

***ACTIVIDAD METANOGÉNICA DE LODOS PROCEDENTES DE
VILLAVICENCIO Y BUSBANZÁ, BOYACÁ.***



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ
OCTUBRE DE 2019**

**ACTIVIDAD METANOGENICA DE LODOS PROCEDENTES DE
VILLAVICENCIO Y BUSBANZÁ, BOYACÁ.**

**Bayron Steban Daza Martinez
David Felipe Salas Lozano
Angie Alejandra Vargas Rivera**

**Trabajo de investigación para optar el título de Bacteriólogos y
Laboratoristas Clínico**

**Asesor
Judith Elena Camacho Kurmen, QF MSc
Dr. en Biociencias**



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ
OCTUBRE DE 2019**

DEDICATORIA

A nuestras familias, amigos y personas especiales en cada una de nuestras vidas damos gracias por ser el conjunto de seres queridos que ponen su confianza en nuestro diario vivir, no podemos sentirnos más contentos por cada una de sus enseñanzas para poder estar hoy aquí.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes; ya que hemos podido concluir con éxitos nuestros estudios de una etapa que apenas comienza, y así mismo culminamos un proyecto que en un principio parecía ser imposible.

Queremos dedicar esta tesis a ustedes, personas de bien, seres importantes para conocer el amor, bienestar, y los finos deleites de la vida.

Muchas gracias a aquellos seres queridos que siempre aguardamos en nuestros corazones.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer a cada una de nuestras familias por el apoyo incondicional y estar presentes en cada una de las fortalezas y debilidades que presentamos en este camino educativo que deja muchas lindas experiencias. Agradecemos infinitamente a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por ser el lugar donde aprendimos demasiado y tuvimos inolvidables experiencias junto a docentes como compañeros, sin dudar dar gracias al laboratorio central y al grupo Bioprocesos y control por ofrecernos espacios para la elaboración de gran parte del proyecto y en especial, a nuestra asesora Judith Elena Camacho por brindarnos su más sincero apoyo, sabiduría y paciencia para culminar este grandioso trabajo, deseamos que siempre la vida le llene de salud, éxitos y felicidades.

Finalmente agradecer a la RedTecnoparque SENA por abrirnos las puertas para usar sus instalaciones y demás componentes para el desarrollo del proyecto, donde cada una de las personas pertenecientes que nos brindaron ayuda también hacen parte meritoria de este nuevo logro.

Así que a todas estas personas infinitas gracias por ese granito de arena que aportaron para darle fin a este gran sueño.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	13
1. ANTECEDENTES	16
2. MARCO REFERENCIAL	27
3. DISEÑO METODOLÓGICO	70
3.1 Universo, población, muestra	
3.2 Hipótesis, variables, indicadores	
3.3 Técnicas y procedimientos	
4. RESULTADOS	92
5. DISCUSIÓN	96
6. CONCLUSIONES	103
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
8. ANEXOS	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Riqueza hídrica de Colombia	29
Figura 2. Mapa de escasez del agua	29
Figura 3. Servicios ecosistémicos	30
Figura 4. Dibujo esquemático de un reactor UASB	44
Figura 5. Etapas principales de la digestión anaerobia	52
Figura 6. Ubicación exacta de la toma de muestra en Busbanzá, Boyacá	63
Figura 7. Ubicación exacta de la toma de muestra en Villavicencio, Meta	64
Figura 8. Equipo para determinación de DQO Nova 60	66

Figura 9. Incubadora de CO ₂ NUAIRE	68
Figura 10. Montaje para la determinación de Desplazamiento por NaOH al 3% ejercida por los lodos en estudio y su respectivo control	69
Figura 11. Lodos en estudio (empresa farmacéutica, río Quenane, Villavicencio, Meta y Laguna de Busbanzá, Boyacá)	70
Figura 12. Gránulos lodo laguna de Busbanzá, Boyacá	71
Figura 13. Gránulos lodo Río Quenane, Villavicencio, Meta	71
Figura 14. Gránulos lodo de empresa farmacéutica	72
Figura 15. Controles negativos	75
Figura 16. Medio BAS (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá	76
Figura 17. Medio BFG (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá	76
Figura 18. Medio BFL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá	77
Figura 19. Medio BSRL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá	78
Figura 20. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá	78
Figura 21. Medio BAS (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta	79
Figura 22. Medio BFG (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta	79
Figura 23. Medio BFL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta	80
Figura 24. Dilución de 10 ⁻² con presencia de biomasa y turbidez de la muestra de lodo procedente de Villavicencio, Meta	80
Figura 25. Hongo aislado en medio de cultivo BAS y BFL de lodo Villavicencio.	80
Figura 26. Medio BSRL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta	81
Figura 27. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta	81
Figura 28. Medio de cultivo BAS (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de empresa farmacéutica	82
Figura 29. Medio de cultivo BFG con lodo procedente de empresa farmacéutica	82
Figura 30. Medio de cultivo BFL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de empresa farmacéutica	83
Figura 31. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3, junto al control negativo de color azul) con lodo procedente de empresa farmacéutica	83
Figura 32. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de empresa farmacéutica, la flecha roja indica los medios con producción de FeS	84
Figura 33. Microorganismos encontrados relacionados en el proceso de digestión anaerobia	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores máximos físico-químicos permisibles en ARD	34
Tabla 2. Valores Máximos físico-químicos permisibles en Agroindustria	35
Tabla 3. Composición química típica del lodo crudo y digerido	46
Tabla 4. Composición química de lodos obtenidos de las etapas de tratamiento	48
Tabla 5. Propiedades de lodo granular	49
Tabla 6. Bacterias involucradas en el proceso de fermentación durante las etapas de fermentación.	56
Tabla 7. Microorganismos presentes en cada etapa de digestión anaeróbica	56
Tabla 8. Medios, tiempo e interpretación de lectura para cultivos microbianos	68
Tabla 9. Resultados de granulometría.	71
Tabla 10. Resultados obtenidos a partir de la realización de pH de lodos en estudio.	73

Tabla 11. Resultados obtenidos a partir concentración de sólidos realizados a lodos en estudio.	73
Tabla 12. Resultados obtenidos de realización de DQO a lodos en estudio.	74
Tabla 13. Resumen de resultados obtenidos de los lodos en estudio	91

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Granulometría lodo laguna de Busbanzá, Boyacá	119
Anexo 2. Granulometría lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta	123
Anexo 3. Granulometría lodo de empresa farmacéutica	127
Anexo 4. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos del procedimiento granulometría para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	127
Anexo 5. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos del procedimiento granulometría para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	128
Anexo 6. SST y SSV en lodos en estudio	128
Anexo 7. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos totales para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	129

Anexo 8. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos volátiles para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	129
Anexo 9. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos totales para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	130
Anexo 10. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos volátiles para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	130
Anexo 11. Cálculos de ST y SSV para lodo de empresa farmacéutica	131
Anexo 12. Cálculos de SST y SSV para lodo laguna de Busbanzá, Boyacá	131
Anexo 13. Cálculos de SST y SSV para el lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta	132
Anexo 14. Cálculos estadísticos desplazamiento de NaOH al 3% del lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta	133
Anexo 15. Cálculos estadísticos desplazamiento de NaOH al 3% del lodo de laguna de Busbanzá, Boyacá	134
Anexo 16. Cálculos estadísticos de desplazamiento de NaOH al 3% del lodo de empresa farmacéutica	135
Anexo 17. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo de laguna de Busbanzá, Boyacá	136
Anexo 18. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta	136
Anexo 19. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo de empresa farmacéutica	136
Anexo 20. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo de la quebrada Moncovita	137
Anexo 21. Cálculos número de bacterias para los lodos en estudio	137
Anexo 22. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos de técnica NMP para lodos de Laguna Busbanzá, Río Quenane, Quebrada Moncovita y Farmacéutica.	138
Anexo 23. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos de técnica NMP para lodos de Laguna Busbanzá, Río Quenane, Quebrada Moncovita y Farmacéutica.	138
Anexo 24. Medición de Metano obtenido por medio de la técnica desplazamiento de NaOH al 3% para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	139
Anexo 25. Promedio, Media, Desviación estándar y Coeficiente de variación en el desplazamiento de NaOH al 3% para los lodos en estudio	141
Anexo 26. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos de técnica Desplazamiento de NaOH al 3% en lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	141
Anexo 27. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos de técnica Desplazamiento de NaOH al 3% en lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.	141
Anexo 28. Procedimiento de granulometría para los lodos en estudio	142
Anexo 29. Medio para recuento de bacterias anaerobias estrictas (BAS)	143
Anexo 30. Medio para recuento de bacterias fermentadoras de lactato y de la glucosa (BFL y BFG)	144
Anexo 31. Medio para recuento de bacterias sulfatoreductoras del acetato y lactato (BSRL y BSRA)	145
Anexo 32. Preparación de solución mineral de Balch	145
Anexo 33. Preparación de oligoelementos sin sulfatos	146

Anexo 34. Preparación de solución diluida de vitaminas de Balch	146
Anexo 35. Preparación de solución mineral de PEENNING ET WIDDEL (sin sulfato)	146
Anexo 36. Preparación de solución de vitaminas de PEENNING y WIDDEL	147
Anexo 37. Metodología para la medición de metano por el método de desplazamiento de NaOH al 3%	148

Actividad metanogénica de lodos procedentes de Villavicencio, Meta y Busbanzá, Boyacá.

Resumen

Los residuos agroindustriales con alto contenido de materia orgánica provenientes de industrias cerveceras, alimenticias, y agrícolas, son tratados con métodos químicos y físicos. Siendo los métodos biológicos como la digestión anaerobia y el uso de lodos procedentes de lagos, lagunas y ríos, aprovechando la biodiversidad microbiana, uno de los métodos a ser utilizado por su bajo costo y efectividad en el tratamiento de vertimientos y la producción de biogás.

Proponiéndose como objetivo de esta investigación determinar la actividad metanogénica de los lodos de la laguna de Busbanzá (Boyacá) y el Río Quenane

(Villavicencio), conocer las características fisicoquímicas como granulometría, pH, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), demanda química de oxígeno (DQO) y caracterizar microbiológicamente los lodos. Se realizó un ANOVA (95%) y TUKEY (95%), para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

El lodo con mayor actividad metanogénica fue el de la laguna Busbanzá, 2,073 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, seguido por el lodo del Río Quenane de Villavicencio, 0,146 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, y por el lodo de la empresa farmacéutica con 0,012 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, usado como control. El ANOVA (95%) no estableció diferencias significativas entre los lodos analizados (P=0,98), para el desplazamiento de hidróxido de sodio al 3%. Las bacterias encontradas fueron BAS, BFG, BFL, BSRL, BSRA. Concluyendo que los lodos de origen natural pueden ser fuentes de inóculo para procesos de digestión anaerobia, siendo mejor el lodo de la laguna de Busbanzá, seguido por el lodo del Río Quenane.

Palabras Clave

Actividad metanogénica, lodos, inóculos, digestión anaerobia, consorcios microbianos, aguas residuales.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural fundamental para la vida, a nivel social esta es usada en diferentes procesos industriales donde se genera agua residual con una combinación de líquidos como residuos altamente contaminantes y a su vez cargadas de alto contenido de materia orgánica, el incremento de residuos agroindustriales con alto contenido de materia orgánica proviene primordialmente de la industria cervecera, alimentos, agrícola y entre otros. Actualmente, se han utilizado tratamientos físicos o químicos que no son efectivos, ni rentables y son limitados en el tiempo, además no son accesibles a las diferentes industrias pequeñas y medianas existentes (Pymes), por lo tanto, se propone para el tratamiento de este tipo de vertimientos los tratamientos biológicos, que no son tan costosos y son más efectivos, además se pueden utilizar diferentes fuentes de inóculos como los lodos metanogénicos y lodos procedentes de lagos, lagunas y ríos.

Entre los tratamientos biológicos se encuentra la digestión anaerobia allí ocurre un proceso de conversión de materia orgánica presente en residuos industriales a metano, dióxido de carbono e hidrógeno, por medio de diferentes etapas que se dividen en hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, y se dan gracias a la intervención de diferentes microorganismos, quienes gracias a su

actividad metabólica permiten que se cursen estas etapas en un orden específico que culmina con la producción de biogás, el uso de lodos con actividad metanogénica aprovecha la biodiversidad presente en lodos procedentes de lagos, lagunas, ríos y PTARs que pueden ser utilizados como fuente de microbiota que tiene la capacidad no sólo de disminuir la carga de materia orgánica contaminante sino también la posibilidad de generar energía a través del biogás producido, en especial el metano.

El uso de lodos ha sido útil para la recuperación o mejoramiento del suelo, en especial para el tratamiento de aguas. Es por esto, al ser Colombia un país rico en fuentes hídricas como ríos, lagunas y lodos, es importante conocer y a su vez aprovechar la microbiota presente para uso de lodos nativos en el tratamiento o mejoramiento del suelo, en especial para el tratamiento de aguas residuales y contaminadas como las de industrias de alimentos ricas en materia orgánica.

Por lo tanto, se propone estudiar los lodos procedentes de la laguna de Busbanzá (Boyacá) y el Río Quenane (Villavicencio) en cuanto a la microbiota que pueda estar presente con el objetivo de determinar si existen lodos colombianos que posean actividad metanogénica que les permitan ser empleados en el tratamiento de aguas residuales industriales a través del proceso de digestión anaerobia como fuente de inóculo de biodigestores o reactores UASB. Así mismo, se utilizó un lodo control positivo de una empresa farmacéutica que es actualmente empleado como fuente de inóculo. De dicha forma se busca aportar en la disminución de la contaminación de fuentes hídricas debido a las descargas causadas por la industria, por esa razón, aprovechar la biodiversidad presente de los lodos en estudio en cuanto a microorganismos nativos para dichos propósitos ambientales.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad metanogénica de los lodos de la laguna de Busbanzá (Boyacá) y el Río Quenane (Villavicencio)

Objetivos específicos

- Realizar análisis fisicoquímico a los lodos procedentes de la Laguna de Busbanzá (Boyacá) y el Río Quenane de Villavicencio (Meta).
- Caracterizar microbiológicamente los lodos muestreados.
- Relacionar AME (Actividad Metanogénica Específica) de los lodos muestreados y las poblaciones microbianas presentes para proponerlos como fuentes de inóculos para la digestión anaerobia.

1. ANTECEDENTES

El agua es una molécula clave y necesaria para que se dé la vida, $\frac{3}{4}$ de la superficie terrestre se encuentran cubiertas por agua, de la cual el 97% pertenece a aguas oceánicas, el 3% restante representa agua dulce. De este 3 % solo el 1% se encuentra de fácil acceso y utilización, mientras que el 79% se encuentra congelada en los glaciares y el 20% restante es de carácter subterráneo.¹

Este recurso se ha visto ampliamente afectado por las actividades antropogénicas, entre las cuales encontramos la minería, actividades agropecuarias y actividades industriales, entre otras. Las actividades industriales se han convertido en los principales agentes causantes de problemáticas sobre los cuerpos de agua, pues algunas de estas disponen sus aguas residuales sin ningún tipo de tratamiento sobre los cuerpos de agua, contaminándolos y alterando los ecosistemas que dependen de los mismos.¹

La mala disposición de los desechos orgánicos, como por ejemplo los residuos sólidos municipales en vertederos sin un tratamiento previo, tiene un efecto negativo a largo plazo sobre el medio ambiente y la salud de la población. La fracción orgánica de los desechos se descomponen microbiológicamente en los vertederos. Los procesos microbianos activos ocurren en el relleno sanitario durante 10 a 30 años y luego desaparece, los terrenos se convierten en objetos biológicamente inactivos pero contaminados y ecológicamente peligrosos que existen en este estado por un tiempo indefinido. Por lo tanto, se están desarrollando y aplicando activamente diferentes métodos de reciclaje ambiental como: La eliminación de lodos residuales, y la disposición de los residuos sólidos municipales en rellenos sanitarios, equipados con hidrocultivo inferior, manejo de lixiviados y recolección de biogás, también, la digestión anaerobia de residuos sólidos municipales en reactores con producción de metano y la fermentación de

lodos residuales de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales en biorreactores anaeróbicos.¹⁶

La digestión anaerobia, la cual es un proceso llevado a cabo por consorcios bacterianos anaeróbicos en donde se descompone la materia orgánica con el fin de obtener energía, dando como productos CH_4 (metano) y CO_2 .¹

Este es un proceso complejo, puesto que es una interrelación entre distintos géneros bacterianos y arqueas, que al realizar sus correspondientes procesos metabólicos generan productos que son aprovechados por otros y de esta manera llegar a los productos finales de interés como el dióxido de carbono y metano que pueden ser reutilizados como biocombustibles.¹

La degradación anaerobia de materiales proteicos como lo es el estiércol de animal, escombros delgados, residuos del procesamiento del pescado y residuos de matadero, no es tan eficiente, pues, se asocia con la inestabilidad del digestor, la reducción de la tasa de producción de metano, fluctuaciones en el pH, alcalinidad y altas concentraciones de ácidos grasos volátiles como acetato y propionato.¹⁵

La digestión anaerobia posee ciertos beneficios: Primero, es un método para convertir la energía de la biomasa en un combustible útil o biogás que se puede almacenar, transportar y utilizar para producir energía amigable con el medio ambiente. Segundo, es una forma de reciclaje de desechos orgánicos en fertilizantes líquidos y energía. Tercero, es un método de tratamiento de residuos con el fin de reducir efectos peligrosos en el medio ambiente. La producción del biogás surge de la digestión de un consorcio de bacterias anaerobias que descomponen varios desechos orgánicos como son: Aguas residuales industriales, alimentarias, lodos de depuración, excremento de animales o fracción orgánica de desechos municipales. La composición del biogás “depende del tipo de materia prima sometida al proceso de digestión y del método para llevar a cabo este proceso y es la siguiente. Metano (CH_4) (50–75%), dióxido de carbono (CO_2) (25–45%), sulfuro de hidrógeno (H_2S) (0-1%), hidrógeno (H_2) (0-1%), monóxido de

carbono (CO) (0–2%), nitrógeno (N₂) (0-2%), amoníaco (NH₃) (0-1%), oxígeno (O₂) (0-2%) y agua (H₂O) (2-7%)”.¹³

