la producción de CH₄ de la celulosa y la paja de trigo con distintos inóculos a través de modelos cinéticos en el BMP.
3. Relacionar la técnica DNS y las cinéticas de degradación del BMP.

3. Materiales y Métodos

El estudio se realizó en la Planta de Biogás del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus, ubicada en el Centro de Investigación Foulum (Foulum, Dinamarca).

3.1. Inóculo

Se utilizaron inóculos diferenciados de la monodigestión del purín de vacuno y la codigestión del purín vacuno con pasto de pradera pretratados y ensilado. Los inóculos fueron utilizados para medir los productos intermedios de degradación a través de la producción de azúcares reductores del DNS y los parámetros de degradación anaerobia de la celulosa y paja por el BMP.

Para la obtención del inóculo, la codigestión se desarrolló en cuatro digestores de tanque agitado continuo (del inglés *Continuous Stirred-Tank Reactor*, CSTR) de 15 L de capacidad de trabajo (Digestor 1, Digestor 2, Digestor 3 y Digestor 4) (figura 3). Éstos fueron alimentados manualmente a diario con las cantidades necesarias para obtener un TRH de 25 días (0,6 L/día) a una temperatura de 50 °C (termófilo). Durante los primeros 10 días, los digestores se alimentaron sólo con purín vacuno. Después de este período, cada digestor se alimentó con una mezcla de purín de vacuno y pasto de pradera tratado durante 100 días (más de 3 veces el TRH). El pasto de pradera utilizado procedió de dos tratamientos mecánicos: excoriado y picado, además de uno sin tratar. Todo el pasto fue ensilado después de los tratamientos mecánicos. Los tratamientos en los cuatro digestores fueron los siguientes:

Digestor 1: 100% purín de vacuno (600 g/día)

Digestor 2: 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto excoriado (30 g/día)

Digestor 3: 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto picado (30 g/día)

Digestor 4: 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto sin tratar (30 g/día)



Figura 3. Funcionamiento de digestores anaerobios de tanque agitado continuo de donde se obtuvo el inóculo

Una vez culminada la AD con la estabilización de las bacterias metanogénicas, se recolectaron 4 L de digestato de cada digester. Los digestatos fueron degasificados en condiciones termófilas (50 °C) durante 15 días para minimizar la producción endógena del biogás. Después mediante un filtro de aluminio doméstico de 2 mm de diámetro, se obtuvo el inóculo (Møller *et al.*, 2004). De esta forma se obtuvieron cuatro inóculos, cada uno procedente de un digester; siendo: inóculo 1 (I1) procedente del Digester 1, inóculo 2 (I2) procedente del Digester 2, inóculo 3 (I3) procedente del Digester 3 e inóculo 4 (I4) procedente del Digester 4.

3.2. Sustratos: celulosa y paja de trigo

Se usaron dos sustratos comunes para cada inóculo: celulosa (papel de filtro de celulosa 41 WhatmanTM) y paja de trigo triturada. Este último, fue cosechado en la Isla de Selandia (la isla más grande de Dinamarca, donde reside su capital, Copenhague) en julio de 2013. La paja de trigo se trituró en finas partículas de 1 mm aproximadamente por la Empresa EUROmilling A/S (Tølløse, Dinamarca).

3.3. Caracterización fisicoquímica del inóculo y sustrato

3.3.1. Sólidos totales (ST) y Sólidos volátiles

La determinación del contenido de ST y SV se basa en las recomendaciones formuladas por la APHA (2005), utilizando aproximadamente 100 g de cada inóculo (I1, I2, I3 e I4) y 10 g de cada sustrato (celulosa y paja).

Se evaluó el contenido en ST, mediante el peso del residuo seco de la muestra tras secarse en la estufa (Lytzen LG-1620) a 105°C durante 24 horas, referido al peso de materia fresca inicial. Para el cálculo de se utiliza la siguiente expresión:

$$ST(\%) = \frac{\text{Peso } 105^{\circ}\text{C} - \text{Peso bandeja}}{\text{Peso muestra}} * 100$$

donde:

Peso_{105 °C}: peso de la muestra (g) luego de 24 horas en la estufa a 105 °C

Peso_{bandeja}: peso (g) de la bandeja vacía

Peso_{muestra}: peso de la muestra fresca (sin el peso de la bandeja) (g)

El contenido en SV se determinó por diferencia entre el residuo seco y las cenizas, sobre la misma muestra, mediante calcinación en un mufla (Carbolite® ELF Chamber Furnace ELF 11/6B) a 550°C durante 6 horas; siguiendo la siguiente expresión:

$$SV(\%) = \frac{\text{Peso } 105^{\circ}\text{C} - \text{Peso } 550^{\circ}\text{C}}{\text{Peso muestra}} * 100$$

donde:

Peso_{105 °C}: peso de la muestra (g) luego de 24 horas en la estufa a 105 °C

Peso_{550 °C}: peso del residuo calcinado (g) luego de 6 horas en la mufla a 550 °C

Peso_{muestra}: peso de la muestra fresca (sin el peso de la bandeja) (g)

$$\text{Cenizas}(\%) = \text{Sólidos totales}(\%) - \text{Sólidos volátiles}(\%)$$

3.3.2. Nitrógeno Amoniacal - Test de Amonio NH_4^+ (TAN)

El TAN se determinó usando el kit fotométrico (número de kit 1.00683.0001, kit Spectroquant® NOVA 60, Merk Millipore - Alemania). Se pesó 1 g de muestra fresca en un tubo de ensayo de 10 ml y se añadió 9 ml de agua desionizada (dilución 1/10), se mezcló durante 5 minutos. Después se colocaron 2 ml de la primera dilución en otro tubo de 10 ml con 8 ml de agua desionizada (dilución 1/50), se mezcló durante 5 minutos. Después se tomó 100 μl de la segunda dilución y se mezclaron con 5 ml de Reactivo 1 y se añadió una cuchara de Reactivo 2, después de 15 minutos, se mezcló y se midió en el espectrofotómetro, usando el kits del test de Amonio NH_4^+ , que presenta un rango de 5 a 150 mg de NH_3/L .

3.3.3. Ácidos grasos volátiles

La composición en AGV se realizó utilizando un cromatógrafo de gases equipado con una llama detector de ionización (Agilent Technologies 7693 Autosampler). Para ello, se colocaron $1,00 \pm 0,005$ g de muestra fresca en un tubo de ensayo de 10 ml y se añadió 4 ml mezcla de ácido oxálico (0,3 M), mezclándose durante 15 minutos en el mezclador de rotación. A continuación en una centrifuga (SIGMA® 4-16) a 4500 rpm durante 12 minutos, se obtuvo el sobrenadante en los tubos de ensayo; del cual se extrajo 1ml en una jeringa hipodérmica y tras filtrado con una membrana de acetato de celulosa a 0,45 μm en un vial de muestreo, se analizó en el cromatógrafo de gases.

3.3.4. pH

La determinación del pH se realizó directamente en cada muestra, a través de un medidor Portátil de pH/Redox para líquidos Portames® 911 pH (Knick, Alemania).