La digestión anaerobia se lleva a cabo gracias a la actividad de diferentes microorganismos presentes en el lodo que realizan diversas reacciones bioquímicas intra y extracelulares con el fin de obtener energía y nutrientes necesarios para su supervivencia. Para que se realice este proceso es importante la ausencia del oxígeno, ya sea en su forma molecular o ligado a otras moléculas en el medio, pues de esto depende la viabilidad de los microorganismos para que se dé como resultado el biogás de interés, compuesto por CH₄ en un 50 a 70%, CO₂ en un 25 a 45% y otros gases como sulfuro de hidrógeno (H₂S), hidrógeno (H₂) y nitrógeno (N₂), es necesario que se den una serie de etapas durante la digestión anaerobia las cuales son hidrólisis, fermentación, acetogénesis y metanogénesis. La hidrólisis es un proceso por el cual los microorganismos presentes producen exoenzimas que hidrolizan proteínas, carbohidratos y lípidos transformándolos a aminoácidos, azúcares y ácidos grasos, respectivamente, con el fin de reducir su tamaño y que puedan ser disponibles para su paso hacia la célula, el proceso de fermentación permite que una vez estas moléculas simples se encuentren dentro de la célula sean transformadas a ácidos orgánicos volátiles, acetato, CO₃ y H₂. En la etapa de acetogénesis los productos de fermentación son transformados a acetato siguiendo dos vías distintas: A partir de las moléculas orgánicas a través de reacciones de descarboxilación, y a partir de la reducción del CO₂ por la vía del acetyl-CoA, de esta manera los microorganismos obtienen energía durante esta fase metabólica, y finalmente la metanogénesis, donde la generación de metano se puede dar por dos vías dependiendo el sustrato utilizado por el microorganismo, la primera es la vía acetoclásica donde se utiliza acetato como sustrato y que contribuye con el 70% del metano generado y la segunda es la hidrogenotrófica en la que se obtiene metano a partir de CO₂ y H₂, contribuyendo con el 30% restante del metano producido.^{10, 11}

La aplicación de esta tecnología limpia de la digestión anaerobia permite que más de 300 millones de toneladas de materia orgánica puedan ser tratadas en

reactores anaeróbicos produciendo hasta 90 billones m³ de biogás por año, permitiendo la producción de hasta 2 kWh de electricidad, siendo el metano obtenido un biogás altamente calórico.²² Igualmente, hay estudios que demuestran la acción efectiva que tiene la digestión anaerobia sobre el tratamiento de pesticidas altamente contaminantes, se ha presentado mejores resultados bajo condiciones mesofílicas, que termofílicas, sin embargo los pesticidas causan inhibición de las Arqueas acetoclásicas y la producción de metano es dada gracias a la degradabilidad por el aumento de temperaturas y por las bacterias hidrogenotróficas.²³

Para realizar el tratamiento de aguas residuales de origen industrial por medio de digestión anaerobia o sistema de segunda generación, es necesario utilizar un mecanismo de retención de lodo, el cual se realiza en reactores, uno de los más utilizados es el reactor Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) o en siglas en español (RAFA) Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente, el cual es un sistema de tratamiento con alta eficiencia, este es un dispositivo que mantiene un flujo ascendente y se caracteriza por separar gas, sólido y líquido. El separador colocado en el reactor se encarga de dividir la parte inferior donde se realiza la digestión anaerobia de la parte superior o zona de sedimentación, el agua residual ingresa por el fondo del reactor en el cual tiene una trayectoria ascendente, pasa por la zona de digestión donde la materia orgánica presente se mezcla con el lodo anaerobio donde se encuentran los microorganismos que van a realizar el proceso de metanogénesis, posteriormente pasa a la zona de fluidificación donde la materia orgánica presente en el agua residual es suspendida por el flujo del agua o de gases y finalmente la zona de sedimentación, como resultado de la digestión se da la producción de biogás junto con el efluente de interés clarificado, en este proceso no se puede eliminar completamente la materia orgánica, por lo tanto, es necesario realizar un tratamiento posterior.^{7, 8}

El uso de biorreactores anaeróbicos, que están aislados del medio ambiente y por lo tanto, no afectan la descomposición microbiana de los desechos, el proceso se acelera cientos de veces, la adición de residuos de alimentos a los lodos residuales aumenta el rendimiento de biogás y estabiliza el proceso de fermentación con respecto a criterios como el pH y la alcalinidad, también, ayuda a

alcanzar la relación C/N óptima para microorganismos anaeróbicos y a disminuir la concentración de componentes tóxicos en la mezcla de fermentación. La fermentación de desechos orgánicos en condiciones termofílicas (50–55°C) es más efectiva que en mesofílicas (30–35°C), ya que se caracteriza por una mayor tasa de procesos microbianos y ayuda a estabilizar y descontaminar la mezcla de digestión, que es importante por su uso posterior como biofertilizante.¹⁶

El tratamiento de las aguas residuales generadas por la industria farmacéutica ha sido muy destacado tomando en cuenta la composición de la calidad de las aguas residuales, puesto que presentan altas concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO), alta salinidad y toxicidad. Pueden contener solventes como m-Cresol (MC), siendo un derivado del fenol que es generalmente usado como solvente en los antibióticos, pero tiene un efecto peligroso, tanto en el medio ambiente como en la salud humana debido a que tiene fuertes efectos sobre las membranas mucosas y el sistema nervioso central como daños en diferentes órganos, también el N-dimetilformamida (DMF), es un solvente orgánico ampliamente usado, pero a su vez, es una sustancia tóxica en la industria química que puede causar daños en el sistema nervioso, toxicidad renal y hepática.²⁴ Los resultados de la digestión anaerobia en este tipo de aguas residuales han demostrado eficiencia de eliminación de estas sustancias, en porcentajes promedio que van del 96% a 98% de m-Cresol y DMF a temperaturas de 15 ± 3 °C.²⁴

Con el paso de los años, la cantidad de residuos agrícolas, residuos de frutas como de otros alimentos han ido en aumento rápidamente donde en más de un 60% se puede encontrar el contenido de materia orgánica, la cual, va ser usada como sustrato de la digestión anaerobia, donde la presencia de microorganismos juega un papel importante. En esta población microbiana hay grupos difíciles de aislar sobre todo en cultivos de laboratorio así se les genere las condiciones adecuadas.²¹ De esta forma, el desarrollo de métodos moleculares que sean independientes del cultivo ha venido tomando importancia, teniendo en cuenta que permite identificar la diversidad genética y dinámica de las arqueas metanogénicas, donde por medio del uso de un específico marcador molecular, como el gen *mcrA*, que codifica la subunidad α de la metil coenzima reductasa M

(MCR), es clave para determinar la metanogénesis debido a que reduce el grupo metilo unido a la coenzima M a metano, siendo una enzima exclusiva de metanógenos, ya que el gen *mcrA* está presente en estos microorganismos.²¹

Las bacterias metanogénicas se clasifican dentro del dominio Archaea, este dominio se diferencia en 4 filos, siendo Crenarchaeota y Euryarchaeota los más conocidos. Los metanógenos pertenecen al filo Euryarchaeota y se dividen en 4 clases, 5 órdenes, 9 familias y 26 géneros.¹³

En estudios realizados sobre la distribución taxonómica de arqueas metanogénicas se logra determinar que en cuanto a la etapa de metanogénesis se encuentra una dominancia por los microorganismos que utilizan la vía acetoclásica, donde los dominantes fueron las familias Methanosaetaceae, Methanosarcinaceae, Methanocellaceae y Methanobacteriaceae, pero, a pesar de esto se encuentra la presencia de microorganismos que utilizan la vía hidrogenotrófica como lo son la familia Methanomicrobiales.^{11, 12}

Estas comunidades pueden ser halladas en diferentes ecosistemas, tales como: suelos, lodos, bosques, praderas, aguas continentales, pantanos, zonas encharcadas y en el mar. Por lo cual, estas comunidades suelen variar significativamente según el ecosistema en donde sean halladas, esto ha conllevado numerosos estudios sobre las comunidades microbianas y sus interrelaciones tales como los realizados por Hiroyuki Imachi et al. en 2008, en donde se realizó aislamiento e identificación de *Methanolinea tarda* gen. nov. sp. provenientes de lodo metanogénico de un digestor por medio de cultivos selectivos, microscopía electrónica y técnicas moleculares; y Acuña P. et al. en 2008, en donde se aisló e identificó microorganismos pertenecientes a los géneros *Methanococcus* y *Methanobacterium* que provenían de 4 fuentes de Bogotá D.C, por medio de cultivos selectivos y microscopía óptica. Esto permite evidenciar la variabilidad de microorganismos que pueden llegar a componer estos consorcios microbianos, puesto que varían incluso morfológicamente al estar dispuestos en cocos o bacilos organizados en diferentes agrupaciones y tamaños de carácter Gram variable.^{2, 3}

La implementación de estos microorganismos ha sido fructífera, pues pueden metabolizar compuestos orgánicos complejos de diferentes proveniencias a una alta tasa de efectividad, tal y como es expresado en el estudio realizado por Real O. et al. en 2010, en donde somete aguas residuales provenientes de la producción de café a un consorcio microbiano obtenido a partir de fluido ruminal vacuno, obteniendo como resultado una disminución de la carga orgánica expresada en términos de DQO del 91.2%.⁴

Además del aislamiento e identificación de los microorganismos involucrados, es necesaria la realización de caracterizaciones fisicoquímicas de los lodos metanogénicos, en donde encontramos la capacidad metanogénica específica (AME), la cual brinda una aproximación sobre la efectividad metabólica que tiene la población metanogénica en estudio frente al sustrato suministrado, dando como resultado la producción de metano y dióxido de carbono.⁵

La caracterización fisicoquímica es crucial para determinar las condiciones a las cuales pueden ser sometidos los consorcios microbianos, entre las cuales encontramos la temperatura, puesto que al haber una gran variedad, los microorganismos que están involucrados en el consorcio pueden verse afectados por esta característica, pues, estos consorcios se encuentran sujetos a temperaturas específicas para que puedan llevar a cabo sus procesos, sean temperaturas psicrófilas, mesófilas o termófilas, en donde especialmente los microorganismos termófilos son los más afectados por estos cambios en la temperatura del reactor, así como pH, SSV, SST, AGV y DQO.^{5,6}

A la hora de realizar el tratamiento anaerobio es importante determinar la calidad y composición de los lodos que van a ser utilizados para este proceso, por lo tanto, es necesario determinar algunos parámetros fisicoquímicos como pH, alcalinidad, acidez, DQO, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), de igual manera, es importante realizar la caracterización de los microorganismos presentes, pues así, se podrá entender el funcionamiento del sistema, junto con el desempeño del lodo debido a que estos se encuentran involucrados en las rutas metabólicas necesarias para realizar el proceso anaerobio.⁹

En cuanto a la relación inóculo/sustrato (RIS), afecta el rendimiento del metano, la tasa de producción de metano y el consumo de ácidos grasos volátiles. RIS, también, afecta la aparición y la duración de la fase de hidrólisis y la metanogénesis, y la susceptibilidad de microorganismos a los efectos inhibidores. Para un proceso estable, RIS es un parámetro importante que afecta el proceso de digestión anaerobia. La proporción óptima de inóculo/sustrato depende de la fuente del inóculo, pues, las diferentes fuentes de inóculo tendrán diferentes actividades metabólicas. Un RIS óptimo garantiza la presencia de los grupos de microorganismos necesarios para la digestión anaeróbica completa.¹³

La tasa de desarrollo de las bacterias depende del sustrato usado, en este caso, si el sustrato es carbohidratos la tasa de generación de bacterias en la fase ácida será de 5 horas, mientras, si el sustrato es grasa el tiempo de prolonga hasta 72 horas aproximadamente. El tiempo de generación para las bacterias que utilizan propiónico y ácidos grasos alcanza las 84 y 131 horas, respectivamente. En la fase de metanogénesis, el tiempo de generación varía entre 15 y 85 horas.¹³

Los residuos de lodos activados surgen por el tratamiento de aguas residuales, pueden convertirse en un contaminante secundario si no se hace un adecuado manejo. El tratamiento de estos lodos activados resalta el uso de la digestión anaerobia porque reduce la cantidad de lodo, produce biogás y hay destrucción de patógenos. La digestión anaerobia tiene algunas complicaciones en sus usos, como el aumento de los lodos con el fin de reducir el volumen de residuos de los lodos activados, además, el tiempo de retención hidráulica es idéntico al tiempo de retención de sólidos, por lo cual, se requiere un mayor volumen de digestores, teniendo un bajo funcionamiento, además, los lodos activados residuales en sistemas de tratamiento biológico presentan un tiempo de retención de sólidos larga, generando, una baja biodegradabilidad en comparación con lodos primarios debido a la acumulación de residuos celulares y materiales inertes que van afectando el rendimiento de la digestión anaerobia.¹⁷

Un lodo importante para la industria es el lodo activado de residuos de la refinería de petróleo que se produce en el proceso de tratamiento biológico de aguas residuales del petróleo. La manipulación y la eliminación eficiente de los residuos

de estas fábricas pueden minimizar el riesgo para el medio ambiente y la salud humana. Este lodo es rico en compuestos de aceite, lo que significa, que es un recurso energético valioso. Se han realizado estudios para realizar el tratamiento de los lodos de esta zona usando microorganismos aerobios para convertir los hidrocarburos en dióxido de carbono, pero posee ciertos inconvenientes debido a la necesidad de una gran superficie y problemas en contaminación del aire y agua subterránea. La digestión anaerobia es económica y efectiva para la estabilización, utilización y recuperación de lodos. Se aplica tanto para el tratamiento de lodos de residuos municipales y residuos industriales. Existen pocos estudios acerca de la digestión anaerobia de lodos activados con residuos de rehidratación por lo que las condiciones de funcionamiento óptimas aún deben investigarse, además, existe una falta de conocimiento sobre las condiciones de funcionamiento del reactor hidrolítico-acidogénico alimentado con residuos de lodo activado.¹⁸

Los métodos de pretratamiento varían desde los procesos químicos (ácido, alcalino), los procesos físicos (como el pretratamiento térmico o ultrasónico) hasta sus combinaciones. El rendimiento de estos diferentes métodos varía. Para seleccionar un método de pretratamiento factible para residuos de lodos activados, se necesitan experimentos comparativos. Estos métodos buscan mejorar el rendimiento de la digestión anaeróbica, y a su vez, la producción de metano, por ejemplo, el tratamiento previo ultrasónico de sustratos orgánicos sólidos, es proceso que se ha estudiado ampliamente y ya se han establecido en instalaciones a gran escala, cabe aclarar que su eficacia está muy relacionada por las condiciones del proceso, por ejemplo, dependiendo de la composición del sustrato específico, se sabe que la relación entre solubilización y biodegradabilidad anaeróbica difiere significativamente y esta evidencia representa un punto clave para la ampliación del proceso combinado de digestión ultrasónica / anaeróbica.^{14,}

18

Existen compuestos que generan efectos directos tóxicos en la comunidad microbiana como lo es la liberación de sulfuro, que, además de ser tóxico, también, forma complejos con metales que pueden disminuir la biodisponibilidad de elementos traza esenciales para la actividad microbiana. En cuanto al efecto

inhibitorio del amoníaco, son más pronunciados en las últimas etapas del proceso de digestión, que incluye la actividad de las metanogénico hidrogenotrófica y acetoclásica, aunque, también influye en las vías de reacción más arriba en la cadena de degradación. Ahora, las tasas de producción de metano se ven optimizadas en temperaturas alrededor de 42–44°C, lo que indica un potencial adicional para mejorar el rendimiento del digestor al operar el proceso mediado por la oxidación sintrófica del acetato (SAO) dentro de este rango de temperatura. Se sugiere la adición de elementos traza para cumplir con los requisitos microbianos en las rutas metabólicas.¹⁵

La adición de elementos trazas como el hierro (Fe), el níquel (Ni), el cobalto (Co) y el tungsteno (W) son esenciales para las enzimas metanogénicas y los cofactores, haciéndolos esenciales para cumplir con los requisitos microbianos para realizar sus rutas metabólicas. Además, el monóxido de carbono que contiene níquel deshidrogenasa (CODH) es una enzima clave en la vía de Wood-Ljungdahl, que es utilizada tanto por los metanógenos como por los acetógenos y se sabe que es activa en cultivos sintróficos.¹⁵

Se han propuesto algunos procesos para el mejoramiento del rendimiento de la digestión anaerobia como es el uso del biorreactor de membrana anaeróbico, el cual presenta un mejor rendimiento en la digestión de lodos activados residuales que el que presenta el proceso de digestión anaerobia convencional, debido a la separación sólido/líquido de las membranas que retiene los microorganismos, mejorando la degradación de los contaminantes.¹⁷

Para aprovechar mejor el proceso de digestión anaerobia usando los diferentes microorganismos implicados en el proceso como una tecnología limpia, para que realicen una efectiva actividad metanogénica específica, (AME), se necesita determinar qué factores pueden verse implicados para que el proceso se realice adecuadamente, por lo cual, es importante tener en cuenta que la AME es un parámetro derivado de la digestión anaerobia, por ello factores como la temperatura, pH, aceptores de electrones, presencia de tóxicos y sustrato han venido siendo de vital importancia a través de los procesos metabólicos.

Diferentes estudios se han encaminado a determinar en qué rangos de temperatura funciona mejor la digestión anaerobia y se logra obtener mayor producción de metano, ya que se reporta que este factor afecta las comunidades microbianas, la diversidad en los consorcios y el equilibrio termodinámico junto a las vías metabólicas, por lo cual es un factor a tener en cuenta para que el proceso se realice adecuadamente.¹⁹

Para evaluar los efectos que puede generar la temperatura en la comunidad microbiana los estudios se basan en el 16S rDNA (referido como 16s rRNA gen amplificado desde DNA genómico), ya que este determina no solo microorganismos vivos, también, aquellos que se encuentran latentes y muertos, es decir, permite evaluar in situ la actividad metanogénica que se está produciendo por los microorganismos a la temperatura que estos se encuentren.¹⁹ En este caso, es posible determinar que la efectividad en la digestión anaerobia a temperaturas termofílicas (55 - 60°C) puede aumentar la tasa de degradación y producción de metano, pero como desventaja, se encuentra una mala estabilidad tomando en cuenta que a mayores temperaturas la diversidad microbiana es alterada, de igual forma, los procesos metabólicos para la producción del biogás y alto costo tanto económico como energético.¹⁹

La AME determina la presencia de microorganismos capaces de producir metano en los lodos por acción de un sustrato, el cual no es un factor limitante, mientras la cantidad de población metanogénica presentes en los reactores anaeróbicos es un factor importante y a su vez crítico, ya que puede disminuir la efectividad en el tratamiento de las aguas residuales. Es por ello que la digestión anaerobia es un proceso microbiano donde intervienen diferentes poblaciones, el cual necesita para su desarrollo un diseño y control adecuado caracterizando los microorganismos presentes en los lodos, ya que es necesario proporcionar suficiente población metanogénica en los sistemas para que sea eficaz el mencionado tratamiento. De la misma manera, la AME evalúa los lodos en cuanto a la presencia de microorganismos metanogénicos y determina qué capacidad de carga apropiada se debe implementar para que se eleve el potencial en el sistema de tratamiento anaeróbico, y así producir metano.²⁰

Para la determinación de AME, se pueden implementar cantidades conocidas de los lodos en frascos con una cantidad apropiada de sustrato que permitan, posteriormente, medir la producción de gas metano por medio del método de desplazamiento de líquido, donde la AME se estima trazando la producción de metano (en g DQO) contra el tiempo (en días) y se divide por g sólidos suspendidos volátiles (VSS), donde se usa ácido acético como sustrato por ser el de mejor elección para la conversión a metano.²⁰

Es por esto que el aprovechamiento de las diferentes poblaciones microbianas presentes en los lodos es útil para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica, presencia de hidrocarburos y sustancias tóxicas como las mencionadas anteriormente. También se recalca la importancia de la búsqueda de fuentes de inóculo de ecosistemas naturales como el uso de lodos provenientes de lagunas y ríos, donde se resalta el estudio de “*Evaluación de la actividad metanogénica específica (AME) del sedimento de la Quebrada la Moncovita*” donde se recuperó y determinó la existencia de poblaciones bacterianas BAS, BFG, BFL, BSRL y BSRA (2.6×10^2 , 2.4×10^2 , 1.8×10^1 , 6.8×10^1 y 7×10^0 respectivamente) por medio de la técnica de número más probable (NMP); a su vez se implementó la técnica de desplazamiento de hidróxido de sodio al 3% para determinar la capacidad metanogénica específica (AME) en donde se obtuvo una AME de 0.003 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, resaltando de esta forma la importancia del estudio de lodos de procedencia Colombiana, puesto que este estudio demuestra la existencia de consorcios microbianos en ambientes naturales de Colombia capaces de producir metano.²⁵

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Agua

El agua es un líquido transparente, incoloro, inodoro e insípido en estado puro, cuyas moléculas están formadas por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, y que constituye el componente más abundante de la superficie terrestre y el mayoritario de todos los organismos vivos.²⁸ Las $\frac{3}{4}$ partes de la superficie terrestre se encuentran cubiertas por agua, de la cual el 97% pertenece a aguas oceánicas, el 3% restante representa agua dulce. De este 3 % solo el 1% se encuentra de fácil acceso y utilización, mientras que el 79% se encuentra congelada en los glaciares y el 20% restante es de carácter subterráneo.¹

Colombia es uno de los países con mayor riqueza en cuanto a sistemas de origen natural que se encuentran sobre la superficie terrestre y a su vez están conformados por elementos de carácter físicos-bióticos y masas o volúmenes de agua, o cuerpos de agua en el mundo. Colombia cuenta con 4 vertientes hidrográficas principales las cuales son la vertiente del pacífico, la vertiente de las amazonas, la vertiente del caribe y la vertiente del Orinoco en donde desembocan ríos tan importantes como Magdalena, Meta, Cauca, Putumayo, Guaviare, Caquetá y Atrato; además de ello cuenta con aproximadamente 1800 lagunas y lagos.^{29, 33}

Aun así con toda esta cantidad exorbitante de riquezas hidrográficas (figura 1) Colombia se encuentra situada entre los países que presentan escasez de agua económica (figura 2), esto quiere decir que por la contaminación de fuentes hídricas, la imposibilidad de costear extracciones de agua, o la falta de infraestructura para la potabilización de agua, entre otras razones económicas, el país se encuentra bajo un “estrés hídrico” a causa del incremento del crecimiento demográfico y económico.^{29, 35}

Existen diferentes fuentes de contaminación de los cuerpos de agua, tales como actividades agropecuarias, aguas residuales domésticas, la minería, la falta de acceso a servicios de agua potable y alcantarillado, junto a los bajos niveles económicos y falta de educación e higiene, pero principalmente se encuentran las actividades industriales quienes realizan descargas o vertimientos de elementos, sustancias o compuestos contenidos en un medio líquido con diferentes compuestos contaminantes, superando así la capacidad de asimilación y dilución de los cuerpos de agua, es decir, supera la capacidad del cuerpo acuático de aceptar y degradar sustancias, elementos o formas de energía, por medio de procesos naturales, físicos químicos o biológicos.^{1, 33}

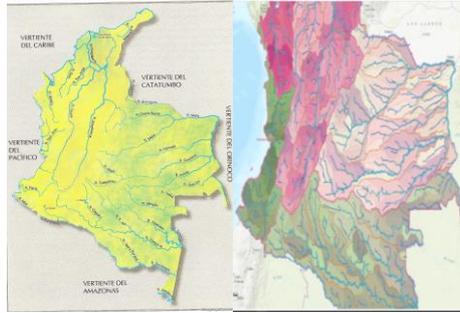


Figura 1. Riqueza hídrica de Colombia

Fuente: Colombia-sa.com. (2019). *Hidrografía de Colombia*. [online] Available at: <https://www.colombia-sa.com/geografia/geografia2.html> [Accessed 26 Sep. 2019].²⁹

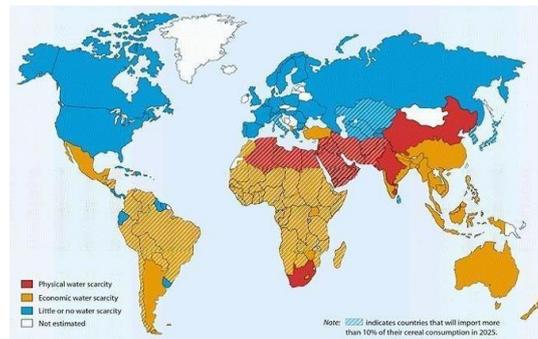


Figura 2. Mapa de escasez del agua

Fuente: Mapa de escasez de agua en el mundo. (2017). *El mapa de escasez de agua que amenaza a la mitad del mundo*. [online] Available at: <https://www.dinero.com/edicion-impresa/lagrafica/articulo/mapa-de-escasez-de-agua-en-el-mundo/243940> [Accessed 26 Sep. 2019].³⁰

Colombia no solo presenta afectaciones en cuanto a ríos, también presenta afectaciones en otros cuerpos acuáticos de gran importancia, como lo son las lagunas y las ciénagas. Estos cuerpos acuáticos ocupan 5.622.750 ha, las cuales se encuentran principalmente en los departamentos de Bolívar y Magdalena. Las lagunas representan cerca de 22.950 ha y las sabanas inundables cubren una superficie total aproximada 9.255.475 ha, ubicadas en los departamentos del Amazonas, Guainía y Guaviare, mientras los bosques inundables representan aproximadamente 5.351.325 de hectáreas y se localizan en la Orinoquia, Amazonia, bajo Magdalena y en menor medida en la zona pacífica.⁴⁰

Estos ecosistemas cuentan con sistemas complejos de interrelación entre individuos de diferentes especies, condiciones climáticas, adaptabilidad genética que conforma un equilibrio de sostenibilidad y viabilidad al ecosistémicos (figura

3), por lo cual cualquier afectación genera un desequilibrio difícil de remediar o de solucionar, especialmente cuando este es de carácter constante tal como lo son las alteraciones generadas por los vertimientos en cuerpos de agua, por lo cual se han generado estrategias para el control de la misma sobre estos ecosistemas.⁴⁰

41

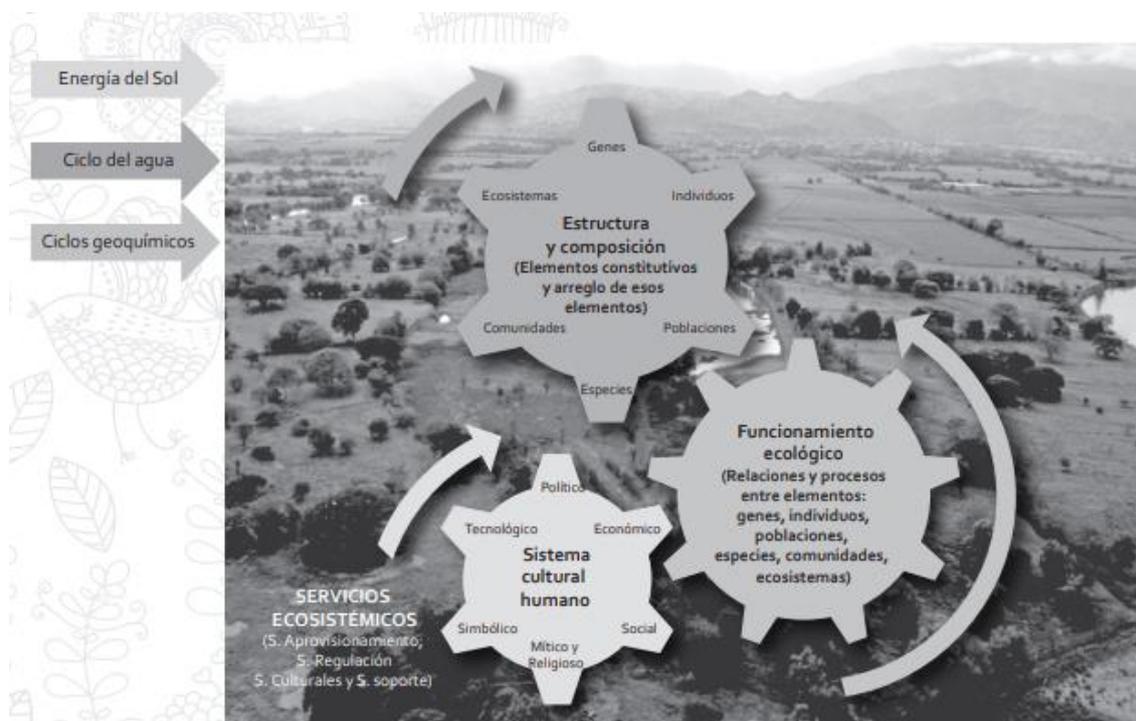


Figura 3. Servicios ecosistémicos

Fuente: política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE).2011.⁴¹

Busbanzá no cuenta con un potencial hídrico importante su condición bioclimática de frío-seco, hace que se presenten bajas precipitaciones, además de que sus microcuencas son extremadamente cortas. Cuenta con dos cuerpos acuáticos, la quebrada Busbanzá, que nace en el municipio de Floresta, y la quebrada Buntía, que nace en la escuela rural Cusagota. Estas fuentes hídricas desembocan en el río Chicamocha el cual se origina en los municipios de Tuta y Jordan y posee un área aproximada de 1536 km² siendo uno de los ríos más importantes del departamento de Boyacá.⁹⁵

El Río Quenane se encuentra localizado en el municipio de Villavicencio, este nace cerca de la Base Aérea Luis F. Gómez Niño de la Fuerza Aérea Colombiana

– FAC y desemboca en el Río Negro, recibe aportes de una serie de caños, predominan las corrientes de agua que drenan de occidente a oriente. el Río Quenane recibe aporte de afluentes como los Caños Quenanito, Cajuy, entre otros. La longitud total de Río Quenane es de aproximadamente 55,447 Km y área total de la cuenca de Río Quenane es de aproximadamente 166.69 Km² y hace parte de sub zona del Río Negro y este a su vez de la cuenca del Orinoco.⁹⁴

2.2 Marco legal

En Colombia se posee una variedad de normas con el objetivo de reglamentar los usos, disposiciones de cuencas y cuerpos de agua, protección ambiental y en especial la disposición y regulación de vertimientos sobre cuerpos de agua de carácter superficial. Principalmente encontramos el decreto **2811 del 18 de diciembre de 1974** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible en donde se dispone el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente, esté basándose en el principio del medio ambiente como patrimonio común de la humanidad, todo a vez que es necesario para la supervivencia y el desarrollo económico y social de los pueblos, por lo tanto, el estado y los particulares deben participar en su preservación y manejo. El decreto permite determinar que es un contaminante, siendo entendido como cualquier elemento, combinación de elementos, o forma de energía que actual o potencialmente pueda producir alteración ambiental ya sea de carácter física, química o biológica, es decir:

La degradación, la erosión y el revenimiento de suelos y tierras; Las alteraciones nocivas de la topografía; Las alteraciones nocivas del flujo natural de las aguas; La sedimentación en los cursos y depósitos de agua; Los cambios nocivos del lecho de las aguas; La extinción o disminución cuantitativa o cualitativa de especies animales y vegetales o de recursos genéticos; La introducción y propagación de enfermedades y de plagas; La introducción, utilización y transporte de especies animales o vegetales dañinas o de productos de sustancias peligrosas; La alteración perjudicial o antiestética de paisajes naturales; La disminución o extinción de fuentes naturales de energía primaria; La acumulación o disposición inadecuada de

residuos, basuras, desechos y desperdicios; El uso inadecuado de sustancias peligrosas; La eutrofización; La concentración de población humana urbana o rural en condiciones habitacionales que atenten contra el bienestar y la salud.³¹

Además de determinar los posibles contaminantes establece directrices para el correcto uso de elementos ambientales y de recursos naturales renovables, al igual de sanciones para quienes incumplan lo establecido dentro del **decreto 2811 del 18 de diciembre de 1974** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.³¹

Posteriormente encontramos el **decretos 3930 del 2010** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y el **decreto 1076 del 2015** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible quienes decretan las disposiciones relacionadas con los usos del recurso hídrico, el Ordenamiento de los Recursos Hídricos y los vertimientos a los recursos hídricos al suelo y a los alcantarillados; La gestión del ambiente y de los recursos naturales renovables con respecto al ordenamiento ambiental del territorio y la definición de políticas y regulaciones en cuanto a la recuperación, conservación, protección, ordenamiento, manejo, uso y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales renovables y del ambiente de la Nación respectivamente.^{32, 33}

El **decreto 3930 de 2010** del Ministerio Ambiente y Desarrollo Sostenible establece los criterios mínimos para la elaboración de un plan de ordenamiento de un cuerpo acuático, es decir, la clasificación del cuerpo de agua en ordenamiento, el inventario de usuarios, el uso o usos a asignar, los criterios de calidad para cada uso, los objetivos de calidad a alcanzar en el corto, mediano y largo plazo, las metas quinquenales de reducción de cargas contaminantes, la articulación con el Plan de Ordenación de Cuencas Hidrográficas en caso de existir y, el programa de seguimiento y monitoreo del Plan de Ordenamiento del Recurso Hídrico. Además, determina que deben contarse con los siguientes parámetros para determinar la capacidad asimilativa de sustancias biodegradables o acumulativas y la capacidad de dilución de sustancias no biodegradables, estos serían:

Demanda bioquímica de oxígeno a cinco días (DBO5), Demanda química de oxígeno (DQO), Sólidos solubles (SS), Potencial de hidrógeno (pH), Temperatura (T), Oxígeno disuelto (OD), Caudal (Q), Datos Hidrobiológicos y por último Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Las diferentes destinaciones enunciadas en el decreto 3930 del 2010 que pueden dárseles al agua serían: Consumo humano y doméstico, preservación de flora y fauna, agrícola, pecuario, recreativo, industrial, estético, pesca, maricultura y acuicultura, navegación y transporte acuático. Adicionalmente el decreto emite prohibiciones con respecto a los vertimientos sobre las cabeceras de las fuentes de agua, en acuíferos, en los cuerpos de aguas o aguas costeras, destinadas para recreación, en un sector aguas arriba de las bocatomas para agua potable, en cuerpos de agua que la autoridad ambiental competente declare total o parcialmente protegidos, vertimientos que ocasionen altos riesgos para la salud o para los recursos hidrobiológicos, entre otros.³³

Ahora bien, la **resolución 631 de 2015** del Ministerio Ambiente y Desarrollo Sostenible dispone todos los parámetros y valores límite que deberán cumplir quienes realicen vertimientos sobre cuerpos de agua de carácter superficial. El decreto establece 2 tipos de aguas residuales, las aguas residuales domésticas (ARD) y las aguas residuales no domésticas (ARnD), es decir las ARD proceden de hogares, duchas, cocinas, retretes, lavamanos, lavado de elementos de aseo, lavado de pisos, paredes y lavado de ropa, (siempre y cuando no sean de tipo industrial. Las ARnD son todas aquellas que provienen de actividades industriales, comerciales o de servicio diferentes a las expuestas anteriormente en las ARD. Se establece que deben realizarse análisis microbiológicos en términos de coliformes totales y coliformes fecales por medio de la técnica de Número más probable (NMP/100ml) cuando el vertimiento de aguas residuales domésticas y no domésticas supere los 125,00 Kg/día de DBO5 anteriormente a los procesos de tratamiento de las aguas en cuestión. Posteriormente se determinan los valores máximos permisibles de plaguicidas con niveles tóxicos de IA, IB y II, es decir, lo máximo que puede encontrarse en un cuerpo de agua con vertimientos es de 0.001 mg/L, 0.05 mg/L y 0.10 mg/L respectivamente. Si se desea conocer los valores máximos permisibles es necesario remitirse a la resolución, puesto que

estos varían según la actividad doméstica o industrial que se esté analizando, por ejemplo, podemos observar diferencias entre los parámetros físico-químicos de las ARD (Tabla 1) y las ARnD (Tabla 2) provenientes de actividades industriales diferente a las señaladas anteriormente en la resolución.³⁴

Es importante recalcar que en Colombia existen diferentes organismos o autoridades encargadas de velar por el medio ambiente, tales como el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) y los parques nacionales naturales de Colombia, los anteriormente descritos son organismos a nivel nacional, mientras que a nivel departamental encontramos organismo o autoridades CAR como CDMB, CORPOBOYACA, CORPOCALDAS, CAR, CAS, CVS, Secretaría de Medio Ambiente, Secretaria de Salud, entre otros.³⁶

PARÁMETRO	UNIDADES	AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS (ARD) DE LAS SOLUCIONES INDIVIDUALES DE SANEAMIENTO DE VIVIENDAS UNIFAMILIARES O BIFAMILIARES	AGUAS RESIDUALES DOMESTICAS (ARD), Y DE LAS AGUAS RESIDUALES (ARD=ARnD) DE LOS PRESTADORES DEL SERVICIO PÚBLICO DE ALCANTARILLADO A CUERPOS DE AGUAS SUPERFICIALES, CON UNA CARGA MENOR O IGUAL A 625,00 kg/DÍA DBO5
GENERALES			
pH	unidades de pH	6,00 a 9,00	6,00 a 9,00
Demanda química de Oxígeno (DQO)	mg/L O2	200,00	180,00
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	mg/L O2		90,00
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	100,00	90,00
Sólidos sedimentables (SSED)	mL/L	5,00	5,00
Grasas y Aceites	mg/L	20,00	20,00

Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM)	mg/L		Análisis y reporte
HIDROCARBUROS			
Hidrocarburos Totales (HTP)	mg/L		Análisis y reporte
COMPUESTOS DE FÓSFORO			
Ortofósforos	mg/L		Análisis y reporte
Fósforo total (P)	mg/L		Análisis y reporte
COMPUESTOS DE NITRÓGENO			
Nitratos (N-NO ₃ -)	mg/L		Análisis y reporte
Nitritos (N-NO ₂ -)	mg/L		Análisis y reporte
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	mg/L		Análisis y reporte
Nitrógeno Total (N)	mg/L		Análisis y reporte

Tabla 1. Valores máximos físico-químicos permisibles en ARD
Fuente: Decreto 631 del 2015.³⁴