3.4. Protocolo de medición de la actividad enzimática de inóculos

3.4.1. Extracción de enzimas del inóculo

Se pesó 500 ml de los inóculos (I1, I2, I3 e I4) en botellas de vidrio de 1 L, en total 4 botellas, y se le añadió 4,1 g de tampón de Acetato de Sodio 1 M + 0,584 g de Cloruro de Sodio 0,02 M + 5 ml de Azida Sódica 0,02. A la mezcla se le midió el pH (comprendido

entre 5,5 - 6,0). Después se colocó en una incubadora a 50 °C con agitador (Innova[®]43) durante 2,30 horas. A continuación, se centrifugaron alícuotas en tubos de ensayo de 50 ml a 4500 rpm durante 30 min. Se recogió el sobrenadante en frascos de 250 ml para ser utilizado en el proceso de hidrólisis de sustratos (véase 3.4.2.2) (King *et al.*, 2008).

3.4.2. Hidrólisis

3.4.2.1. Preparación de Tampón (Citrato de Sodio 0,1 M)

Se realizaron dos soluciones:

- *Solución A*: 0,1 M Citrato Trisódico Dihidratado: Pesando 29,41 g de citrato trisódico dihidratado y pasándolo a un matraz de 1 L, y añadir agua desionizada hasta 1 L.
- *Solución B*: 0,1 M Ácido Cítrico Monohidratado: Pesando 21,01 g de ácido cítrico monohidratado y pasándolo a un matraz de 1 L, añadir agua desionizada hasta 1 L.

Finalmente para obtener la preparación de tampón de Citrato de Sodio 0,1 M se mezcló la solución A y B. Para ello, se transfirió aproximadamente 60 mL de la solución A y 40 ml de la solución B; siendo necesario ajustar el pH hasta 4,8 añadiendo pequeñas cantidades de A o B.

3.4.2.2. Hidrólisis de sustratos

Se pesaron 50 mg de celulosa (8 x 7 cm) y de paja triturada en botellas de 100 ml (en total 8 botellas), se añadió a cada botella 50 ml del sobrenadante con enzimas extraídas de los cuatro inóculos, además de 50 ml de 0,1 M Citrato de Sodio y 2 ml de Ázida Sódica. Posteriormente se incubó a 50 °C, en una incubadora con agitador (Innova[®]43) durante 40 horas, obteniendo alícuotas de 5 ml extraídas en diferentes momentos de la hidrólisis a 0, 16 y 40 horas (véase 3.4.3.2) (Parawira *et al.*, 2005).

3.4.3. Medición de azúcares reductores por la técnica de Miller

3.4.3.1. Preparación del reactivo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

Se disolvió en un vaso de precipitado 4,0 g de Hidróxido de Sodio en 50 ml de agua desionizada (colocado sobre un agitador de placa caliente con barras magnéticas de

agitación entre 50 – 100 °C). Se incorporó 2,3 g de Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (cubriendo el vaso de precipitado con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz que afecta la química del DNS y se cubrió el orificio del vaso de precipitado con parafilm para eliminar la evaporación potencial). En otro vaso de precipitado se disolvió 75 g de Potasio y Sodio Tartrato Tetrahidrato en 125 ml de agua desionizada. Posteriormente, una vez que las dos soluciones se hubieron disuelto, fueron mezcladas en un matraz aforado de 250 ml y se completó el volumen con agua desionizada (Ghose, 1987).

3.4.3.2. Preparación de muestras

Del proceso de hidrólisis de sustratos (véase 3.4.2.2) en tiempos distintos (0, 16 y 40 horas), se obtuvieron alícuotas de 5 ml y se centrifugaron a 4500 rpm durante 6 minutos. Posteriormente, se transfirió con una micropipeta 0,5 ml de cada muestra a nuevos tubos de ensayo, se añadió 0,5 ml de agua desionizada y 1 ml de reactivo DNS. Se colocó los tubos de ensayo en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos para iniciar la reacción de cambio de color y luego se transfirió al agua fría para detener la reacción. A continuación se añadió 5 ml de agua desionizada a cada tubo, se homogenizó y se transfirieron 200 µl de la mezcla a una microplaca de 96 pozos (tres repeticiones de cada muestra) y se midió su absorbancia en un Espectrofotómetro (Thermo Scientific MultiskanTM FC) a 519 nm de longitud de onda (figura 4).

3.4.4. Solución estándar de glucosa

Se disolvió en un vaso de precipitado 0,110 g de Glucosa Monohidrato en 50 ml de agua desionizada, fue transpuesto a un matraz aforado y se añadió agua desionizada hasta alcanzar un volumen de 100 ml.

3.4.4.1. Curva de calibración

Desarrollando una serie de diluciones con cantidades conocidas de glucosa. La gama incluyó: 0 (blanco); 0,25; 0,5; 0,75 y 1 ml, respectivamente. Se pipetearon las cantidades de la solución indicada en tubos de ensayo y se ajustó el volumen de cada uno de ellos a 1ml por adición de agua desionizada en el orden de 1; 0,75; 0,5; 0,25 y 0 ml respectivamente.

Luego se añadió 1 ml del reactivo DNS a cada tubo de ensayo, como se muestra a continuación:

Tubo 1: 1 ml agua desionizada + 1 ml reactivo DNS

Tubo 2: 0,25 ml solución de glucosa + 0,75 ml agua desionizada + 1 ml reactivo DNS

Tubo 3: 0,5 ml solución de glucosa + 0,5 ml agua desionizada + 1 ml reactivo DNS

Tubo 4: 0,75 ml solución de glucosa + 0,25 ml agua desionizada + 1 ml reactivo DNS

Tubo 5: 1 ml solución de glucosa + 1 ml reactivo DNS

A continuación se añadió 5 ml de agua desionizada a cada tubo, se homogenizó y se transfirieron 200 μ l de la mezcla a una microplaca de 96 pozos (tres repeticiones de cada muestra) y se midió su absorbancia a 519 nm de longitud de onda (figura 4).

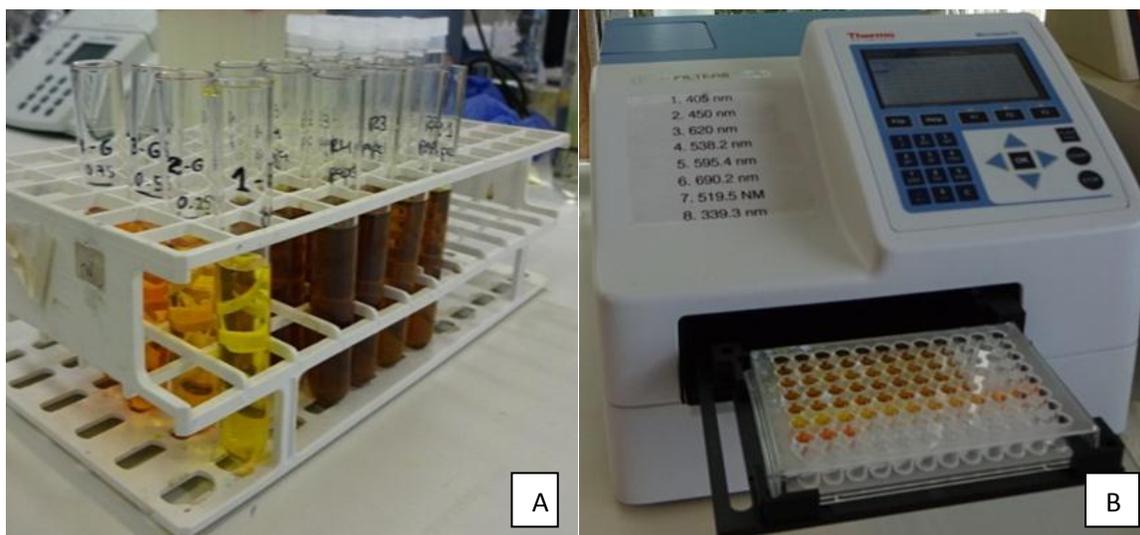


Figura 4. Muestras de estándar de glucosa e hidrólisis de sustratos tras la reacción del DNS (A). Medida de absorbancia de las muestras (B).