PARÁMETRO	UNIDADES	PROCESOS POSCOSECHA DE PLÁTANO Y BANANO	PRODUCCIÓN DE AZÚCAR Y DERIVADOS A PARTIR DE CAÑA DE AZÚCAR	EXTRACCIÓN DE ACEITES DE ORIGEN VEGETAL
GENERALES				
pH	Unidades de pH	6,00 a 9,00	6,00 a 9,00	6,00 a 9,00
Demanda química de Oxígeno (DQO)	mg/L O ₂	200,00	900,00	1.500,00
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L O ₂	50,00	500,00	600,00
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	100,00	200,00	400,00
Sólidos sedimentables (SSED)	mL/L	5,00	2,00	2,00
Grasas y Aceites	mg/L	10,00	20,00	20,00
Compuestos Semivolátiles Fenólicos	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte	Análisis y reporte
Sustancias Activas al Azul de Metileno	Análisis y reporte	Análisis y reporte	Análisis y reporte	Análisis y reporte

(SAAM)				
HIDROCARBUROS				
Hidrocarburos Totales (HTP)	mg/L	10,00	10,00	
COMPUESTOS DE FÓSFORO				
Ortofosfatos (P-PO43-)	mg/L	Análisis y reporte	Análisis y reporte	

Tabla 2. Valores Máximos físico-químicos permisibles en Agroindustria
Fuente: Decreto 631 del 2015.³⁴

El **decreto 1076 del 2015** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible es un compendio de las diferentes normas vigentes que rigen a nivel nacional sobre las diferentes actividades de aprovechamiento, regulación y protección en el ámbito ambiental. Allí se decretan todas aquellas estrategias para el control, protección, recuperación, conservación, manejo y uso sostenible de estos ecosistemas. Por lo cual en el decreto se cuenta con planes de ordenamiento, control, monitoreo y protección, definición de funciones, derechos y obligaciones de los diferentes actores sobre estos sean gubernamentales o particulares, a su vez determina las diferentes estrategias para el diagnóstico ambiental, impacto ambiental, políticas de control y administración de parques nacionales y ecosistemas protegidos, permisos, autorizaciones o licenciaturas ambientales, aprovechamiento de los recursos de estos ecosistemas, estudios de carácter científico, entre otros. Además de lo anteriormente expuesto se encuentra los requerimientos mínimos para la creación de las anteriores estrategias mencionadas.³²

Finalmente se cuenta con la Política Nacional para la Gestión Integral del Recurso Hídrico (PNGIRH) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible donde se disponen los objetivos, estrategias, metas, indicadores y líneas de acción estratégicas para el manejo del recurso hídrico en el país, en un horizonte de 12 años; y se busca promover la Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos

(Gibse), de manera que se mantenga y mejore la resiliencia de los sistemas socioecológicos, a escalas nacional, regional, local y transfronteriza, considerando escenarios de cambio y a través de la acción conjunta, coordinada y concertada del Estado, el sector productivo y la sociedad civil respectivamente.^{40, 41}

2.3 Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales se realiza con la finalidad de cumplir los requisitos mínimos establecidos por las normativas antes de un tratamiento secundario o de su descarga en un efluente, es fundamental para evitar la contaminación de las fuentes hídricas, este se realiza para manejar el pH, temperatura, contenido de sólidos en suspensión, materia orgánica, metales pesados, grasas y aceites, dentro de lo establecido antes de un tratamiento biológico o la descarga en un cuerpo de agua.^{74, 75}

Para la remoción de contaminantes en el agua existen varios sistemas de tratamiento de aguas residuales, inicialmente se pueden clasificar según el tipo de proceso:^{74, 75}

- **Proceso físico:** Se da la remoción de material superficial que trae consigo el agua y que puede ser fácilmente removido por medio de mallas o barreras, rejillas, trituradores, sedimentador primario, espesadores y filtración.^{74, 75}
- **Proceso químico:** Es necesaria la aplicación de productos químicos para efectuar la eliminación de los contaminantes presentes en el agua, se utiliza para los procesos de precipitación, adsorción y desinfección.^{74, 75}
- **Proceso biológico:** Este se da utilizando la actividad biológica de distintos microorganismos donde se efectúa la eliminación de sustancias orgánicas biodegradables presentes generando el consumo de nitrógeno y fósforo para que se dé la producción de gases.^{74, 75}

De igual manera se puede clasificar según el grado de tratamiento, debido a que las aguas residuales contienen contaminantes variados ya sea en tamaño con en composición, es necesario realizar diferentes procesos de limpieza iniciando con el más simplificado hasta llegar al más complejo que se centre en fines muy específicos, por lo tanto, los tipos de tratamiento que se dan son:^{72, 73}

- **Tratamiento preliminar:** Su objetivo es remover sólidos gruesos, grandes y abrasivos que floten o se encuentren suspendidos en el agua. Las estructuras de tratamiento que se utilizan en este tratamiento son rejillas o tamices, desarenadores, tanques de igualación u homogeneización, trituradores de canal.^{72,73}
- **Tratamiento primario:** Su función es limpiar el agua de partículas de gran tamaño, se encamina hacia la remoción de sólidos sedimentables o materiales flotantes ya sea por medios físicos o químicos. Se encarga de remover los sólidos en suspensión (SST), las estructuras utilizadas en este proceso son sedimentadores, tanques de flotación, separadores por gravedad, floculación o coagulación.^{72, 73}
- **Tratamientos secundarios:** Permite remover la materia orgánica soluble mediante procesos bioquímicos por medio de la acción metabólica de microorganismos, en esta se reduce la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y los sólidos suspendidos (SST), junto con pequeñas cantidades de nitrógeno, fósforo, metales pesados y bacterias patógenas.^{72, 73}
 - **Sistema aeróbico:** En presencia de un alto contenido de oxígeno los microorganismos degradan la porción orgánica de los desechos a dióxido de carbono y agua en presencia de oxígeno. El ambiente aerobio se logra mediante aireación difusa o mecánica en un tanque de aireación.^{72, 73}

- **Sistema anaeróbico:** Este sistema que se da bajo condiciones nulas de oxígeno, reduce DQO, DBO y SSV dando como resultado la producción de biogás, calor y una poca cantidad de biomasa.^{72, 73}

- **Tratamiento terciario:** Para este tipo de tratamiento se realizan procesos más complejos de carácter fisicoquímico y biológico, se realiza para remover contaminantes concretos como fósforo, nitrógeno, minerales, metales pesados y más compuestos orgánicos e inorgánicos, debido a su complejidad se da para purificar los desechos de algunas industrias, para este se utilizan métodos como la filtración con arena, carbón activado, desinfección, sistemas de membranas, entre otros. Los lodos resultantes de este proceso de descontaminación son de alto riesgo para el ambiente y la salud, por lo tanto, es una prioridad considerar un buen manejo, aprovechamiento y una disposición controlada.^{72, 73}

2.4 Vertimientos farmacéuticos

Las empresas farmacéuticas producen diversos tipos de medicamentos, estas compañías descargan tanto aguas residuales de producción como doméstica. Para la protección del agua y del medio ambiente estas aguas deben ser tratadas para poder ser depositadas ya sea en aguas superficiales o para ser reutilizadas, una de las principales características es que estas aguas suelen ser ácidas, contienen compuestos orgánicos y sólidos totales.⁴⁵

Debido a limitaciones analíticas y a la ineficiencia de las técnicas para eliminar totalmente estos tipos de contaminantes, existe la presencia de bajas concentraciones de medicamentos en aguas efluentes, por lo que no son detectados y se dificulta su eliminación óptima, al encontrarse en baja concentración aparentan poco riesgo para la salud, pero, muchos de ellos fueron diseñados para traspasar las membranas celulares y se activan en baja concentración. La regulación de los metabolitos de los fármacos es escasa debido al desconocimiento de sus efectos y la falta de un registro con todas las especies químicas que se puedan encontrar en el ambiente.^{46, 47}

Los compuestos farmacéuticos tienen efectos adversos en el ecosistema como: una fuente de contaminación orgánica; afecta procesos biológicos por los antibióticos y desinfectantes; tiene efectos tóxicos debido a que se bioacumulan como estrogénicos, genotóxicos, cancerígenos, teratogénicos y resistencia antibiótica.^{46, 47}

Dentro de todos los fármacos que se pueden hallar, los más comúnmente encontrados en ambientes acuáticos (ríos, lagunas, residuales) son: analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos β -bloqueantes, reguladores de lípidos, medio de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides, broncodilatadores, tranquilizantes, etc.^{46, 47}

2.5 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso fermentativo microbiano en ausencia total o parcial de oxígeno, este proceso da origen a diferentes gases donde los principales son el metano en una proporción de 50% a 70% y dióxido de carbono en una proporción de 30% a 50 %. Además del metano y el carbono se encuentran pequeñas cantidades de otros elementos como el nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y sulfuro de hidrógeno. La digestión anaerobia se presenta en diferentes escenarios de la naturaleza como lo son pantanos, en sedimentos de lagos y mares, en algunas zonas anódicas del suelo, como en fuentes de aguas termales sulfurosas y en tractos digestivos de los rumiantes.¹

Los microorganismos presentes trabajan en grupo con el fin de degradar la materia orgánica en etapas sucesivas donde cada una desencadena la siguiente. Los microorganismos anaerobios obtienen principalmente su energía mediante la utilización de las vías fermentativas, donde los compuestos orgánicos como ácidos y alcoholes sirven como aceptores finales de electrones⁴²

Durante el proceso de degradación de la materia que es dado para conseguir la digestión anaerobia por los diferentes microorganismos que interactúan entre sí, ocurren reacciones metabólicas complejas que se dividen en 4 (ver figura 5):

1. **Hidrólisis:** Es donde ocurre la descomposición biológica de polímeros orgánicos en moléculas más simples como monómeros y dímeros para que puedan atravesar la membrana celular, este proceso lo realizan enzimas denominadas hidrolasas que rompen enlaces específicos con ayuda de agua para que puedan ser utilizadas.⁴²

En la degradación anaerobia frecuentemente se da en polímeros como celulosa y hemicelulosa, donde actúa la enzima celulasa la cual tiene tres tipos: endocelulasa, que rompe los enlaces 1,4- β glucosídicos internos del polímero; exocelulasas, encargadas de romper los enlaces 1,4- β glucosídicos de los polímeros reducido por las endocelulasas para obtener tetrámeros o dímeros y al final, las celobiasas o β glucosidasas, quienes hidrolizan las moléculas resultantes de la anterior hidrólisis en dos moléculas de glucosa.⁴²

2. **Fermentación:** Incluye diversos microorganismos y procesos donde se genera menos energía en comparación con los aerobios, y es por esto, que utilizan mayor cantidad de azúcares generando mayor cantidad de metabolitos, donde durante el proceso de producción de metabolito los productos finales son sustancias orgánicas como por ejemplo: ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, butanol, etanol, acetona, hidrogeno y dióxido de carbono, donde los ácidos grasos volátiles son importantes intermediarios para la eficiencia de la metanogénesis.⁴²

En seguida se explica los diferentes tipos de fermentación en los que participan las bacterias:

- **Fermentación alcohólica:** Es un proceso que se da en ausencia de O_2 , donde se produce etanol y CO_2 en forma de gas y moléculas de ATP, obteniendo energía, a partir de hidratos de carbono como la glucosa, la fructosa y la sacarosa.⁴²

- **Fermentación heteroláctica:** Su producto final no solo es ácido láctico como ocurre en la fermentación homoláctica, en esta se pueden obtener otros productos como el ácido acético y ácido fórmico, también se puede obtener en pequeñas cantidades CO₂ y ácido succínico.⁴²
- **Fermentación acetona butanol:** En esta fermentación se obtiene butanol, etanol, acetona e isopropanol, este proceso metabólico se da en dos diferentes fases que se conoce como fase de acidogénesis y fase de solventogénesis, donde en la primera hay formación de ácido acético, butírico y ATP, ya en la segunda fase los ácidos son asimilados y aparecen metabolitos secundarios como acetona-butanol-etanol.⁴²
- **Fermentación propiónico:** Sus productos finales son ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico y dióxido de carbono. Utilizando el ácido láctico, polialcoholes, aminoácidos, glucosa, glicerol y otros ácidos orgánicos como sustrato.⁴²

La fermentación propiónico de la hexosa se hace de dos formas

Hexosas → ácido láctico → ácido propiónico

Hexosas → ácido pirúvico → ácido propiónico

- **Fermentación ácido butírico:** Se obtienen como productos finales etanol, acetato, butirato, butanol, acetona e isopropanol ya se a partir de un hidrato de carbono o de aminoácidos como la alanina y la glicina.⁴²
3. **Acetogénesis:** En esta fase, los ácidos orgánicos volátiles se convierten en ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Puede ser producido por dos mecanismos diferentes: acetogénesis por hidrogenación, donde se produce acetato como producto de la reducción de dióxido de carbono más hidrógeno y, la acetogénesis por deshidrogenación, donde las bacterias

sólo sobreviven en asociación con microorganismos que consumen el hidrógeno como las bacterias homoacetogénicas y bacterias sulfato reductoras.⁴²

Las bacterias homoacetogénicas son anaerobios estrictos que catalizan la formación de acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono, donde la reducción del CO₂ se da por la ruta del Acetil CoA, luego, ocurre un proceso de fermentación para producir acetato como producto final.⁴²

4. **Metanogénesis:** Es la última etapa de la digestión anaerobia, el metano se puede producir a través de dos rutas principalmente: la acetoclásica donde el principal sustrato usado por los microorganismos es el acetato, esta vía aporta 70% del metano producido, y la hidrogenotrófica en donde los microorganismos utilizan el hidrógeno y el dióxido de carbono como sustratos obteniendo del 27 al 30 %de metano. Las bacterias que pertenecen a esta fase tiene la capacidad de convertir sustratos monocarbonados o con átomos de carbono unidos por un enlace covalente como el acetato, el hidrógeno, el dióxido de carbono, formiato, metanol y algunas metilaminas. La metanogénesis también puede ocurrir a partir de ácidos orgánicos y alcoholes, el metano obtenido puede ser utilizado como sustrato de microorganismos como los aerobios estrictos.⁴²

2.6 Reactores UASB

El tratamiento anaerobio ha sido ampliamente usado para el tratamiento de aguas residuales de diversos tipos de industrias como destilerías, tenerías, textil y de alimentos. El reactor de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente, más conocido como UASB, se utiliza para tratar diferentes tipos de aguas residuales de origen industrial, esto, debido a su efectividad con aguas residuales con alta carga orgánica y sus ventajas económicas.⁴⁴

El reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) inicialmente se inocula con cantidad suficiente de lodo anaerobio y se comienza a alimentar a velocidades de carga baja en flujo ascendente, este periodo siendo el más importante de la

operación del reactor se denomina **puesta en marcha del sistema**. La velocidad de carga del sistema debe aumentarse de forma continua acorde con la respuesta favorable del sistema. Después de varios meses un **lecho de lodo** altamente concentrado (40 a 100 g Sólidos Totales/L) se desarrolla en el fondo del reactor, este lodo es muy denso, con características de sedimentación, puede ocurrir el desarrollo de lodo granular (diámetro de 1 a 5 mm) dependiendo del lodo inoculado, de las características del agua residual y las condiciones en que opere el reactor.

Sobre el lecho de lodo se genera un área de crecimiento bacteriano con sólidos y baja velocidad de sedimentación, la concentración del lodo en esta área está entre 1 al 3 %, el sistema se encuentra en constante agitación, esto por el movimiento ascendente de las burbujas de biogás y al flujo de la alimentación (influyente) a través del reactor.⁴⁴

El lodo es arrastrado por el movimiento ascendente de las burbujas de gas por lo que se usa un separador de tres fases (sólido, líquido, gas) en la parte superior del reactor donde existe una zona de sedimentación donde el lodo más pesado se elimina de la materia líquida y se devuelve al compartimiento de digestión y las partículas más ligeras abandonan el sistema junto con el efluente final.⁴⁴

El separador de fases asegura la devolución de lodo y la alta capacidad de retención de gran cantidad de biomasa activa sin usar ningún tipo de material de soporte, por lo tanto, estos reactores tienen elevados tiempos de residencia de lodos (edad de lodo), normalmente puede superar los 30 días, permitiendo que se estabilice del exceso de lodo eliminado del sistema.⁴⁴

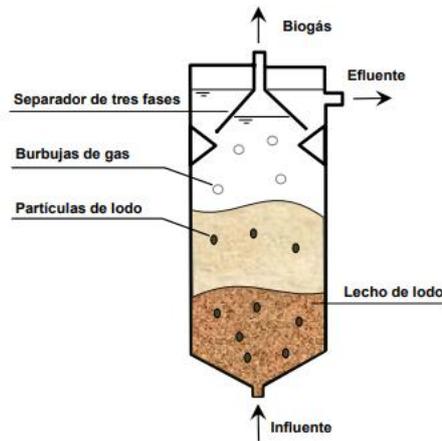


Figura 4. Dibujo esquemático de un reactor UASB
 Fuente: Veiga Barbazán, M. Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB).⁴⁴

La mayoría de estos reactores a gran escala se utilizan para tratar aguas agroindustriales, y su uso para tratar agua residual de industrias químicas y aguas fecales va en aumento, las ventajas principales del uso de reactores UASB son:

- Sistema compacto, con bajos requerimientos de espacio
- Bajos costes de construcción y operación
- Baja producción de lodos
- Bajo consumo energético (solamente para el bombeo del influente, si es necesario)
- Buenas eficacias de eliminación de materia orgánica, entre el 65 y 75%
- El lodo en exceso presenta una concentración elevada y buenas características de deshidratación

Los reactores UASB también presentan desventajas y limitaciones como:

- Tiempo necesario para la puesta en marcha del sistema elevado, puede ser lenta (4 a 6 meses)
- Necesidad de una etapa de post-tratamiento.⁴⁴

2.7 Lodos

Un lodo se define como “Suspensión de un sólido en un líquido proveniente de tratamiento de aguas, residuos líquidos u otros similares” (Ministerio de Ambiente,

Dec. 3930, 2010), contienen gran cantidad de materia orgánica, microorganismos, macro y micronutrientes y en su mayor parte, agua, contiene gran cantidad de materias en suspensión y compuestos orgánicos, este puede ser extraído directamente de fuentes naturales como lo son sedimentos de laguna, laguna anaerobia junto con estiércol fresco o digerido, también puede ser utilizado el material sólido que queda después del tratamiento de aguas ya sea primario, secundario o terciario de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR), estos lodos suelen tener buenas características para su aprovechamiento, pueden ser de tipo granular, domésticos digeridos o extraídos de una fosa séptica. Hay que tener en cuenta que los lodos son clasificados en tres categorías donde están: Los lodos aprovechables, no aprovechables y peligrosos.⁷⁶

Lodos aprovechables: Son todos aquellos que provienen de aquel proceso de tratamiento y que tiene la cualidad de poder ser reutilizado como reciclaje, compostaje y generación de energía. Principalmente son lodos provenientes de procesos de tratamiento aerobio como anaerobio de plantas de tratamiento de aguas residuales que cumplen luego con la opción de ser usados como abono, acondicionadores, restauradores de suelos o productores de energía.²⁶

Lodos no aprovechables: Son lodos que no tienen ninguna característica de tipo aceptable para su uso en procesos de renovación o generación de energía, ya que por lo general su nivel de carga orgánica puede ser poca o nula.²⁶

Lodos peligrosos: En este caso se encuentran aquellos lodos que en su composición poseen sustancias que causan daño directamente sobre el medio ambiente o los seres vivos, por lo general estos deben ser desechados en condiciones adecuadas de seguridad.²⁶

Características físico-químicas del lodo crudo: Es importante realizar un control de medición de las cualidades químicas del lodo crudo que va dirigido al proceso de digestión anaerobia como lo es la medición de pH, de la alcalinidad y del contenido de ácidos orgánicos, así mismo determinar el contenido de metales

pesados, pesticidas e hidrocarburos como a su vez el contenido energético (térmico) del lodo.

De acuerdo a ello la *Tabla 3* refleja la composición química típica de los lodos crudos y digeridos.²⁶

Características	Fango primario crudo		Fango primario digerido		Fango activado intervalo
	Intervalo	Valor típico	Intervalo	Valor típico	
Sólidos secos totales (ST) %	2,0-8,0	5,0	6,0-12,0	10,0	0,83-1,16
Sólidos volátiles (%ST)	60-80	65	30-60	40	59-88
Grasas y aceites (%ST)					
Solubles en éter	6-30	-	5-20	18	-
Extractable en éter	7-35	-	-	-	5-12
Proteínas (%ST)	20-30	25	15-20	18	32-41
Nitrógeno (N, %ST)	1,5-4	2,5	1,6-6,0	3,0	2,4-5,0
Fósforo (P2O5, %ST)	0,8-2,8	1,6	1,5-4,0	2,5	2,8-11,0
Potasio (K2O, %ST)	0-1	0,4	0,0-3,0	1,0	0,5-0,7
Celulosa (%ST)	8,0-15,0	10,0	8,0-15,0	10,0	-
Hierro (no como sulfuro)	2,0-4,0	2,5	3,0-8,0	4,0	-
Sílice (SiO2, %ST)	15,0-20,0	-	10,0-20,0	-	-
pH	5,0-8,0	6,0	6,5-7,5	7,0	6,5-8,0
Alcalinidad (Mg/l como CaCO3)	500-1.500	600	2.500-3.500	3.000	580-1.100
Ácidos orgánicos (Mg/l como HAc)	200-2.000	500	100-600	200	1.100-1.700
Poder caloríficoE (MJ/kg)	23.000-29.000	25.500	9.000-13.500	11.500	18.500-23.000

Tabla 3. Composición química típica del lodo crudo y digerido

Fuente: Tchobanoglous G, Burton F. Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 1st ed. New York: Copyright © 2007 by Metcalf & Eddy, Inc.; 2007.²⁶

Tomando en cuenta el tratamiento de aguas residuales y de acuerdo al tipo de planta de tratamiento, durante las etapas de tratamiento primario y secundario se generan los siguientes tipos de lodos:²⁷

Lodos primarios: Son producidos a partir de la primera etapa de tratamiento o sedimentación, donde cuyo objetivo es remover sólidos sedimentables, donde la cantidad de lodo en producción va a depender de la carga superficial o el tiempo hidráulico de retención. por otro lado, cuando esta etapa de tratamiento primario es tratada con químicos se da la producción de mayor cantidad de lodo dada por una mayor remoción y precipitación química de la materia coloidal.²⁶

Lodos secundarios: Este tipo de lodo es producido en aquellos procesos de tratamiento biológicos en los cuales se convierten los residuos en biomasa, también se pueden incluir aquella materia que permanece en el agua posteriormente a la sedimentación primaria dada en la primera etapa de tratamiento.²⁶

Para su producción se deben tener en cuenta distintos factores que influyen en su cantidad como lo son: remoción de nutrientes, cantidad de sustrato, la eficiencia que se da en el tratamiento primario, y la relación de SST (Sólidos Suspendedos Totales) a DBO (Demanda biológica de oxígeno). Este tipo de lodos son producidos en reactores biológicos y son separados del agua en la etapa secundaria de tratamiento.²⁶

Lodos terciarios: Se producen después de procesos de tratamiento con agentes floculantes.²⁶

Lodos activados: Procesos de tratamiento biológico de aguas residuales en ambiente aerobio, donde las aguas residuales son aireadas en un tanque que contiene una alta concentración de microorganismos degradadores.²⁶

A continuación, se presenta la composición química de lodos producidos y tratados en las etapas de tratamiento.²⁶

Parámetros	Lodos primarios	Lodos secundarios (mezcla)	Lodos digeridos
pH	5,5 - 6,5	6,5 - 7,5	6,8 - 7,6
Contenido de agua (%)	92 - 96	97,5 - 98	94 - 97
ssv (%sst)	70 - 80	80 - 90	55 - 65
Grasas (%sst)	12 - 14	3 - 5	4 - 12
Proteínas (%ss)	4 - 14	20 - 30	10 - 20
Carbohidratos (%ss)	8 - 10	6 - 8	5 - 8
Nitrógeno (%ss)	2 - 5	1 - 6	3 - 7
Fósforo (%ss)	0,5 - 1,5	1,5 - 2,5	0,5 - 1,5
Bacterias patógenas (NMP/100 ml)	$10^3 - 10^5$	100 - 1000	10 - 100
Metales pesados (%ss) (Zn, Cu, Pb)	0,2 - 2	0,2 - 2	0,2 - 2

Tabla 4. Composición química de lodos obtenidos de las etapas de tratamiento
Fuente: Tchobanoglous G, Burton F. Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 1st ed. New York: Copyright © 2007 by Metcalf & Eddy, Inc.; 2007.²⁶

Lodos metanogénicos: Este tipo de lodo tiene características que van desde su color marrón oscuro - negro y contiene una gran cantidad de gas.

A continuación, se presenta las principales propiedades de los lodos granulares presentes en reactores de UASB de alta carga.

CARACTERÍSTICA	INTERVALO
Densidad (kg/m ³)	1028 a 1082
Relación SSV/SST	0.45 a 0.90
Velocidad media de sedimentación (m/h)	53 a 100

Diámetro medio de gránulos (mm)	0.8 a 2.2
Actividad metanogénica (gDQO-CH ⁴ /gSSV/d)	0.2 a 1.9

Tabla 5. Propiedades de lodo granular

Fuente: Díaz-Báez M, Espitia S, Molina F. Digestión anaerobia. Bogotá, D.C. Universidad Nacional de Colombia; 2002.¹

2.8 Muestreo

Para realizar la toma de muestra de lodo principal a tener en cuenta es mantener condiciones anaerobias debido a que es la característica principal para la conservación de la biodiversidad microbiana presente bajo estas cualidades, ya que el oxígeno afecta sustancialmente la prevalencia de los microorganismos a analizar, debe ser tomado en recipientes limpios y estériles, idealmente se debe recoger la muestra aproximadamente a 15 a 40 cm por debajo de la superficie, tomando la muestra compuesta a partir de alícuotas de lodo de diferentes puntos de la zona de muestreo, el transporte de la muestra debe ser bajo refrigeración, idealmente mantenerla a 4°C hasta el momento de ser procesada.¹

En el caso para la toma de muestra de lodo en reactores de lecho suspendido, es decir, UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) el procedimiento es realizado extrayendo la cantidad de lodo que es necesaria a través de las válvulas de drenaje que tiene el sistema del reactor, manteniendo las condiciones de anaerobiosis y refrigeración mencionadas anteriormente.¹

Es importante determinar si el inóculo de lodo tiene una alta actividad metanogénica y para esto la caracterización microbiológica es fundamental, gracias a esto se puede identificar y seleccionar potenciales inóculos para reactores anaerobios, por lo tanto, es ideal realizar una verificación microscópica de la morfología de los microorganismos presentes en la muestra por medio de un Gram directo, otro criterio que debe ser analizado es la relación de los microorganismos con el oxígeno y así determinar su clasificación ya sea como aerobios obligados, anaerobios obligados, anaerobios aerotolerantes, anaerobio facultativo y microaerófilo; de igual manera las características fisicoquímicas que se evalúan para determinar la calidad del lodo a analizar son densidad, relación

SSV/SST, velocidad media de sedimentación, DQO, diámetro medio de gránulos junto con la determinación de actividad metanogénica específica, gracias a esto se podrá determinar si la biomasa presente en la muestra posee o no la capacidad de convertir la materia orgánica en metano y si esta es suficiente para ser aplicado como inóculo para las plantas de tratamiento.⁵

2.9 Evaluación fisicoquímica de lodos

- **pH**

El pH es una medida que representa la acidez o la alcalinidad de una sustancia de forma numérica que expresa las concentraciones de iones de H⁺ libres.¹

- **Granulometría**

El tratamiento anaerobio de residuos líquidos en reactores de lecho suspendido, tiene como fundamento el lograr la formación de gránulos que tengan velocidad de sedimentación alta y actividad metanogénica notable. Los gránulos evolucionan con el tiempo y dependen de la operación del reactor y del estado en que se encuentre el mismo, es decir en la fase de arranque o en la estable. La determinación del tamaño de los gránulos permite establecer sus cambios durante un proceso de granulación y, además, permite identificar la homogeneidad o heterogeneidad de los gránulos del lodo con respecto a su tamaño.¹

- **DQO**

Se realiza para evaluar la tasa de remoción de la materia orgánica por medio de la oxidación de esta, para este proceso se utilizó el Test en cubetas DQO de la marca Merck Millipore, esto sucede con una solución sulfúrica caliente de dicromato potásico y sulfato de plata como catalizador. Los cloruros son enmascarados con sulfato de mercurio.¹

- **Ácidos Grasos Volátiles (AGV)**

Los Ácidos Grasos Volátiles son compuestos de cadena carbonada corta tales como el Ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico, entre otros, que son implementados principalmente para la producción

de energía tanto en individuos de carácter pluricelular como lo son los rumiantes como individuos de carácter unicelular tales como los microorganismos que componen los consorcios microbianos encargados en la degradación de materia orgánica a metano. ⁴⁹

- **Sólidos**

Los sólidos hacen referencia al material suspendido en el agua ya sea de carácter residual o natural, encontramos principalmente los sólidos solubles totales (SST) y los sólidos solubles volátiles (SSV) y son esenciales para la caracterización de lodos metanogénicos. Para ellos se implementa la técnica de incineración de las muestras en estudio a 550 °C donde se evaluará el peso obtenido antes y después del procedimiento, dando como resultado la obtención de los SSV y los SST al restar el peso inicial del lodo con el final, la diferencia obtenida hará referencia a los sólidos solubles volátiles (SSV), mientras que el peso obtenido al incinerar la muestra hará referencia a los sólidos solubles totales (SST). ¹

2.10 Microorganismos implicados en digestión anaerobia

Las bacterias para la realización óptima de estos procesos están condicionadas por ciertos factores físicos y químicos como son: materia orgánica, ácidos grasos volátiles, temperatura, pH, nutrientes, presencia de elementos como el nitrógeno, fósforo, azufre, carbono, entre otros. A continuación, se presenta el proceso gráfico (figura 5) de las principales etapas de la digestión anaerobia y aquellos grupos bacterianos que se encuentran involucrados durante el proceso. ¹

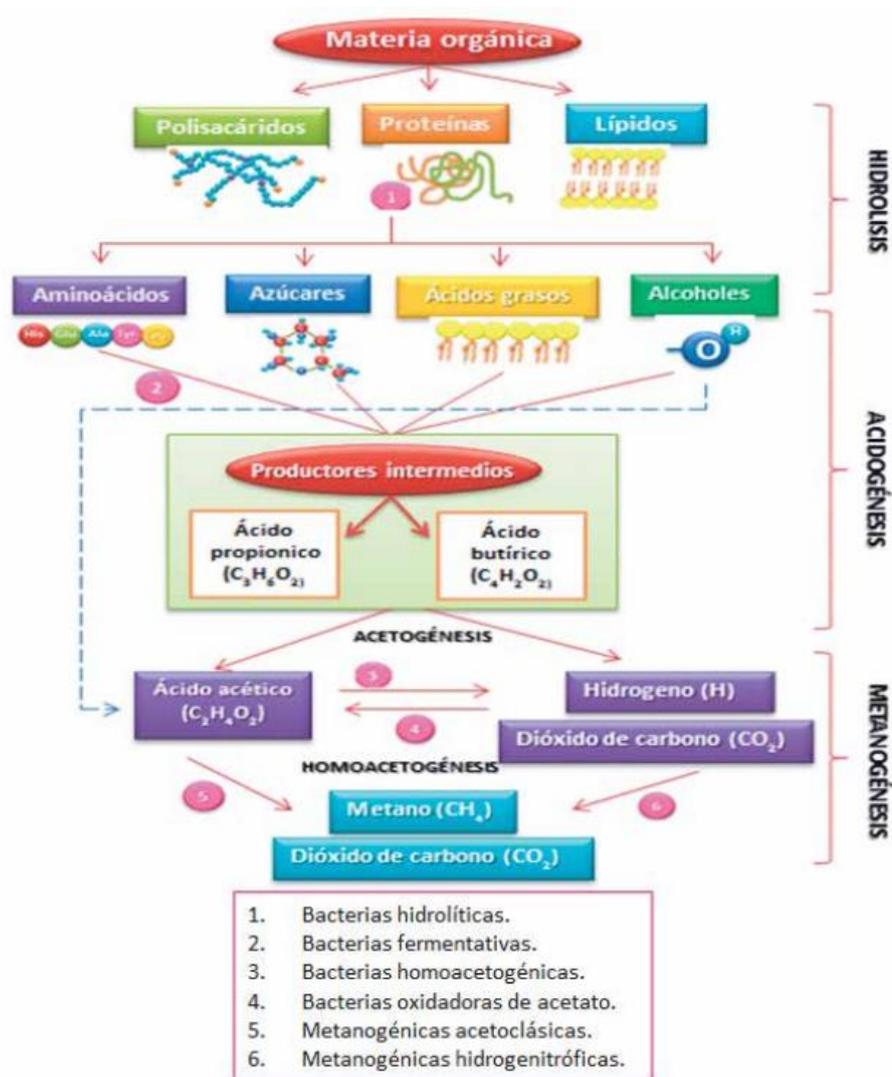


Figura 5. Etapas principales de la digestión anaerobia

Fuente: Corrales, L., Antolinez Romero, D., Bohórquez Macías, J. and Corredor Vargas, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), p.55.³⁷

La digestión anaerobia es un proceso complejo de carácter fermentativo llevado a cabo por microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos que son característicos de ambientes con bajas concentraciones de oxígeno como pantanos, animales rumiantes, lechos marinos, lechos de biorreactores anaerobios, entre otros.³⁷ Se han descrito gran variedad de microorganismos implicados en los consorcios microbianos que realizan procesos metabólicos consecutivos para degradar la materia orgánica a biogás tales como: *Lactobacilos*, *Spirillum*, *Klebsiella*, *Actinomyces*, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sarcina*, *Aerobacter* las cuales son bacterias anaerobias facultativas; por otro lado encontramos bacterias anaerobia estrictas

tales como: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Sphaerophorus*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Peptococcus*, *Desulfovibrio*, entre otros. Por último, encontramos a las Arqueas las cuales son la población más importante y determinante en la digestión anaerobia, ya que son microorganismos extremadamente sensibles al oxígeno y producen como resultado final de su metabolismo metano dando como resultado la obtención del biogás; algunos de sus principales representantes son: *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter* y *Methanomicrobium*. Por tal biodiversidad se han identificado diferentes factores determinantes para su crecimiento tales como rangos de pH, temperatura, sustratos y sustancias inhibitorias.^{1, 37, 38}

Para que se dé el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica presente en aguas residuales, existe la intervención de diversos grupos de bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas las cuales utilizan de forma secuencial aquellos productos metabólicos que se van generando a través del proceso por cada grupo de bacterias como se puede ver en la *Figura 5*, esta degradación anaerobia de compuestos orgánicos involucra tres grupos tróficos:¹

- Grupo I: bacterias hidrolíticas y fermentativas
- Grupo II: bacterias acetogénicas.
- Grupo III: bacterias metanogénicas.

Grupo I: Bacterias fermentativas - hidrolíticas

Este grupo pertenecen aquellos microorganismos que tienen la capacidad de hidrolizar o romper moléculas de polisacáridos, proteínas y grasas con el objetivo de transformarlos en compuestos simples como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. Las bacterias que integran este proceso de reacciones son del tipo anaerobias facultativas y entre ellas podemos encontrar los siguientes géneros bacterianos más frecuentes que llevan a cabo esta reacción como lo son los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como también los géneros: *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium*.^{1,3,39}

Grupo II: Bacterias acetogénicas

Para que el proceso de la metanogénesis sea eficiente, los productos obtenidos de la fermentación como lo es el propionato y el butirato deben ser oxidados a acetato, CO_2 , e hidrógeno. Como tal la oxidación está dada por un grupo denominado de organismos acetógenos productores obligados de hidrógeno (OHPA, *Obligate Hydrogen Producing Acetogens*), dado procedimiento es conocido como “acetogénesis” .¹ Encontramos bacterias representantes en esta etapa como lo son: *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolini* que son capaces de transformar los productos de la fermentación en productos más sencillos, como el acetato (CH_3COO^-) e hidrógeno (H_2).³⁹

En este grupo se encuentran un tipo especial de microorganismos acetogénicas, que son también conocidos como homoacetogénicos, ya que son capaces de crecer en presencia de azúcares o compuestos de tipo monocarbonatados, generando como único producto de metabolismo el acetato, éstas no tienen la función de producir hidrógeno como resultado de su metabolismo, sino que lo consumen como sustrato. Los pioneros microorganismos homoacetogénicos que se han logrado aislar son: *Acetobacterium woodii* o *Clostridium aceticum*.^{1,3,39}

Grupo III: Bacterias metanogénicas

Para esta etapa, se encuentra un amplio grupo de bacterias anaerobias estrictas, donde van actuar directamente en los productos resultantes de las dos etapas anteriores, tomando en cuenta que van a ser estos microorganismos los que van a tener la capacidad metanogénica y de tal forma los más importantes dentro del consorcio anaerobio puesto que su capacidad de formar metano sumado a eliminar del medio los productos de los grupos anteriores culminan el proceso de digestión anaerobia.³⁹

Los microorganismos metanogénicos presentes en esta etapa son clasificados dentro del dominio Archaea y, por lo tanto, tienen características comunes que los diferencian del resto de procariontes. En este grupo de microorganismos se encuentra una división, en función del sustrato principal que metabolizan.

- Hidrógenotróficos: Son los que usan en su metabolismo el consumo de hidrógeno junto al dióxido de carbono y ácido fórmico.
- Acetoclásicos: Tienen la capacidad de consumir el acetato, metanol y algunas aminos, donde en estudios se ha demostrado que un 70% del metano producido en los reactores anaeróbicos es formado a través de la descarboxilación de ácido acético, donde solo dos microorganismos se han encontrado con esta capacidad de utilizar el acetato los cuales son *Methanosarcina* y *Methanotherix*.