3.5. Ensayo de biodegradabilidad en digestores de lote

La finalidad de este ensayo es determinar la biodegradabilidad máxima de la materia orgánica biológica en condiciones anaerobias para diferentes inóculos. La metodología usada se basa en Angelidaki y Sanders (2004). Se utilizaron los inóculos (I1, I2, I3 e I4) obtenidos de cada digestor y como sustratos la celulosa y paja de trigo.

Se llenaron tres botellas por inóculo y sustrato (un total de 24 botellas), cada botella con 100 ml de inóculo y la cantidad de sustrato necesario para constituir una mezcla inóculo/sustrato en SV de 1:1, registrando la cantidad exacta de inóculo y sustrato de cada botella. Además, se llenaron tres botellas por inóculo (un total de 12 botellas), con 100 mL de inóculo que se utilizó como blanco, para determinar la producción endógena de biogás de cada inóculo (figura 5). La producción de biogás promedio acumulado de las botellas en blanco (producción de biogás endógena del inóculo) se resta de la producción de biogás de las botellas experimentales en cada tiempo de muestreo, para descartar la producción de biogás endógena del inóculo.

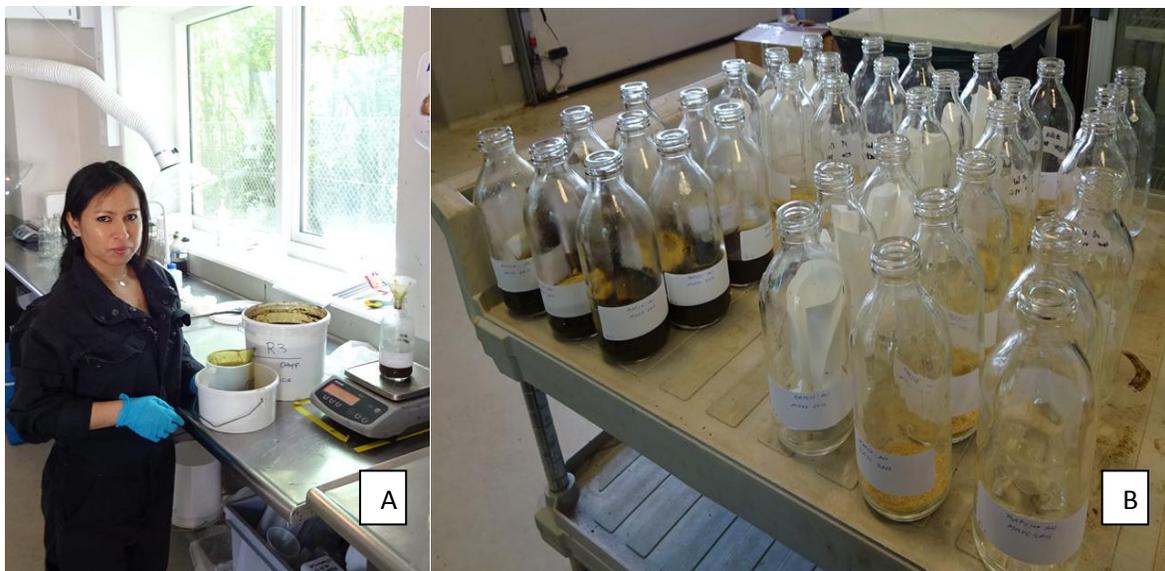


Figura 5. Pesado de inóculo (A). Botellas contenidos con celulosa, paja y blanco para sus respectivos inóculos (B).

Después del llenado, cada botella se selló con un tapón de goma de butilo y una cápsula de aluminio, y el espacio de cabeza se lavó con Nitrógeno puro (N_2) durante dos minutos. A continuación, las botellas se incubaron a temperatura termófila ($50\text{ }^\circ\text{C}$) durante al menos 90 días (figura 6). Periódicamente, se midió el volumen total de biogás producido por botella. Generalmente, los días obligatorios de medida son a los 30, 60 y 90 días; otros días de medición dependen de la presión acumulada en las botellas. En cada medida del volumen de biogás se tomaron muestras de biogás para su posterior análisis (Véase 3.5.1). La producción de CH_4 de este estudio fue expresada en condiciones estándar de temperatura y

presión (STP), es decir Temperatura=273,15 K°, presión=100 kPa. Al día 90, se determinó la BMP expresada en mlCH₄/gSV de sustrato introducido en las botellas, que se considera como el B₀ de cada sustrato digerido (celulosa y paja) obtenida con los diferentes inóculos.



Figura 6. Lavado de botellas con N₂ (A). Digestores en lote en incubación a 50 °C durante 90 días (B)

3.5.1. Caracterización del biogás

Se determinó a través de un cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica (Agilent Technologies 7890A GC System). Se obtuvieron muestras de biogás de los digestores en lote usados en el ensayo de biodegradabilidad, mediante el lavado de viales de 22 ml, respectivamente identificados, analizando el contenido de CH₄, CO₂ y concentración de H₂S principalmente, así como también se obtuvieron datos de N₂ y oxígeno (O₂). El biogás acumulado en los digestores de lote, se obtuvo una vez acumulada la presión en la tapa de goma de butilo, mediante la inserción de una aguja conectada a un tubo con una entrada a una columna rellena con agua acidificada (pH<2) a través de la goma de butilo. El biogás producido es calculado por el agua desplazada hasta que las dos presiones (espacio de cabeza de la columna y en botellas) sean iguales; las muestras se analizaron en el cromatógrafo de gases (figura 7).



Figura 7. Obtención de biogás acumulado en cada digester de lote (A). Determinación de los componentes del biogás a través del cromatógrafo de gases (B)

3.5.2. Parametrización de modelos cinéticos del BMP

Se puede calcular mediante la aplicación de un modelo cinético de primer orden. En este estudio, el BPM fue modelado en función al tiempo mediante el ajuste de los datos experimentales para dos modelos de regresión no lineales.

Modelo de Hashimoto

Se utiliza por lo general, para determinar el alcance y la velocidad de biodegradación (Hashimoto, 1986; Raposo *et al.*, 2011). Se muestra en la siguiente ecuación:

$$BMP_t = B_0 (1 - \exp^{-k \cdot t}) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde:

BMP: potencial bioquímico de metano (mlCH₄/gSV);

B₀: producción máxima de metano (mlCH₄/gSV);

k: constante de velocidad de BMP, expresada en [día⁻¹]

t: tiempo [días].

Modelo modificado de Gompertz

Establece que la producción de CH₄ es correspondiente al crecimiento de bacterias metanogénicas (Budiyo, 2010; Lo *et al.*, 2010). Se muestra en la siguiente ecuación:

$$BMP_t = B_0 \times \exp \left[-\exp \left[\frac{\mu_m \times e}{B_0} \times [\lambda - t] + 1 \right] \right] \quad (\text{Ec. 2})$$

donde:

BMP: potencial bioquímico de metano (mlCH₄/gSV);

B₀: producción máxima de metano (mlCH₄/gSV);

μ_m: tasa máxima de producción de metano expresado en [mlCH₄/gSV/día];

λ: duración de la fase de latencia [día];

t: tiempo [días];

e: constante de Euler (2.718).