En la *Tabla 6*, se evidencia las bacterias que participan en el proceso de fermentación durante las diferentes etapas, donde las especies *Acetobacter* y *Eubacterium* tienen una participación similar durante el proceso.³⁹

Taxonomía	Especies	Descripción	Metabolismo
Género: <i>Acetobacterium</i>	<i>A. woodii</i> <i>B. paludosum</i>	El género <i>Acetobacter</i> comprenden un grupo de bacilos Gram negativos, móviles que realizan una oxidación incompleta de alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales.	Reducen autotroficamente compuestos poliméricos, oligómeros, monómeros y CO ₂ , utilizando el hidrógeno como fuente de electrones. Estos microorganismos hacen posible la descomposición de los ácidos grasos y compuestos aromáticos.
Género: <i>Eubacterium</i>	<i>E. rectale</i> <i>E. siraeum</i> <i>E. plautii</i> <i>E. cylindroides</i> <i>E. brachy</i> <i>E. desmolans</i> <i>E. callandrei</i> <i>E. limosum</i>	El género <i>Eubacterium</i> consiste en un grupo de bacterias anaeróbicas obligadas Gram - positivas.	La mayoría de las Eubacteria sacarolíticas producen butirato como el principal producto de su metabolismo. Muchas especies

			son capaces de descomponer sustratos complejos a través de mecanismos especiales. Algunas especies se desarrollan autotróficamente, por lo tanto, son capaces de cumplir funciones específicas en la descomposición anaeróbica.
--	--	--	---

Tabla 6. Bacterias involucradas en el proceso de fermentación durante las etapas de fermentación.
Fuente: MANUAL DE BIOGÁS. (2011). [evos] Santiago de Chile: Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables”. Available at: <http://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf> [Accessed 8 May 2019].³⁹

A continuación, se presenta la tabla que evidencia los microorganismos involucrados en cada una de las fases del proceso de digestión anaerobia.

	HIDRÓLISIS	ACIDOGÉNESIS	ACETOGÉNESIS	METANOGENÉNESIS
M I C R O R G A N I S M O S	- <i>Bacteroides</i>	- <i>Clostridium</i>	- <i>Clostridium aceticum</i>	- <i>Methanobacterium</i>
	- <i>Lactobacillus</i>	- <i>Paenibacillus</i>	- <i>Clostridium formicoaceticum</i>	- <i>Methanospirillum hungatii</i>
	- <i>Propionibacterium</i>	- <i>Ruminococcus</i>	- <i>Acetobacterium woodii</i>	- <i>Methanosarcina</i>
	- <i>Sphingomonas</i>		- <i>Syntrophobacter woolinii</i>	- <i>Methanococci</i>
	- <i>Sporobacterium</i>		- <i>Syntrophomonas wolfei</i>	- <i>Methanopyri</i>
	- <i>Megasphaera</i>			
	- <i>Bifidobacterium</i>			
	- <i>Peptostreptococcus</i>			
	- <i>Micrococcus</i>			

Tabla 7. Microorganismos presentes en cada etapa de digestión anaeróbica
Fuente: Elaborado por los autores

2.11 Factores que afectan el proceso de digestión anaerobia

pH: Es un factor determinante en el crecimiento microbiano puesto que cambios bruscos de este genera afección de la membrana celular y al transporte de solutos de carácter intra y extracelular, y a su vez inhibiendo enzimas. Se han descrito diferentes microorganismos capaces de sobrevivir en diferentes rangos de pH, entre los cuales encontramos microorganismos acidófilos los cuales puede sobrevivir en rangos de pH de 1.1 a 5.5 como: *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium bifidum*. En un rango de pH entre 5.5 y 8.0 encontramos a los microorganismos neutrófilos tales como: *Clostridium perfringens*, *Methanococcus sp*, *Methanobacterium sp*, y *Propionibacterium acidipropionici*. Por último, están los microorganismos alcalófilos que comprenden un rango de pH entre 8.5 y 11.5 entre los cuales está *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Fusobacterium spp* y *Micrococcus spp*.^{1, 13, 37, 38}

Temperatura: La temperatura al igual que el pH es otro factor determinante y crítico en cuanto al crecimiento y desarrollo bacteriano pues una disminución o aumento brusco del mismo genera afecciones graves en las bacterias tales como desnaturalización e inactivación de enzimáticas esenciales, colapsamiento de la membrana citoplásmica y en ocasiones lisis térmica de la bacteria. Se han descrito 5 rangos de temperatura en los que pueden crecer los microorganismos, los Psicrófilos (*Bacillus spp*), Psicrótrofos (*Clostridium spp*), Mesófilos (*Clostridium spp*, *Methanococcus spp*, *Methanobacterium spp*), Termótrofos (*Methanococcus spp*, *Methanobacterium spp*) y Termófilos (*Clostridium spp*, *Lactobacillus spp*, *Thermus spp*, *Thermococcus spp*) los cuales poseen rangos entre 10-15 °C, 20-30 °C, 30-36 °C, 42-46 °C y 50-80 °C respectivamente.^{1, 13, 37, 38}

Toxicidad anaerobia: La toxicidad anaerobia es expresada al apreciarse una disminución en la producción de metano y biogás provenientes del consorcio microbiano, en especial de la población metanogénica, a causa de agentes tóxicos de diferentes procedencias, tales como compuestos químicos resultantes de procedimientos industriales en el agua residual a tratar tales como antibióticos, metales pesados, fenoles, tiosulfatos, tiocianatos, cianuros, agentes oxidantes

fuerzas como cromatos y cloro, tensoactivos aniónicos, pesticidas y sales, entre otros, generando así la inhibición de enzimas intra y extracelulares implicadas en el proceso metabólico de diversas poblaciones del consorcio microbiano.^{1, 13, 37, 38}

2.12 Aislamiento e identificación de microorganismos en digestión anaerobia

Para el aislamiento e identificación de los microorganismos participantes dentro del consorcio microbiano existen diferentes métodos, entre los cuales encontramos el número más probable (NMP), esta técnica requiere de la implementación de agares específicos que permitan el crecimiento de las poblaciones que se desean aislar e identificar, posteriormente deben implementarse agares aún más específicos y sensibles para la detección del género y posibles especies que puedan encontrarse dentro de los grupos anteriormente aislados. Para ello se plantea la utilización de la siembra a profundidad en placa con un posterior gaseo de los agares con Nitrógeno para poder así evitar contaminación por otros microorganismos, posteriormente debe ser incubada bajo condiciones de temperatura específicas, ya que los géneros y especies dentro de estos consorcios pueden variar de manera significativa según las condiciones tales como temperatura, pH, fuentes de energía proporcionadas, entre otros; además deben incubarse estrictamente bajo CO₂. Este método presenta varias limitaciones tales como la determinación de nuevos microorganismos que puedan estar haciendo parte de los consorcios en estudio, puesto que estos consorcios pueden variar de manera significativa a causa de las condiciones que presenta el ecosistema de donde fueran recuperados, dando como resultado selectividad y superioridad de algunas especies o géneros sobre otros.^{1, 3}

Otro de los métodos implementados es el aislamiento e identificación de microorganismos implementando métodos semicuantitativos tales como la implementación de métodos semiautomatizados como el BBL Crystal, ya que este permite la identificación por medio de la lectura de diferentes pruebas bioquímicas y posterior análisis cuantitativo según la complementariedad de los resultados con

microorganismos anteriormente analizados y registrados en el sistema o software. Al igual que el método anterior cuenta con la limitación de no poseer en su totalidad medios de cultivo específicos que permitan identificar y aislar a todos los microorganismos del consorcio sin generar exclusiones.^{3, 48}

Para poder superar estas dificultades se han implementado métodos moleculares tales como la amplificación de genes específicos y el análisis de la secuencia de ARNr 16S para poder así proporcionar y facilitar la ubicación taxonómica de los microorganismos pertenecientes al consorcio microbiano. Estos métodos moleculares son actualmente la herramienta mayormente utilizada en estudios puesto que eliminan la posibilidad de excluir integrantes de los consorcios microbianos por no contar con medios específicos y selectivos para cada uno de ellos.^{3, 48}

2.13 Actividad metanogénica específica

La Actividad metanogénica (AME) podemos definirla como aquella máxima capacidad para la producción de metano por diferentes grupos de microorganismos anaerobios, en donde se realiza bajo condiciones controladas de laboratorio que permita la máxima actividad bioquímica de conversión del sustrato orgánico a metano. Cuando se determina la AME en un lodo se logra identificar la capacidad máxima de remoción de DQO de la fase líquida, por ello, se puede estimar la máxima carga orgánica que se puede emplear en un biorreactor y así evitar su desestabilización, a su vez, permite determinar la concentración mínima de biomasa que se puede emplear en el biorreactor para que se pueda obtener una reducción de la carga orgánica que ha sido empleada.⁵

La medición de la AME se realiza por diferentes métodos que parten de diferencias como la concentración de inóculo, tipo y concentración de los nutrientes aplicados como también el tiempo de la incubación. Es por esto que no existen métodos que están completamente estandarizados para lograr obtener replicación y comparación de los resultados obtenidos según las diferentes

metodologías empleadas para la determinación de la AME para el control de procesos anaerobios.⁵

La cuantificación de metano producido se realiza por diferentes metodologías sofisticadas como manometría o cromatografía de gases, y métodos simples como la medición volumétrica.⁵

Formula: $AM = P \times 24 / FC \times V \times SSV$

P= Pendiente de la gráfica en ml CH₄/hora

FC= factor de conversión de DQO a CH₄

V= Volumen del lodo utilizado en el estudio en litros

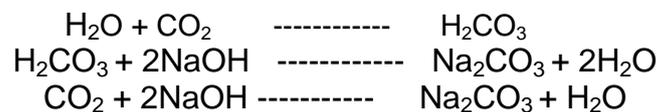
SSV= Concentración de SSV en lodo en gr/L

Método volumétrico para determinación de AME:

- Método de desplazamiento de hidróxido de sodio al 3%

Esta metodología es basada en poder obtener la cuantificación del volumen de metano generado mediante la digestión anaerobia por medio de una sustancia química desplazante, ya sea el NaOH (Hidróxido de sodio) o el KOH (Hidróxido de potasio) ya que por la propiedad de reaccionar con el CO₂ del biogás permite determinar el volumen de metano producido mediante el desplazamiento ejercido biogás-sustancia.⁵

A continuación, se presentan las reacciones químicas ejercidas:



- Medición de AME por cromatografía de gases:

La cromatografía es un método físico en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una fase es estacionaria mientras la otra se

mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración.⁴³

El movimiento de las sustancias durante la cromatografía es el resultado de dos fuerzas oponibles, la fuerza de manejo de la fase móvil y la fuerza resistente o acción de retardo del solvente. La fuerza de manejo mueve las sustancias del origen de la columna en dirección del flujo de la fase móvil. La acción de retardo impide el movimiento de las sustancias arrastrándolas del flujo y adhiriéndolas al adsorbente. Las moléculas se encuentran alternando entre estar pegadas al adsorbente o despegadas en el flujo, esto da como consecuencia que, pese a que el flujo es constante, solo una fracción de las moléculas se están moviendo. Las sustancias que se mueven más lentamente es porque están siendo unidas más fuertemente a la fase estacionaria, mientras que aquellas que se mueven más rápidamente es porque son menos solubles o de poca afinidad.⁴³

- Un cromatógrafo de gases se fundamenta de:

1. Fase móvil.
2. Puerto de inyección.
3. Horno de la columna.
4. Columnas
5. Fase estacionaria.
6. Detector.
7. Sistema de registro de datos.⁴³

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Universo, población, muestra

- **Universo:** Lodos
- **Población:** Lodos de Colombia
- **Muestra:** Lodos de la laguna de Busbanza (Boyacá), del Río Quenane (Villavicencio) y control positivo de empresa farmacéutica
- **Tipo de estudio:** Descriptivo y experimental
- **Enfoque de la investigación:** Cuantitativa y Cualitativa. Mixta

3.2 Hipótesis, variables, indicadores

Hipótesis: Los lodos de la laguna de Busbanzá, Boyacá y el Río Quenane, Villavicencio, Meta tienen actividad metanogénica.

Variables:

- **Dependientes:** producción de gas metano, AME, microorganismos fermentativos e hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos.

Indicadores:

- **Volumen de gas metano:** ml
 - **AME:** gr DQO-CH₄ / gr SSV Día
 - **Bacterias:** hidrolíticas, fermentativas, acetogénicas y metanogénicas.
-
- **Independientes:** Fuente del lodo, tamaño de partícula del lodo, pH, DQO, SST, AGV, temperatura.

Indicadores:

- Volumen del lodo utilizado en el estudio en litros
- Tamaño en mm.
- SSV en mgr/L
- Unidades de pH
- DQO en mg/

3.3 Técnicas y procedimientos:

Fase 1:

Recolección de muestras:

Para la recolección del lodo se debe contar con envases limpios de preferencia estériles con el objetivo de evitar anexar microorganismos impropios a los consorcios microbianos nativos del sitio de muestreo. Se utilizó el protocolo de *Wills et al*, teniendo en cuenta que la profundidad para obtener estos lodos deben

oscilar entre los 15 a 40 cm de profundidad, el empaque en el que se transportaron las muestras de lodo cumplía con las condiciones de esterilidad y limpieza para evitar falsos resultados, se tomaron 1000 ml de muestra fraccionada y no de un solo lugar, se realizaron 10 puntos de muestra para su obtención donde el frasco fue llenado a tope con el objetivo de preservar anaerobiosis y asegurar crecimiento exclusivo de estos microorganismos de interés, para el transporte de la muestra y su conservación se transportó a una temperatura de 4 °C y se mantuvo la cadena de frío hasta su procesamiento en el laboratorio.¹

- **Busbanzá: Latitud: 5.8491667 Longitud: -72.86416666666666 GMS** (grados minutos segundos): **Lat. N 5° 50' 57"** **Long. O 72° 51' 51"** Altitud: 2472 m / 8110 ft



Figura 6. Ubicación exacta de la toma de muestra en Busbanzá, Boyacá
Fuente: Google maps

- **Villavicencio: Latitud: 4.080555555555556 Longitud: -73.51055555555556** **GMS** (grados minutos segundos): **Lat. N 4° 4' 50"** **Long. O 73° 33' 38"** Altitud: 355 m / 1164 f



Figura 7. Ubicación exacta de la toma de muestra en Villavicencio, Meta
Fuente: Google maps

Fase 2:

Caracterización fisicoquímica de los lodos:

● pH

El pH se determinó utilizando un potenciómetro marca Hanna Instruments tomando 15 mL de muestra en tubo falcón. El potenciómetro fue calibrado antes de la medición insertando el electrodo en solución amortiguadora de 7.0 y posterior a lavado en solución de pH 4.0, al finalizar la calibración del potenciómetro, el electrodo se lavó con agua destilada y se procedió a la lectura de la muestra.¹

● Granulometría

La determinación del tamaño de los gránulos permite establecer sus cambios durante un proceso de granulación y, además, permite identificar la homogeneidad o heterogeneidad de los gránulos del lodo con respecto a su tamaño.¹ Ver Anexo 1. *Granulometría lodo laguna de Busbanzá, Boyacá*

Procedimiento

1. Preparar agar bacteriológico como lo recomienda la casa comercial; no requiere su esterilización. Como alternativa se puede utilizar gelatina sin sal.

2. En 5 cajas de Petri, colocar 1 ml de lodo en el centro.
3. Enseguida verter el agar aún tibio, procurando formar una película lo más delgada posible.
4. Distribuir la muestra en el agar de manera uniforme, con movimientos circulares de la caja de Petri hacia la derecha y los mismos hacia la izquierda formando ochos.
5. Esperar a que se solidifique el agar.
6. Observar en el microscopio óptico.

Para su lectura se debe tener en cuenta:

- Presencia de gránulos bien definidos y compactos.
- El valor del diámetro promedio se debe realizar sobre una muestra al azar (mínimo 100 gránulos).
- Para granos no esféricos se debe medir el diámetro mayor.¹

● **Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

Procedimiento

1. Homogenizar la muestra.
2. Agitar por balanceo la cubeta de reacción para poner en suspensión el sedimento.
3. Verter cuidadosamente 3,0 ml de muestra mediante la pipeta sobre el reactivo en la pared interna de la cubeta de reacción manteniéndola inclinada.
4. Cerrar firmemente la cubeta con tapa roscada.
5. Mezclar vigorosamente el contenido de la cubeta agarrándola solamente por la tapa roscada debido a que se calienta.
6. Calentar la cubeta durante 120 minutos a 148°C en el termorreactor precalentado.
7. Sacar del termorreactor la cubeta caliente y colocarla en un soporte para tubos de ensayo para que se enfríe, no refrigerar con agua fría.

8. Al cabo de 10 minutos agitar la cubeta por balanceo y para enfriarla a temperatura ambiente volver a colocarla en el soporte para tubos de ensayo (mínimo 30 minutos).
9. Limpiar las cubetas con un paño seco y limpio.
10. Medir en el fotómetro Spectroquant CombiCheck 10, colocando la cubeta en el compartimiento para cubetas y hacer coincidir la raya de marcado de la cubeta con la marca de fotómetro.¹



Figura 8. Equipo para determinación de DQO Nova 60
Fuente: Autores

- **Sólidos**

Procedimiento: Se trabajó por triplicado

1. Colocar 30 mililitros de lodo en una cápsula de porcelana previamente incinerada y pesada (P_1)
2. Evaporar al baño María la humedad del lodo
3. Secar en estufa a una temperatura entre 103°C y 105°C durante 2 horas
4. Transferir las cápsulas al desecador hasta que se enfríen y pesarlas (P_2)
5. Incinerar la muestra en la mufla a 550°C durante una hora
6. Transferir las cápsulas a la estufa durante 15 minutos
7. Posteriormente, colocar las cápsulas en el desecador y permitir que se enfríen
8. Pesar las cápsulas (P_3)¹

Ver Anexo 6. SST y SSV en lodos en estudio

- **Velocidad de sedimentación e índice volumétrico**

Procedimiento

1. Colocar los 200 ml de lodo sedimentado en la probeta y aforar a 1.000 ml con efluente clarificado del propio reactor anaerobio o con agua destilada.
2. Tapar la probeta con parafilm, homogeneizar el lodo y el agua invirtiendo la probeta tres veces.
3. Colocar la probeta en una superficie plana y registrar el volumen de lodo sedimentado por unidad de tiempo; generalmente se registra el volumen sedimentado cada 30 segundos para los primeros 5 minutos y, posteriormente, cada 3 minutos hasta completar 30 minutos.¹

Fase 3:

Caracterización microbiológica por número más probable

Se realizan diluciones seriadas del lodo en estudio, con las diluciones seleccionadas se inocularon 5 tubos por dilución; se identifican los tubos positivos de acuerdo con las características de cada grupo bacteriano realizando los cálculos del número más probable.¹

Procedimiento

1. Preparar las soluciones de Solución mineral de Balch, Solución oligoelementos sin sulfatos/ con sulfatos, Solución diluido de vitaminas de Balch y Solución mineral de Peening y Widdel, las cuales serán requeridas para la preparación de los medios de cultivo. Ver Anexo 32, 33, 34, 35 y 36.
2. Preparar los medios de cultivo selectivos BAS, BFG, BFL, BSRL y BSRA (Ver Anexo)
3. Servir por medio 28 tubos de 13x100 y autoclavar a 121°C con 15 psi durante 15 minutos.
4. Realizar 3 diluciones seriadas por quintuplicado por cada medio selectivo y muestra de estudio.
5. Realizar 1 control por cada medio de cultivo.

6. Incubar en CO₂ a 37°C, el tiempo para cada medio se encuentra constatado en la tabla.¹

Medios	Sustrato	Periodo de incubación 37°C en CO ₂ (días)	Detección de tubo positivos
Bacterias anaerobias estrictas (BAS)	Glucosa	5 a 8	Producción de FeS, coloración negra
Bacterias fermentativas de glucosa y lactosa (BFG y BFL)	Glucosa	5 a 8	Acidificación del medio, cambio de color de verde a amarillo
Bacterias sulfatoreductoras del lactato (BSRL)	Lactato	7 a 15	Producción de FeS, coloración negra
Bacterias sulfatoreductoras del acetato (BSRA)	Acetato	7 a 15	Producción de FeS

Tabla 8. Medios, tiempo e interpretación de lectura para cultivos microbianos
Fuente: Digestión Anaerobia una aproximación a la tecnología¹

Para la realización de la lectura de los medios se revisaron los controles negativos de los respectivos medios, los cuales se dejaron bajo las mismas condiciones que los medios inoculados con los lodos de estudio, es decir, bajo atmósfera de CO₂, 37°C en la incubadora NUAIRE como podemos ver en la *Figura 9*.



Figura 9. Incubadora de CO2 NUAIRE
Fuente: Realizado por los autores

Fase 4:

Medición de metano por desplazamiento de líquido

ACTIVIDAD METANOGÉNICA ESPECÍFICA

Para la determinación de la AME producida por los diferentes tipos de lodo en estudio se implementó el método convencional denominado *Desplazamiento de NaOH (Hidróxido de Sodio) al 3%*, dicho procedimiento se realizó por medio de un montaje manual elaborado en el laboratorio *Figura 10* con el cual se busca realizar la medición del desplazamiento producido por el gas obtenido de los lodos de estudio sobre la sustancia química, es decir, hidróxido de sodio. **Ver Anexo 37.**

En el respectivo procedimiento se montó por triplicado cada lodo en estudio, de igual forma sus respectivos controles negativos como positivos (lodo de farmacéutica), los controles negativos no contenían el medio de suplemento para así poder garantizar la actividad metanogénica ejercida en los reactores para la producción de gas metano como de CO₂.



Figura 10. Montaje para la determinación de Desplazamiento por NaOH al 3% ejercida por los lodos en estudio y su respectivo control
Fuente: Realizado por los autores

Fase 5:

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizarán por triplicado. Se realizará el análisis ANOVA para establecer diferencias significativas con un 95% de confianza entre los diferentes tratamientos utilizados. Se emplea el programa Excel 2016. Si se presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) se realizará test de Tukey para establecer cuál es el mejor tratamiento.¹ Tomando en cuenta que son dos métodos estadísticos que se ajustan a los resultados que se puedan obtener, ya que ANOVA compara varios grupos de una variable cuantitativa y al ejecutar Tukey se prueban las diferencias entre medias de tratamientos.

4. RESULTADOS

Las muestras de lodos tomadas se pueden observar en la figura 11, Se tomaron en total 1L tipo de lodo, en diferentes puntos de la zona a muestrear.



Figura 11. Lodos en estudio (empresa farmacéutica, río Quenane, Villavicencio, Meta y Laguna de Busbanzá, Boyacá)

Fuente: realizado por los autores

4.1 Caracterización físico-química

Para la caracterización fisicoquímica de los lodos en estudio se realizó pruebas como: Granulometría, pH, concentración de sólidos y DQO. A continuación, se presenta los resultados obtenidos.

Granulometría

Este procedimiento se hizo con el fin de determinar el tamaño promedio de los gránulos de las muestras, ya que, su conocimiento permite clasificar el sedimento, además, para el tratamiento anaerobio de residuos líquidos es importante la formación de gránulos con velocidad de sedimentación alta y con actividad metanogénica. Determinar el tamaño del gránulo permite establecer los cambios que pueda tener durante el proceso de operación de los reactores.

Granulometría lodo laguna, Busbanzá			Granulometría lodo río Quenane, Villavicencio			Granulometría lodo empresa farmacéutica		
Agar 1	Agar 2	Agar 3	Agar 1	Agar 2	Agar 3	Agar 1	Agar 2	Agar 3
0,982 µm	0,971 µm	1,016 µm	1,139 µm	1,051 µm	1,026 µm	0,758 µm	0,643 µm	0,691 µm

Tabla 9. Resultados de granulometría.

Fuente: realizado por los autores

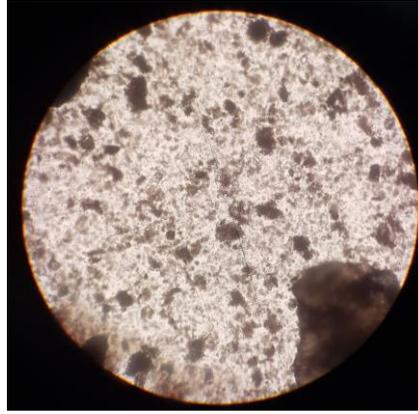


Figura 12. Gránulos lodo laguna de Busbanzá, Boyacá
Fuente: realizado por los autores

En la *Figura 12* se puede observar los gránulos del lodo de la laguna, Busbanzá. La granulometría da como resultado promedio de los gránulos del sedimento de la Laguna Busbanzá: $0,98 \mu\text{m}$ o $9,89 \times 10^{-4} \text{ mm}$

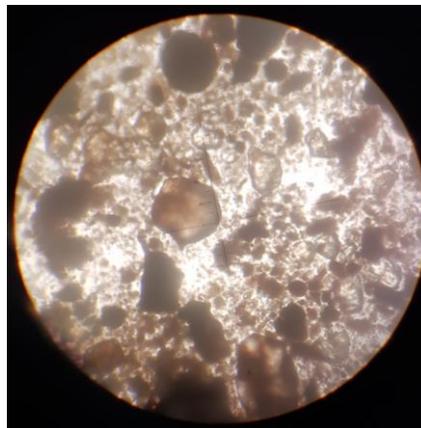


Figura 13. Gránulos lodo Río Quenane, Villavicencio, Meta
Fuente: realizado por los autores

En la *Figura 13* se puede observar los gránulos del lodo del Río Quenane. La granulometría da como resultado promedio de los gránulos del sedimento de la Quebrada Quenane: $1.07 \mu\text{m}$ o 0.001 mm



Figura 14. Gránulos lodo de empresa farmacéutica
Fuente: realizado por los autores

En la *Figura 14* se puede observar los gránulos del lodo de empresa farmacéutica. La granulometría da como resultado promedio de los gránulos del sedimento de la empresa farmacéutica: $0,697 \mu\text{m}$ o $6,97 \times 10^{-4} \text{ mm}$

Según el ANOVA se establece que existen diferencias significativas entre los lodos analizados respecto a la granulometría ($P= 1,945 \text{ E-}24$; $F= 17,546$; grados de libertad= 8). siendo el lodo de mayor tamaño el del río Quenane. **Ver Anexo 4.**

Según el Tukey se encuentra que existen diferencias significativas entre los lodos nativos de laguna, Busbanzá y Río Quenane con el lodo de empresa farmacéutica, mientras, que entre los lodos nativos no. **Ver Anexo 5.**

pH

Esta medida se realizó con el fin de determinar las condiciones iniciales de los lodos en estudio, y así, establecer si es necesario un ajuste para las condiciones óptimas para un mejor rendimiento en el proceso de la digestión anaerobia, ya que, los microorganismos usados son sensibles a los cambios de pH. El pH óptimo donde se presenta mayor producción de metano está entre 6.5 -7.7

Los resultados del pH del lodo farmacéutico, el lodo de la laguna Busbanzá y el lodo de la quebrada del río Quenane se encuentran en la *Tabla 10*.

pH lodos		Temperatura
Laguna, Busbanzá	5.08	20.4 °C
rio Quenane, Villavicencio	5.20	20.4 °C
Empresa farmacéutica	7.2	20.4 °C

Tabla 10. Resultados obtenidos a partir de la realización de pH de lodos en estudio.
Fuente: realizado por los autores

El pH inicial de la muestra de la laguna, Busbanzá y de la quebrada del río Quenane fue de 5.08 y 5.2 respectivamente, encontrándose por debajo del rango óptimo para la actividad metanogénica, lo que puede generar una inhibición de los microorganismos y así ser menos eficiente el proceso, además, en la fase acidogénica la producción y acumulación de ácidos grasos volátiles puede generar más acidificación en el medio generando un ambiente tóxico para los microorganismos presentes.

El pH de la muestra de la empresa farmacéutica fue de 7.2, estando en el rango óptimo para la adaptación al sistema, el crecimiento de los microorganismos y así la buena producción de metano.

Concentración de los sólidos

Se determinó la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) con el fin de conocer el contenido de materia orgánica presentes en los lodos. A continuación, se presentan en la siguiente tabla los resultados obtenidos

Concentración de sólidos	SST mg/l	SSV mg/l	Relación SSV/SST
Lodo laguna, Busbanzá	1.295.000	376.665	0,290

Lodo río Quenane, Villavicencio	1.181.333	117.250	0,099
Lodo empresa farmacéutico	556.917	481.250	0,864

Tabla 11. Resultados obtenidos a partir concentración de sólidos realizados a lodos en estudio.
Fuente: realizado por los autores

Es importante conocer la concentración de sólidos totales contenidos en el lodo que se va a utilizar en el digestor, ya que, una cantidad inadecuada puede afectar la movilidad de las bacterias metanogénicas dentro del sustrato provocando que se reduzca el crecimiento a medida que se aumenta el contenido de sólidos y por lo que puede verse afectado la eficiencia y producción de gas. Se ha demostrado que una carga en digestores semicontinuos no debe tener más de un 8% a 12 % de sólidos totales para asegurar el buen funcionamiento del proceso, a diferencia de los digestores discontinuos, que tienen entre un 40 a 60% de sólidos totales.

Según el ANOVA se establece que existen diferencias significativas entre los lodos analizados respecto a la concentración de sólidos suspendidos totales ($P=0,019$; $F=19,380$; grados de libertad= 2). **Ver Anexo 7.**

Según el Tukey se encuentra que existen diferencias significativas entre los lodos nativos de laguna, Busbanzá y Río Quenane con el lodo de empresa farmacéutica, mientras, que entre los lodos nativos no. **Ver Anexo 9.**

Según el ANOVA se establece que existen diferencias significativas entre los lodos analizados respecto a la concentración de sólidos volátiles ($P=0,005$; $F=47,003$; grados de libertad= 2). **Ver Anexo 8**

Según el Tukey se encuentra que existen diferencias significativas entre los lodos nativos de laguna, Busbanzá y Río Quenane con el lodo de empresa farmacéutica, mientras, que entre los lodos nativos no. **Ver Anexo 10.**

DQO

Se midió la Demanda Química de Oxígeno con la finalidad de evaluar la tasa de remoción de materia orgánica. En el test utilizado se determina las sustancias orgánicas e inorgánicas oxidables con dicromato de potasio. El intervalo de medida es de 10-150 mg/l de DQO

Blanco	70 mg/L DQO
M1 laguna, Busbanzá	384 mg/L DQO
M2 río Quenane, Villavicencio	215 mg/L DQO
M3 empresa farmacéutica	351 mg/L DQO

Tabla 12. Resultados obtenidos de realización de DQO a lodos en estudio.
Fuente: realizado por los autores

De acuerdo al DQO el lodo que tiene más materia orgánica es el de la laguna, Busbanzá seguido del lodo de empresa farmacéutica, y, por último, el lodo del Río Quenane.

4.2 Caracterización microbiológica

Determinación de poblaciones microbianas por número más probable (NMP)

Los controles negativos (medios BAS, BFG, BFL, BSRL Y BSRA) efectivamente se mantuvieron sin evidencia de crecimiento microbiano y conservaron las cualidades iniciales previas a la incubación que se realizó como se pueden ver en la *Figura 15*. Cabe resaltar que se debía diferenciar el precipitado generado por algunas sales que constituyen los medios con la turbidez generada por las bacterias, tomando en cuenta que en la *Figura 15* es complicado determinar esas diferencias.

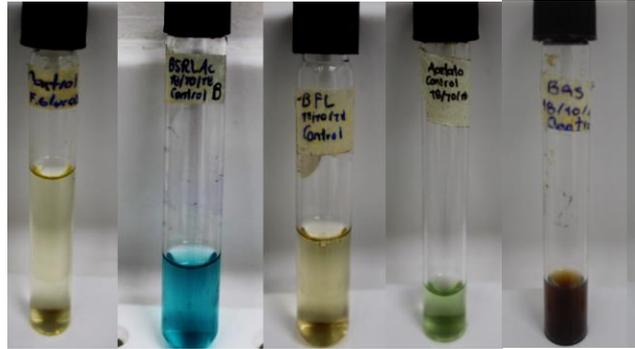


Figura 15. Controles negativos
Fuente: realizado por los autores

Lodo procedente Laguna Busbanzá, Boyacá

Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS): Se obtuvo crecimiento bacteriano como podemos identificar en la *Figura 16*, donde se presencié turbiedad en los medios constatando presencia bacteriana.

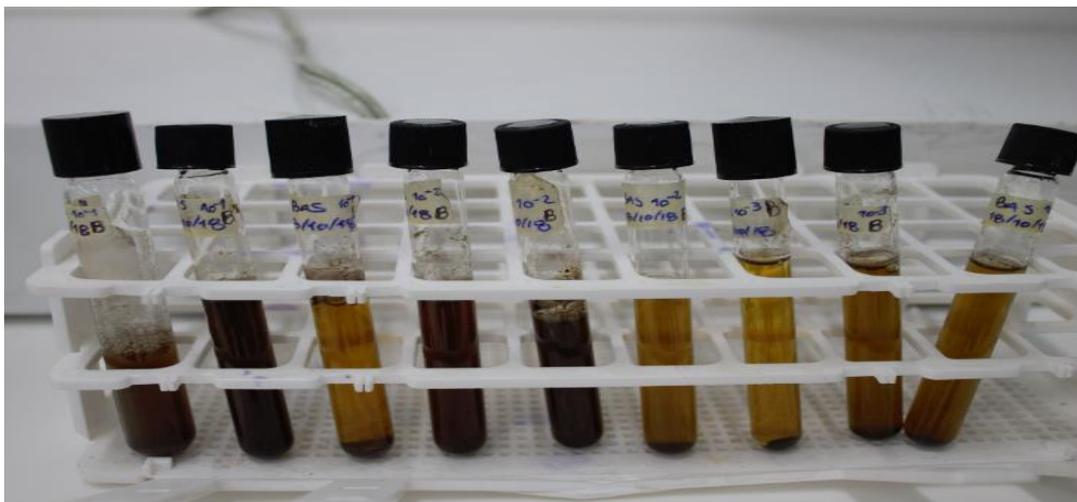


Figura 16. Medio BAS (de izquierda a derecha diluciones de la 10⁻¹ a 10⁻³) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG): Se obtuvo crecimiento observándose en la dilución de 10⁻¹ mayor turbidez por el crecimiento bacteriano, pero ya en la dilución 10⁻³ era menor la turbidez del medio, también se observó

cambio de color del medio de transparente a amarillo tenue identificando posible acidificación cómo podemos observar en la *Figura 17*.

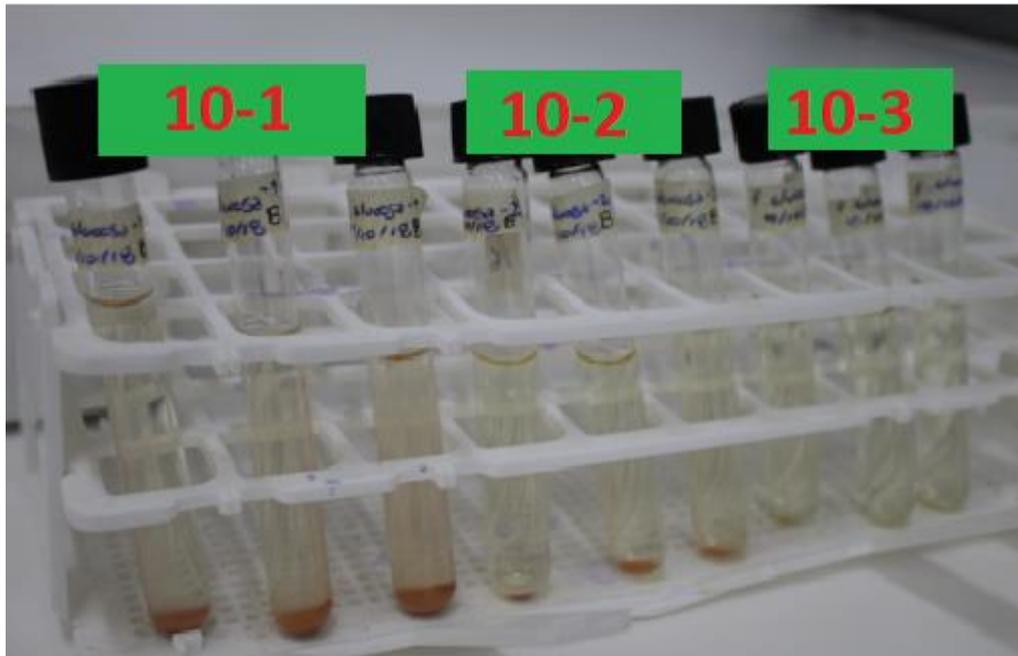


Figura 17. Medio BFG (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá

Fuente: Elaborada por los autores

Bacterias Fermentadoras de Lactosa (BFL): En la lectura de estos medios se obtuvo crecimiento bacteriano en todas las diluciones del medio, arrojando un resultado positivo para la presencia de estas bacterias como podemos observar en la *Figura 18*.