Se utilizaron el Error de la raíz cuadrada de la media (RMSE) mediante la herramienta SOLVER de Microsoft Excel 2010 para calcular los valores de: k, μ_m y λ; y el Coeficiente de correlación al cuadrado (R²) para evaluar la precisión de ajuste del modelo.

4. Resultados y discusión

4.1. Actividad enzimática en la celulosa y paja de trigo

4.1.1. Composición de los inóculos y sustratos para el ensayo de biodegradabilidad

En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos en los parámetros de la caracterización fisicoquímica de inóculos (I1, I2, I3 e I4) y sustratos (celulosa y paja), previo a la extracción de enzimas e inicio del ensayo de biodegradabilidad.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los inóculos I1, I2, I3 e I4 y de los sustratos (celulosa y paja de trigo).

Parámetros	Sustrato		I1 ¹	I2 ²	I3 ³	I4 ⁴
	Celulosa	Paja				
Sólidos totales (%)	98,00	91,82	5,11	5,63	5,55	5,34
Sólidos volátiles (%)	98,86	83,50	3,46	4,02	3,88	3,77
Cenizas (%)	ND ⁵	ND	1,65	1,60	1,66	1,57
pH	ND	ND	8,20	8,24	8,14	8,19
Ácido acético (g/L)	ND	ND	0,21	0,98	0,39	0,43
Ácido propiónico (g/L)	ND	ND	0	0,57	0,08	0,04
Ácidos grasos volátiles totales (g/L)	ND	ND	0,21	1,55	0,47	0,47
Amoníaco total (g/L)	ND	ND	2,70	2,65	2,30	3,20

¹I1: Inóculo procedente del digestor 1, alimentado con purín de vacuno

²I2: Inóculo procedente del digestor 2, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto excoriado (30 g/día)

³I3: Inóculo procedente del digestor 3, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto picado (30 g/día)

⁴I4: Inóculo procedente del digestor 4, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto sin tratar (30 g/día)

⁵ND: No determinado

La tabla 1 muestra los valores finales después de una digestión en los CSTR de 100 días. Durante este periodo, todos los digestores mostraron parámetros de funcionamiento adecuados, con una producción de CH₄ de 352,84 LCH₄/kgSV en el digestor 1, 303,99 LCH₄/kgSV en el digestor 2, 304,29 LCH₄/kgSV en el digestor 3, y 292,19 LCH₄/kgSV en el digestor 4.

La tabla 1 refleja que tras 100 días de AD termofílica en los CSTR, hubo un agotamiento del material orgánico biodegradable residual en todos los inóculos como se observa en unos valores bajos de SV y ST. De esta forma, se obtuvo un inóculo diferenciado de cada digestor, para la degradación rápida y eficiente de la materia orgánica del sustrato.

Para Zheng *et al.* (2013) es necesario distinguir las características bioquímicas de los compuestos orgánicos previos a la AD. Nielsen y Angelidaki (2008), indican que la AD del estiércol animal es óptima, por el contenido de lignocelulosa y que los obstáculos físicos causados por la acumulación de materia inorgánica son determinados por los SV/ST de la ración, siendo éstos un excelente indicador de la acumulación de material no deseado y la adecuada mezcla en el sistema (Chae *et al.*, 2008).

Respecto a la concentración de AGV de los inóculos, tanto los AGV como el ácido acético y ácido propiónico fueron menores en I1 (monodigestión de purín de vacuno) en comparación con los inóculos de codigestión de purín de vacuno con pasto (I2 a I4). Resulta difícil comparar los AGV con la bibliografía, porque como sugirieron Angelidaki *et al.* (1993), la composición del material utilizado en el digestor, determina el nivel “normal” de AGV. Sin embargo, existe un consenso general en cuanto a que concentraciones de acetato y propionato de hasta 6 y 3 g/L, respectivamente, han demostrado no inhibir la AD del estiércol (Ahring, 1995). Los valores de I1 a I4 se encuentran todos por debajo de este rango. Un nivel bajo de AGV indica que la hidrólisis es un paso limitante de la velocidad de producción de CH₄ (Angelidaki y Sanders, 2004) y que la biomasa metanogénica está adaptada a la concentración de NH₃ para degradar el sustrato y formar de CH₄ (Sanders, 2001).

El rango del pH entre los cuatro inóculos (I1, I2, I3 e I4) es próximo entre ellos, encontrándose dentro del rango óptimo de 6,0 a 8,3 propuesto en la AD de purín de vacuno (Lay *et al.*, 1997; Raposo *et al.*, 2011). De acuerdo con Angelidaki y Ellegaard (2003) la alta capacidad de amortiguación de estiércol es muy útil para evitar cambios repentinos en el valor del pH. Asimismo, Oechsner *et al.* (2011), observaron que los elementos traza y nutrientes esenciales del estiércol, estabilizaron y optimizaron la digestión, además de

permitir el equilibrio del pH, evitando la acidificación, al ser alimentado con una alta tasa de carga orgánica.

4.1.2. Obtención de azúcares reductores con el DNS

En la figura 8, se muestra la curva patrón del estándar de glucosa (media de tres repeticiones de cada concentración de glucosa) que fueron evaluadas a tiempo (t) 0, 1 y 2 correspondiente al momento de incubación a 0, 16 y 40 horas (h), leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 519 nm, utilizado para la determinación de azúcares reductores del DNS, expresado en glucosa g/L, obteniéndose un recta en cada tiempo, mostrando en la tabla 2, la linealidad de la ecuación con el coeficiente de determinación ($R^2=0.99$).

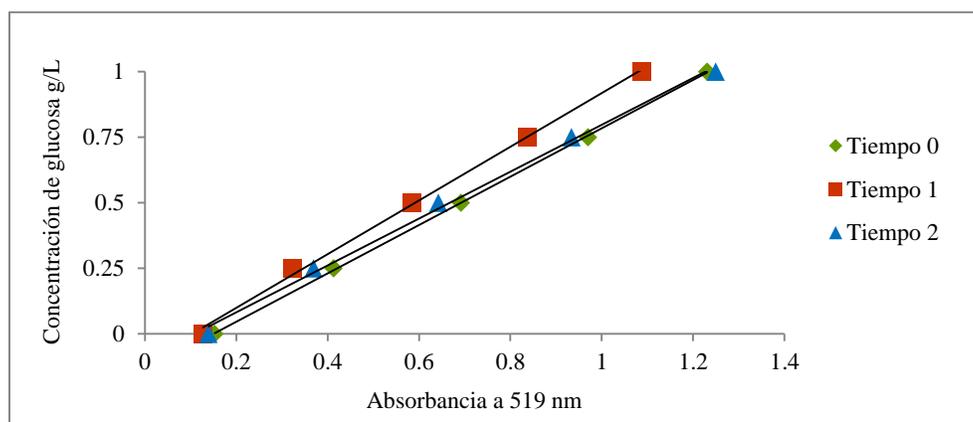


Figura 8. Curva patrón del estándar de glucosa (media de 3 repeticiones de cada concentración de glucosa) a $t_0=0$ horas, $t_1=16$ horas y $t_2=40$ horas

Tabla 2. Ecuación lineal de la calibración del estándar de glucosa

Tiempo (h)	Y	Coficiente R^2
$t_0 = 0$ h	$0,9275x - 0,1388$	0,999
$t_1 = 16$ h	$1,0415x - 0,1121$	0,996
$t_2 = 40$ h	$0,8946x - 0,0967$	0,996

Posteriormente, el valor numérico obtenido de la absorbancia fue reemplazada en la ecuación de la línea recta determinada por la curva patrón, obteniéndose la concentración

de glucosa en g/L (media de 3 repeticiones) para cada muestra en diferentes tiempos de incubación, como se muestra en la tabla 3, donde una mayor producción de glucosa a t_0 indica probablemente que el inóculo ha hidrolizado más durante la fase de desgasificación, pero seguramente porque tenía más materia orgánica, como es el caso.

Tabla 3. Concentración de glucosa (g/L) de la celulosa y paja en cada inóculo e incremento en la concentración de glucosa (%) de t_0 al valor máximo

Parámetros	I1 ¹		I2 ²		I3 ³		I4 ⁴	
	Celulosa	Paja	Celulosa	Paja	Celulosa	Paja	Celulosa	Paja
$t_0 = 0$ h	0,41	0,42	0,56	0,59	0,60	0,61	0,60	0,59
$t_1 = 16$ h	0,47	0,48	0,67	0,61	0,64	0,69	0,66	0,65
$t_2 = 40$ h	0,48	0,46	0,61	0,64	0,68	0,71	0,68	0,75
Incremento máximo (%)	17,1	14,3	19,6	8,5	13,3	16,4	13,3	28,5

¹I1: Inóculo procedente del digestor 1, alimentado con purín de vacuno

²I2: Inóculo procedente del digestor 2, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto excoriado (30 g/día)

³I3: Inóculo procedente del digestor 3, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto picado (30 g/día)

⁴I4: Inóculo procedente del digestor 4, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto sin tratar (30 g/día)

En la tabla 3 se observa como entre inóculos, el I1 (monodigestión de purín de vacuno), presentó los niveles más bajos en la concentración de azúcares reductores respecto a los inóculos de codigestión de purín de vacuno con pasto (I2 a I4). En I1, entre los sustratos, a pesar de que la celulosa es más fácil biodegradable, no se observaron diferencias claras entre la paja y la celulosa, siendo en incremento de la concentración de azúcares similar entre sustratos.

En cambio los inóculos I2, I3, I4 provenientes de la codigestión con pastos, presentaron niveles superiores de concentración de azúcares reductores de t_0 a t_2 para ambos sustratos respecto a I1, siendo los incrementos mayores que en I1 para I2 con celulosa y para el I4 con paja.

Entre sustratos, a t_2 la concentración de azúcares reductores de la celulosa fue menor a la paja en I2, I3 e I4; posiblemente porque las enzimas provenían de una población bacteriana específica para hidrolizar sustratos de naturaleza lignocelulósica, alta en contenido de

materia orgánica en SV e influido por el pretratamiento del pasto; por lo cual, la afinidad de la paja al estiércol, primó sobre la biodegradabilidad del sustrato.

Se observó actividad enzimática probablemente porque las bacterias anaerobias contenidas en el inóculo, contienen un sistema de celulasas que forma un complejo extracelular multienzimáticos (celulosoma) de alta especificidad (endo-1,4-β-glucanasa, exo-1,4-β-glucanasa, celobiosilhidrolasas y celobiosas), que actúan sinérgicamente y solubilizan la celulosa cristalina a glucosa (Malherbe y Cloete, 2002). Sin embargo, las diferentes concentraciones pudieron estar influenciadas por las características fisicoquímicas de los sustratos, en cuanto a tamaño y superficie expuesta, el grado de cristalinidad y polimerización de la celulosa, etc. (Zhang *et al.*, 2006).

De acuerdo con Sene *et al.* (1994) y Soto *et al.* (1994), el triturado de la paja, “molienda”, reduce el tamaño de los materiales y grado de cristalinidad de lignocelulosas, mejorando la susceptibilidad del sustrato a la hidrólisis enzimática y mejora la eficiencia de la degradación.

De acuerdo con Zheng *et al.* (2007) la hidrólisis enzimática de la celulosa está ampliamente presente en los organismos. Sin embargo, la celulosa producida por los diferentes organismos es diferente en sus componentes y la capacidad de degradar la celulosa, ello puede explicar los resultados obtenidos en este estudio, además de la influencia de las características propias del sustrato y del inóculo.

4.2. Cinética de la hidrólisis de la celulosa y paja

4.2.1. Determinación del potencial bioquímico de metano de los sustratos

Se presenta el desarrollo acumulado del BPM a partir de la celulosa y la paja en un periodo de 90 días. En la figura 9, se muestra la producción neta de CH₄ en condiciones estándar (Temperatura=273,15 K°, presión=1 atm).

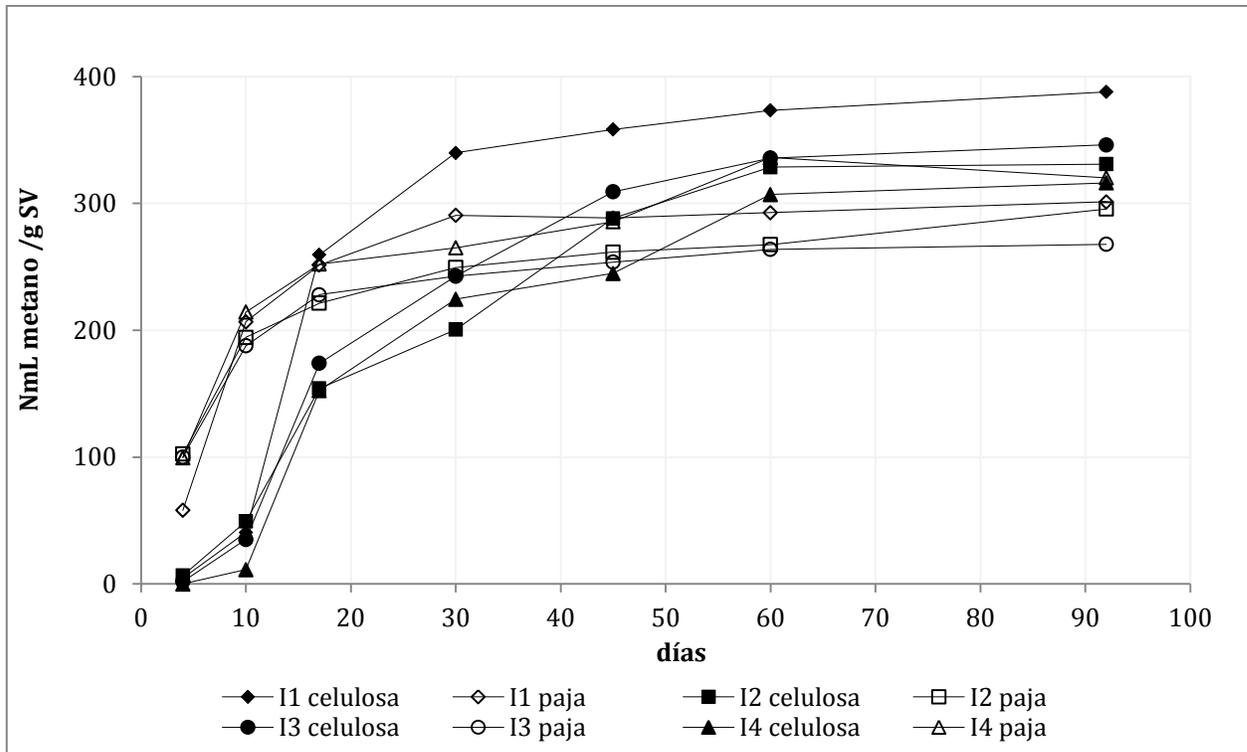


Figura 9. Producción neta de metano en condiciones estándar (Temperatura=273,15 K°, presión=1 atm) por g de sólidos volátiles (SV).

I1: Inóculo procedente del digestor 1, alimentado con purín de vacuno

I2: Inóculo procedente del digestor 2, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto excochado (30 g/día)

I3: Inóculo procedente del digestor 3, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto picado (30 g/día)

I4: Inóculo procedente del digestor 4, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto sin tratar (30 g/día)

En la figura 9, se observa que la tendencia de la producción de CH_4 durante los primeros 10 días, los inóculos con celulosa presentan un crecimiento gradual lento, a diferencia de los inóculos con paja que mostraron una velocidad de crecimiento exponencial en la producción de CH_4 , desde el primer momento. Esta tendencia siguió hasta el día 17 aproximadamente; donde comienza a percibirse un cambio en la producción. A partir de este momento, los inóculos con celulosa sobrepasan a los inóculos con paja respecto a la producción de CH_4 en el día 17 para el I1, seguida de I3 al día 45, y I2 al día 50 y I4 al día 60. Cabe indicar que el inóculo I1 paja, inició con una producción de CH_4 intermedia, su velocidad de crecimiento fue exponencial hasta el día 30, que aparentemente logra

estabilizarse. Sin embargo, la estabilización de la producción de CH₄ para el resto de inóculos con sus respectivos sustratos fue próxima al día 60.

La tendencia en la evolución de la producción máxima de CH₄, mostrado en la figura 9, de los inóculos (I1 al I4) con celulosa se asemeja a lo señalado por Budiyo (2010) y Abudakar e Ismail (2012), en digestores de lote, considerando un rango de 4 a 12 días; para el inicio de la producción de biogás, debido al crecimiento exponencial de las bacterias metanógenas; y que posterior al día 60, la producción de biogás tiende para disminuir al alcanzar la fase estacionaria del crecimiento microbiano.

De acuerdo con Nopharatana *et al.* (2007), la tasa de producción de biogás en condiciones de proceso de lote es directamente igual al crecimiento específico de las bacterias metanogénicas. Por ello, en este estudio, es posible que los inóculos que contenían celulosa requirieran de un periodo de tiempo para el reconocimiento, adaptación y crecimiento de las bacterias metanogénicas. En cambio, es posible que los inóculos con paja provenientes de la codigestión, conservaran activas su población bacteriana metanogénica

Lo dicho se refleja en los valores obtenidos en I1 (especialmente con celulosa) que mostró los valores más elevados en CH₄, respecto al resto de inóculos (I2 a I4). Por consiguiente, muestra en el sustrato celulosa, los mayores valores son para el inóculo I1 de B₀=388 mlCH₄/gSV y el menor en I4 de B₀=316 ml CH₄/gSV a los 90 días. El valor obtenido en I1, es próximo al indicado por Buswell y Mueller (1952) en el estudio de la producción máxima de CH₄ de la celulosa pura con 415 ml CH₄/gSV. Pero superior al registrado por Cho *et al.* (1995), con 0,356 m³ CH₄/gSV. Por tanto, La celulosa resultó más biodegradable que la paja en todos los inóculos testados salvo en el I4, donde la paja de trigo resultó más biodegradable que la celulosa

Respecto al sustrato paja, los mayores valores son para el inóculo I4 de B₀=320 ml CH₄/gSV y el menor en I3 de B₀=268 ml CH₄/gSV a los 90 días. Estos rendimientos obtenidos son próximos al reportado por Hashimoto (1986) al evaluar paja de trigo no tratada y tratada con hidróxido de sodio de 0,304 y 0,367 a 0,383 m³/kgSV, respectivamente. Pero Moller *et al.* (2004) reportaron una producción potencial de CH₄ en paja de trigo de 0,145 a 0,161 m³/kgSV.

4.2.2. Parametrización de modelos

La parametrización de los modelos de Hashimoto y Gompertz, permitieron evaluar los valores medidos en el ensayo, sobre el efecto de los diferentes inóculos con respecto a la celulosa y la paja, a través del BMP, como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4. Parametrización de los modelos

Modelos		I1 ¹		I2 ²		I3 ³		I4 ⁴	
		Celulosa	Paja	Celulosa	Paja	Celulosa	Paja	Celulosa	Paja
Hashimoto	k^5 (días ⁻¹)	0,05	0,10	0,04	0,09	0,04	0,11	0,03	0,09
Gompertz	μ_m^6 (mlCH ₄ /gSV/día)	31,8	22,6	8,9	18,1	11,6	20,1	9,8	20,3
	λ (días) ⁷	8,8	1,2	3,6	0	5,3	0	5,7	0
B ₀ ⁸ este estudio	mlCH ₄ /gSV	388	301	331	296	346	268	316	320

¹I1: Inóculo procedente del digestor 1, alimentado con purín de vacuno

²I2: Inóculo procedente del digestor 2, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto excoriado (30 g/día)

³I3: Inóculo procedente del digestor 3, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto picado (30 g/día)

⁴I4: Inóculo procedente del digestor 4, alimentado de 95% purín de vacuno (570 g/día) + 5% pasto sin tratar (30 g/día)

⁵k: constante de velocidad del BMP expresada en (día⁻¹)

⁶ μ_m : tasa máxima de producción de metano expresado en mlCH₄/gSV/día

⁷ λ : duración de la fase de latencia

⁸B₀: producción máxima de metano (mlCH₄/gSV)

Modelo de Hashimoto

La determinación de k al brindar información sobre el tiempo requerido para alcanzar cierta fracción de B₀, favorece a conocer el mecanismo de biodegradación anaerobia, e incluso la inhibición del proceso (Raposo *et al.*, 2011).

Como se observa en la tabla 4, en inóculo I1-celulosa presenta la menor constante $k=0,05$ día⁻¹ relacionado directamente con la mayor B₀=388 mlCH₄/gSV, respecto I4-paja de mayor constante $k=0,09$ día⁻¹ con el menor B₀=320 mlCH₄/gSV. Demostrando que a menor k es mayor la velocidad de hidrólisis, y está relacionada directamente con la B₀. Resultados similares en cuanto a la biodegradabilidad de la celulosa fueron mostrados por Raposo *et al.*, 2011 con una $k=0,23 \pm 0,15$ para una B₀= 350 ± 29 mlCH₄/gSV.

Modelo modificado de Gompertz

Establece que la producción de CH₄ es correspondiente al crecimiento de bacterias metanogénicas. Permite evaluar: la duración de la fase de latencia (λ) en días, midiendo el tiempo mínimo (días) para producir CH₄ y la tasa máxima de producción de CH₄ (μ_m) al día (Budiyono, 2010; Lo *et al.*, 2010).

Al evaluar entre inóculos, el parámetro μ_m , el inóculo I1(monodigestión) presenta valores máximos en ambos sustratos: *celulosa*, de: $\mu_m=31,8$ mlCH₄/gSV/día y *paja*, de $\mu_m=22,6$ mlCH₄/gSV/día; mientras que en la codigestión el inóculo I4 presenta para la celulosa la menor $\mu_m=9,8$ mlCH₄/gSV/día , excepto en la paja de $\mu_m=20,3$ mlCH₄/gSV/día.

En la evaluación entre inóculos, el parámetro λ , en el inóculo I1, la celulosa necesita de una mayor $\lambda=8,8$ días y para la paja $\lambda=1,2$ días; mientras que I4 para la celulosa necesita de una mayor $\lambda=5,7$ días y para la paja $\lambda=0$ días; reflejando que el tiempo de latencia es mayor en la celulosa a diferencia de la paja, a pesar de ser más biodegradable confirmó que este inóculo requiere de un tiempo de adaptación y crecimiento de bacterias metanogénicas (Budiyono, 2010); también, posiblemente porque los inóculos no están adaptados a la celulosa y la codigestión con pastos de pradera favoreció a que los inóculos degradaran mejor la paja.

De acuerdo de Budiyono (2010), donde se afirma que los carbonos contenidos por todas las componentes de los desechos no son igualmente degradados o convertidos en biogás mediante digestión anaerobia, tal como se observa en la duración de la fase de latencia de la celulosa y paja, expuesto a diferentes inóculos.

4.3. Relación del DNS y las cinéticas de degradación

Cabe mencionar que para esta evaluación, la técnica DNS y el BMP se iniciaron el mismo día, utilizando los mismos inóculos diferenciados de cada digester. Con el objetivo de relacionar la técnica DNS con la cinética de degradación de sustratos en digestión anaerobia, es importante informar que la DNS y el B_0 , no se pueden relacionar porque la DNS brinda información de la actividad enzimática bacteriana de la hidrólisis en el momento de la toma de muestra. Al utilizar “solo enzimas”; no puede dar información de la

posible evolución de la población bacteriana; mientras que B_0 , informa de la eficiencia de la población bacteria para producir CH_4 a través del tiempo.

En este sentido, los resultados de la técnica DNS son útiles para determinar en un momento puntual, las enzimas potenciales que posee un inóculo y su capacidad para degradar un determinado sustrato. De hecho, en este estudio, la técnica DNS permitió diferenciar la actividad enzimática entre inóculos y sustratos. Sin embargo, no nos da información sobre cómo va a evolucionar un sustrato ni nos da información sobre su biodegradabilidad. Para ello, sería necesario estudiar otros métodos para extraer enzimas a diferentes tiempos.

Sin embargo, la actividad enzimática medida mediante la DNS se podría relacionar con el tiempo de latencia obtenido mediante la parametrización del modelo de Gompertz. De hecho, la paja de trigo que mostró una mayor producción de azúcares, es el sustrato que menor tiempo de latencia mostró en todos los inóculos. Por lo que la técnica de DNS podría servir para evaluar qué inóculos están más adaptados a degradar determinados sustratos. Esta información es sin embargo más difícil de obtener por medio de un ensayo de biodegradabilidad por el mayor tiempo requerido (90 días frente a 40 horas).

5. Conclusiones

- La DNS, permitió diferenciar la actividad enzimática de la celulosa y la paja de trigo debido a la influencia de los inóculos I1 (control-monodigestión de purín de vacuno) e I2, I3, I4 (codigestión de purín de vacuno con pasto).
- Los resultados de la DNS reflejaron que la tasa de unión microbiana al sustrato depende del tipo de bacterias que contiene el inóculo. Entre sustratos, la concentración de azúcares reductores de la celulosa fue menor a la paja en I2, I3 e I4.
- En cuanto al ensayo de biodegradabilidad, el inóculo tiene una gran influencia en la determinación de potencial de metano a 90 días (B_0). La celulosa produjo un mayor B_0 en el inóculo procedente del I1, mientras que la paja de trigo produjo más B_0 en el inóculo I4. La celulosa resultó más biodegradable que la paja en todos los inóculos testados salvo en el I4, donde la paja de trigo resultó más biodegradable que la celulosa.
- En cuanto a los modelos cinéticos la tasas máxima de producción de CH_4 (μ_m) del modelo de Gompertz está directamente relacionada con la constante de velocidad del BMP (k) del modelo de Hashimoto y con la hidrólisis. La μ_m fue mayor en la celulosa que en la paja (excepto en I4). Sin embargo, la duración del tiempo de latencia (λ) fue mayor en la celulosa que en la paja posiblemente
- Se puede relacionar la información de la técnica de DNS y la λ del modelo de Gompertz para predecir qué inóculo está más adaptado a un determinado sustrato. Sin embargo, no brinda información de la adaptación y/o evolución bacteriana del sustrato en el futuro.
- Para poder relacionar más estrechamente la DNS con la BMP sería necesario realizar el análisis de DNS en diferentes momentos de la BMP.

6. Referencias bibliográficas

Abudakar, B.S.U., Ismail, N. (2012). Anaerobic digestion of cow dung for biogas production. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences* 7 (2), 169-172.

Ahring, B.K. (1995). Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal Of General And Molecular Microbiology* 67 (1), 91-102.

Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiological Biotechnology* 43 (3), 559- 565.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1997). Anaerobic digestion in Denmark. Past, present and future. *III Curso de Ingenieria Ambiental. Lleida.* 336-342.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. (2000). Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science and Technology* 41 (3), 189-194.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1993). Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (4), 560-564.

Angelidaki, I., Alves, M., Borzacconi, L., Campos J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Janicek, P., Van Lier, JB. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology* 59 (5), 927-934.

Angelidaki, I., Ellegaard, L. (2003). Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants – status and future trends. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 109, 95-105.

Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 159-166.

Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K.. (2003). Applications of the Anaerobic Digestion Process. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 82, 1-33

Angelidaki, I., Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3 (2), 117-129.

APHA (American Public Health Association) (2005). Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E (eds). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21th ed. American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Washintong, D.C. 1368 pp.

Bouskova, A., Dohanyos, M., Schmidt, J.E., Angelidaki, I. (2005). Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge. *Water Research* 39, 1481-1488.

Braun, R., Huber, P., Meyrath, J., 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion, *Biotechnology Letters* 3 (4), 159-164.

Budiyono, Widiassa, I.N., Johari, S., Sunarso. (2010). The kinetic of biogas production rate from cattle manure in batch mode. *International Journal of Chemical and Biological Engineering* 3 (1), 39-44.

Buswell, A.M., Mueller, H.F. (1952). Mechanism of fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 44, 2441-2460.

Campos, A.E. (2001). Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. PhD tesis. Universitat de Lleida, 371 pp.

Cadi, Z. (1994). Méthanisation en bioréacteur à membrané: application a un effluent de papeterie. PhD Thesis. Universite Calude Bernard, 155 pp.

Chae, K.J., Jang, A., Yim S.K., Kim, IS. (2008). The effect of digestion temperature and temperature shock on the biogas yield from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology* 99, 1-6.

- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource. Technology* 99, 4044–4064.
- Cho, J.K., Park, S.C., Chang, H.N. (1995). Biochemical methane potential and solid state anaerobic-digestion of Korean food wastes. *Bioresource Technology* 52 (3), 245-253.
- Chynoweth D.P., Turick C.E., Owens J.M., Jerger D.E., Peck M.W. (1993). Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 5, 95–111.
- Coombs, J. (1990). The present and future of anaerobic digestion, in anaerobic digestion: a waste treatment technology. Ed. Wheatley A. *Critical Reports on Applied Chemistry*. Elsevier applied science LTD 31, 93 - 138.
- Cuetos, M. J., Gómez, X., Otero, M., Morán, A. (2008). Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (Shw) At Laboratory Scale: Influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (Ofmsw). *Biochemical Engineering Journal* 40, 99-106.
- Deublein, D., Steinhauser, A. (2008). *Biogas from waste and renewable resources: An introduction*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim 443 pp.
- El-Mashad, M.H., 2003. *Solar Thermophilic Anaerobic Reactor (STAR) for Renewable Energy Production*. PhD thesis. Wageningen University, 238 pp.
- EBA (European Biogas Association) (2014). Graph: biogas plants per country and total installed capacity in Europe, in: <http://european-biogas.eu/wp-content/uploads/2015/02/Biogas-graph-20131.png>. Accedido el 10 de agosto de 2014
- EurObserv'ER (2014). *Biogas Barometer*. Edición Noviembre 2014.
- Fernández, B., Porrier, P., Chamy, R. (2001). Effect of inoculum-substrate ratio on the start-up of solid waste anaerobic digesters. *Water Science and Technology* 44 (4), 103-108.
- Ferry, J.G. 1992. Biochemistry of methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27 (6), 473-503.
- Flotats, X. (2010). Biogás y gestión de deyecciones ganaderas. *IVIS. SUIIS* 72, 22-28.

Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., Nagai, S. (1990). Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (3), 719-723

García, J.L., Patel, B.K.C., Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6 (4), 205-226.

Ghose, T. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59 (2), 257-268.

Guyot, J.P. (1992). Introducción a la microbiología de la digestión anaerobia, en bioprocesos anaerobios para el tratamiento de efluentes industriales. UAM-I, Mexico, pp. 1-17.

Hansen, K., Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* 32 (1), 5-12.

Hashimoto, A.G. (1986). Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes* 17, 241-261.

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100 (1), 10-18.

Hill, D.T., Cobb, S.A. (1993). Modelling predictive indicators in animal waste methanogenesis. *Transactions of the ASAE* 36 (3), 879-885.

Hulshoff Pol, L., Lens, P., Stams, A., Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* 9 (3), 213-224.

Jørgensen, U., Mortensen, J., Kjeldsen J.B., Schwarz K.U. (2003). Establishment, development and yield quality of fifteen *Miscanthus* genotypes over three years in Denmark. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Plant Soil Science* 53, 190-199.

Jørgensen, P. J. 2009. Biogas green energy: process-design-energy supply-environment. Faculty of Agricultural Sciences, Aarhus University, 2nd edition. Denmark, pp. 4-14.

- Karagiannidis, A., Perkoulidis, G. (2009). A multi-criteria ranking of different technologies for the anaerobic digestion for energy recovery of the organic fraction of municipal solid wastes. *Bioresource Technology* 100, 2355-2360.
- King, B., Donnelly, M., Bergstrom, G., Walker, L., Gibson, D. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering* 102 (4), 1033-1044.
- Labatut, R.A., Angenent, L.T., Scott, N.R. (2014). Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: a trade-off between performance and stability. *Water Res* 53, 249–258.
- Lay, J.J., Li, Y.Y., Noike, T. (1997). Influences of pH and moisture content on the methane production in high solids sludge digestion. *Water Research* 31 (6), 1518 - 1524.
- Lo, H.M., Kurniawan, T.A., Sillanpaa, M.E.T., Pai, T.Y., Chiang C.F., et al. (2010). Modelling biogas production from organic fraction of MSW co-digested with MSWI ashes in anaerobic bioreactors. *Bioresource Technology* 101, 6329-6335.
- Malherbe, S., Cloete, T.E. (2002). Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1, 105-114.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) (2010). El Sector del Biogás Agroindustrial en España. Dirección general de recursos agrícolas y ganaderos. Madrid, 89 pp.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Moller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy* 26 (5), 485-495.
- Morgan, J.W., Evison, L.M., Forster, C.F. (1991). Changes to the microbial ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up. *Water Research* 25 (6), 639-653.

Moset, V., Poulsen, M., Wahid, R., Højberg, O., Møller, H. (2015). Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: methane productivity and microbial ecology. *Microbial Biotechnology* 8(5), 787-800.

Nielsen, H.B., Angelidaki I. (2008). Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Bioresource Technology* 99, 7995-8001.

Nielsen, H.B., Mladenovska, Z., Westermann, P., Ahring, B.K., 2004. Comparison of two-stage thermophilic (68 °C/55 °C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55 °C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering* 86 (3), 291–300.

Nopharatana, A., Pullammanappallil, P., Clarke, W. (2007). Kinetics and dynamic modelling of batch anaerobic digestion of municipal solid waste in a stirred reactor. *Waste Management* 27 (5), 595-603.

Oechsner, H., Lemmer, A., Preissler, D. (2011). Spurenelemente in NawaRo-Biogasanlagen zum Ausgleich substratbedingter Mangelerscheinungen und zur Stabilisierung des Garprozesses. KTBL-SCHRIFT 488, 48-61

Omil, F., Mende' Z., R., Lema, J.M. (1995). Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content. *Bioresource Technology* 54, 269-278.

Parawira, W., Murto, M., Read, J.S., Mattiasson, B. (2005). Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochemistry* 40 (9), 2945-2952.

Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology* 24 (8), 35-59.

Raposo, F., Fernández-Cegrì, V., De la Rubia, M.A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J.C. (2011). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 1088–1098.

Sanders, W.T.M. (2001). Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates. PhD thesis. Wageningen University, 101 pp.

Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K., Yagishita, T. (2004). Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (1), 65-70.

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2), 262-280.

Selig, M., Weiss, N., Ji, Y. (2008). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy laboratory. Technical Report NERL/TP-510-42629. Midwest Research Institute. USA.

Séné, C.F.B., McCann, M.C., Wilson, R.H., Grinter, R. (1994). Fouriertransform raman and Fourier-transform infrared spectroscopy: An investigation of five higher plant cell walls and their components. *PlantPhysiol* 106, 1623-1631.

Song, H., Clarke, W.P., Blackall, L.L. (2005). Concurrent microscopic observations and activity measurements of cellulose hydrolyzing and methanogenic populations during the batch anaerobic digestion of crystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 91, 369-378.

Soto, M.L., Dominguez, M.J., Lema, J.M. (1994). Enzymatic saccharification of alkali treated sunflower hulls. *Bioresource Technology* 49, 53-9.

Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1-11.

Van Lier, J.B., Tilche, A., Aharing, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L.W., Len, P., Verstraete, W. (2001). New perspective in anaerobic digestion. *Water Science Technology* 43, 1 - 18.

Veeken, A., Hamelers, B. (1999). Effect of temperature on hydrolysis rate of selected biowaste components. *Bioresource Technology* 69 (3), 249-254.

Wen, Z., Liao, W., Chen, S. (2004). Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. *Bioresource Technology* 91 (1), 31–39.

Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 797-824.

Zhang, Y., Himmel, M., Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24, 452 – 481.

Zeng, M., Mosier, N.S., Huang, C.P., Sherman, D.M., Ladisch, M.R. (2007). Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 97 (2), 265-278.

Zheng, W., Phoungthong, K., Lü, F., Shao, L-M., He, P-J. (2013). Evaluation of a classification method for biodegradable solid wastes using anaerobic degradation parameters. *Waste Management* 33 (12), 2632-2640.