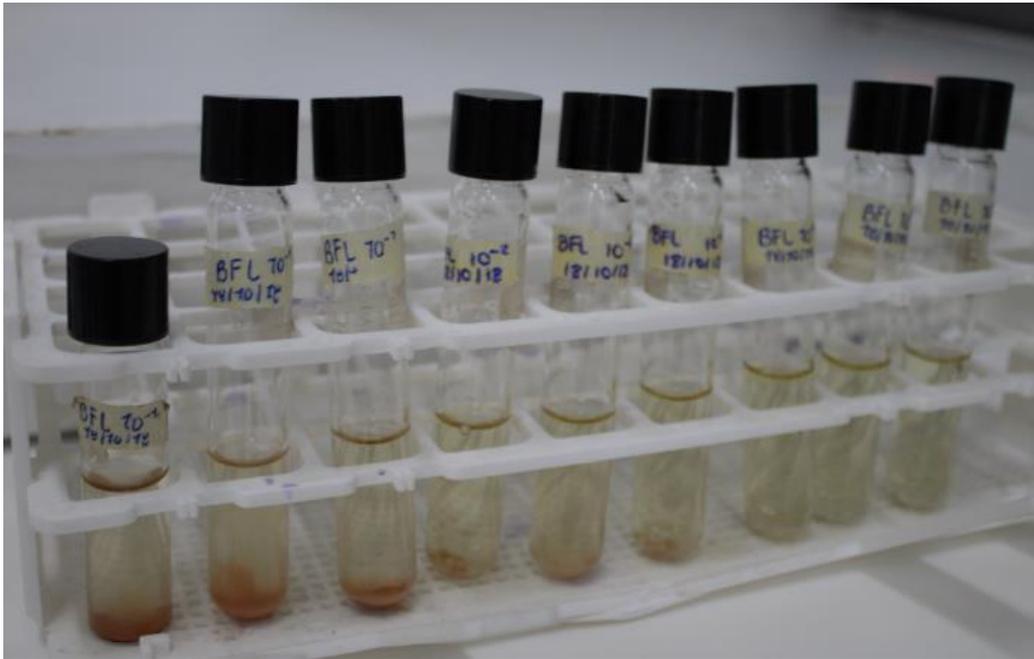


Figura 18. Medio BFL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Sulfatoredutoras del Lactato (BSRL): En la lectura realizada a los respectivos medios se observó crecimiento y producción de FeS (Sulfuro de Hierro) indicando que hay presencia de estas bacterias, es decir, coloración negra por parte de los microorganismos presentes en la muestra de lodo como se puede evidenciar en la *Figura 19*.

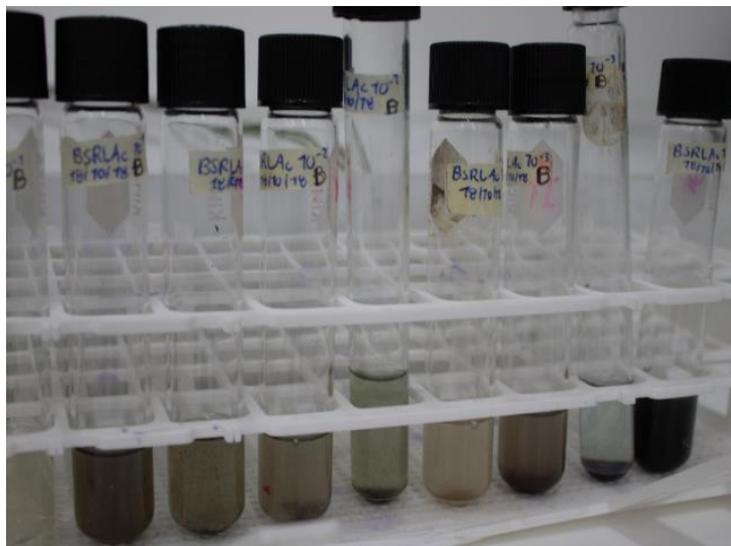


Figura 19. Medio BSRL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Sulfatoredutoras del Acetato (BSRA): En las lecturas correspondientes sobre las diferentes diluciones dadas en los medios de cultivo, se determinó presencia de FeS por la coloración negra observada. Indicando que están presentes estos microorganismos como podemos observar en la *Figura 20*.

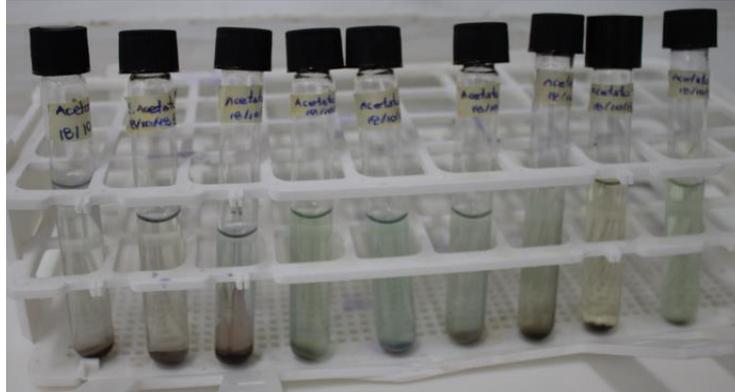


Figura 20. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Busbanzá, Boyacá
Fuente: realizado por los autores

Lodo procedente del Río Quenane Villavicencio, Meta

Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS): Realizada la lectura del respectivo medio en sus diferentes diluciones se obtuvo crecimiento evidente junto a la producción de FeS en los tubos indicando presencia bacteriana, igualmente se identifica crecimiento de una posible estructura fúngica en una de las diluciones como se puede apreciar en la *Figura 21*.



Figura 21. Medio BAS (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta

Fuente: realizado por los autores

Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG): Realizada la lectura se determina crecimiento positivo por presencia de turbidez en el medio de cultivo en todas las diluciones realizadas como se puede apreciar en la *Figura 22*. Indicando la presencia de estos microorganismos.



Figura 22. Medio BFG (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta

Fuente: realizado por los autores

Bacterias Fermentadoras de Lactosa (BFL): Se presencia turbidez, es decir, crecimiento positivo de estos microorganismos en el medio acompañado de producción de FeS como se puede ver en la *Figura 23* posteriormente a ello también se identifica posible biomasa para aislamiento en agar PDA con el objetivo de identificar posibles estructuras fúngicas presentes en el lodo de Villavicencio, Meta, cómo se puede ver en la *Figura 24* y su posterior aislamiento *Figura 25*.

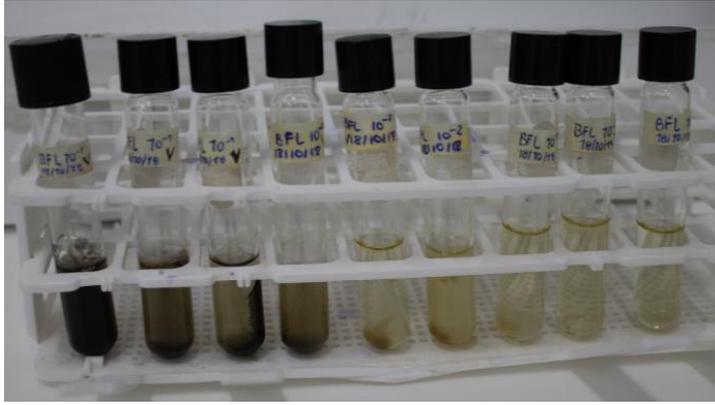


Figura 23. Medio BFL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta
Fuente: realizado por los autores



Figura 24. Dilución de 10⁻² con presencia de biomasa y turbidez de la muestra de lodo procedente de Villavicencio, Meta
Fuente: realizado por los autores

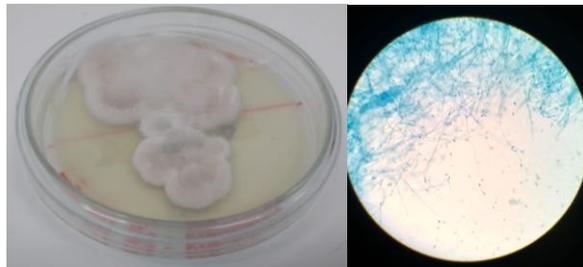


Figura 25. Hongo aislado en medio de cultivo BAS y BFL de lodo Villavicencio.
Fuente: elaborado por los autores

Bacterias Sulfatoredutoras del Lactato (BSRL): En los respectivos medios de cultivo y sus diluciones se determinó producción de FeS (coloración negra observada en la parte inferior del tubo) y turbidez en todas las diluciones

realizadas, indicando presencia de estos microorganismos. Como se puede determinar en la *Figura 26*.

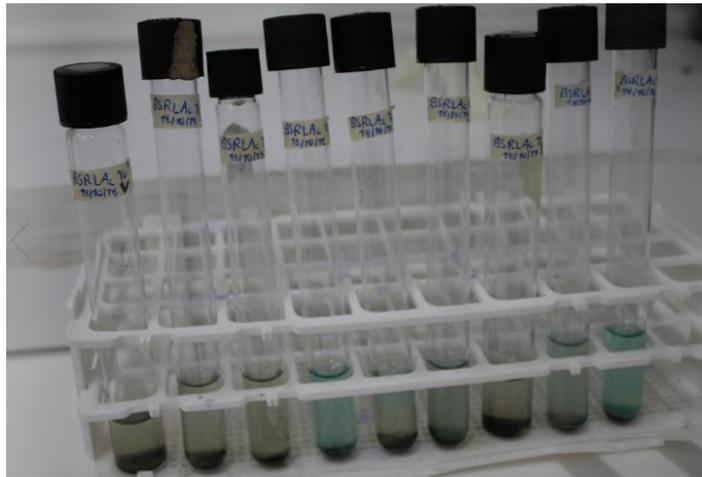


Figura 26. Medio BSRL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Sulfatoredutoras del Acetato (BSRA): De acuerdo a la lectura en las diferentes diluciones se presenta turbidez, la cual indica crecimiento y producción de FeS en los tubos de la dilución 10-1 como se puede observar en la *Figura 27*.

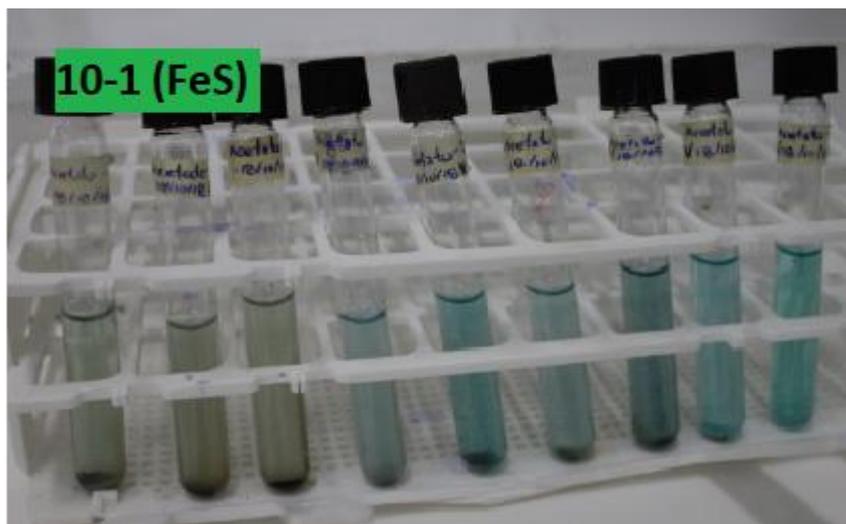


Figura 27. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de Villavicencio, Meta
Fuente: realizado por los autores

Lodo procedente de empresa farmacéutica

Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS): Realizada la lectura del respectivo medio en sus diferentes diluciones se obtuvo crecimiento evidente junto a la producción de FeS en todos los tubos como se puede apreciar en la *Figura 28*. Indicando la presencia de estos microorganismos.



Figura 28. Medio de cultivo BAS (de izquierda a derecha diluciones de la 10^{-1} a 10^{-3}) con lodo procedente de empresa farmacéutica
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG): No se obtuvo crecimiento como se puede apreciar en la *Figura 29*. Indicando que no hay presencia de estos microorganismos.

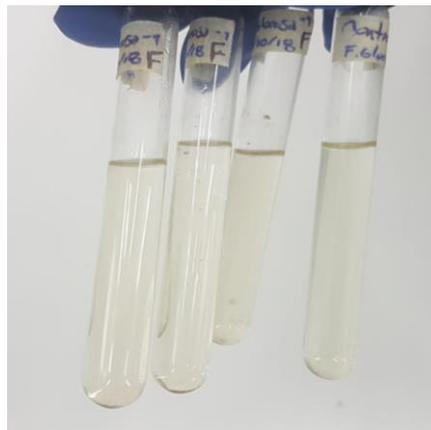


Figura 29. Medio de cultivo BFG con lodo procedente de empresa farmacéutica
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Fermentadoras de Lactosa (BFL): Se obtuvo solo crecimiento en la dilución 10^{-1} , indicando presencia de estos microorganismos en una menor concentración observado en la *Figura 30*.

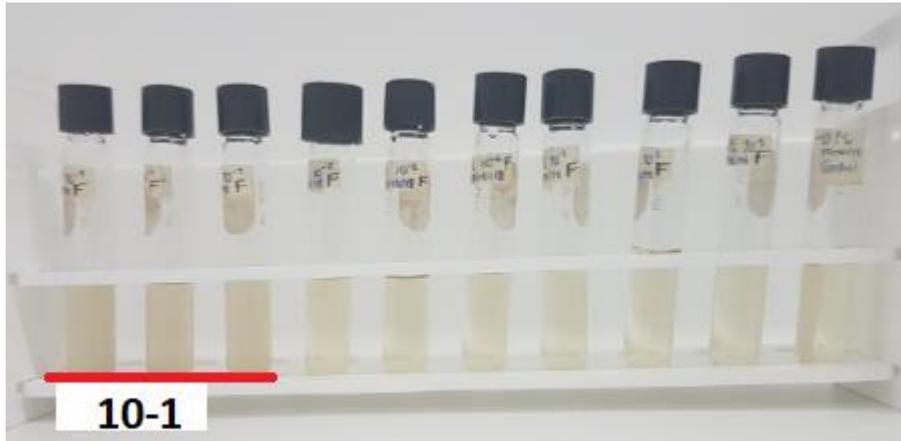


Figura 30. Medio de cultivo BFL (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de empresa farmacéutica
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Sulfatoredutoras del Lactato (BSRL): Realizada la lectura del respectivo medio en sus diferentes diluciones se obtuvo turbidez indicando crecimiento y presencia de estos microorganismos junto con la formación de FeS como se puede observar en la *Figura 31*.

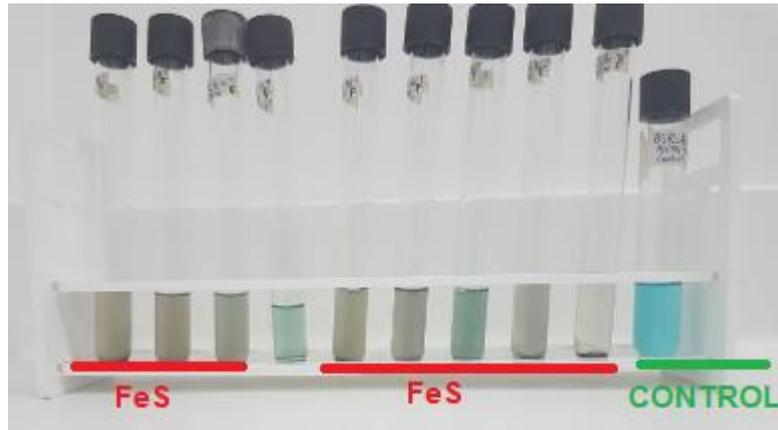


Figura 31. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3, junto al control negativo de color azul) con lodo procedente de empresa farmacéutica
Fuente: realizado por los autores

Bacterias Sulfatoredutoras del Acetato (BSRA): Realizada la lectura del respectivo medio en sus diferentes diluciones se obtuvo crecimiento de estos microorganismos junto con la formación de FeS en algunos de las diluciones (color negro) como se observa en la *Figura 32*.

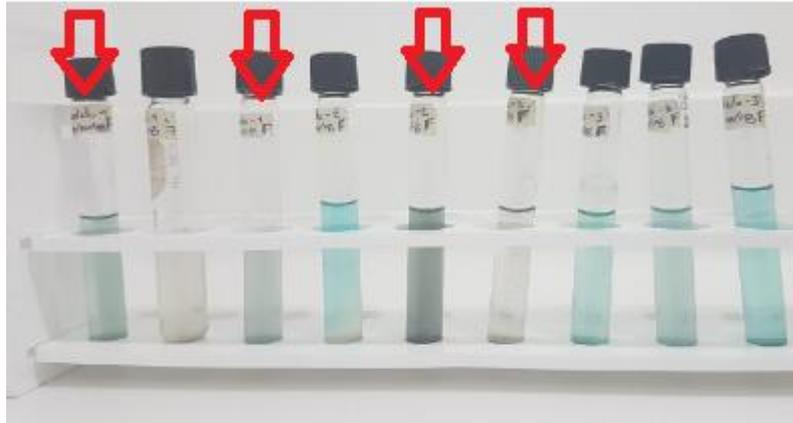


Figura 32. Medio de cultivo BSRA (de izquierda a derecha diluciones de la 10-1 a 10-3) con lodo procedente de empresa farmacéutica, la flecha roja indica los medios con producción de FeS
Fuente: realizado por los autores

En la *Figura 33* cada número relaciona cada población bacteriana que se encuentra implicada en el proceso de digestión anaerobia donde el 1 son las bacterias fermentativas; el 2 son bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno; el 3 son bacterias acetogénicas; el 4 son bacterias metanogénicas hidrogenotróficas y el 5 bacterias metanogénicas acetoclásticas. De igual forma, en color rojo se resaltan las bacterias aisladas en los lodos en estudio y su relación durante el proceso metanogénico.³⁹

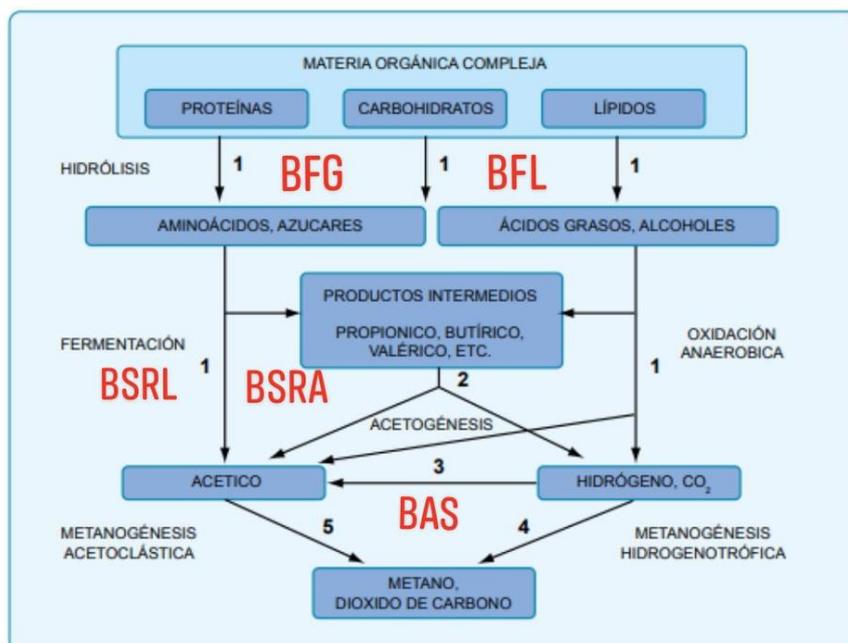
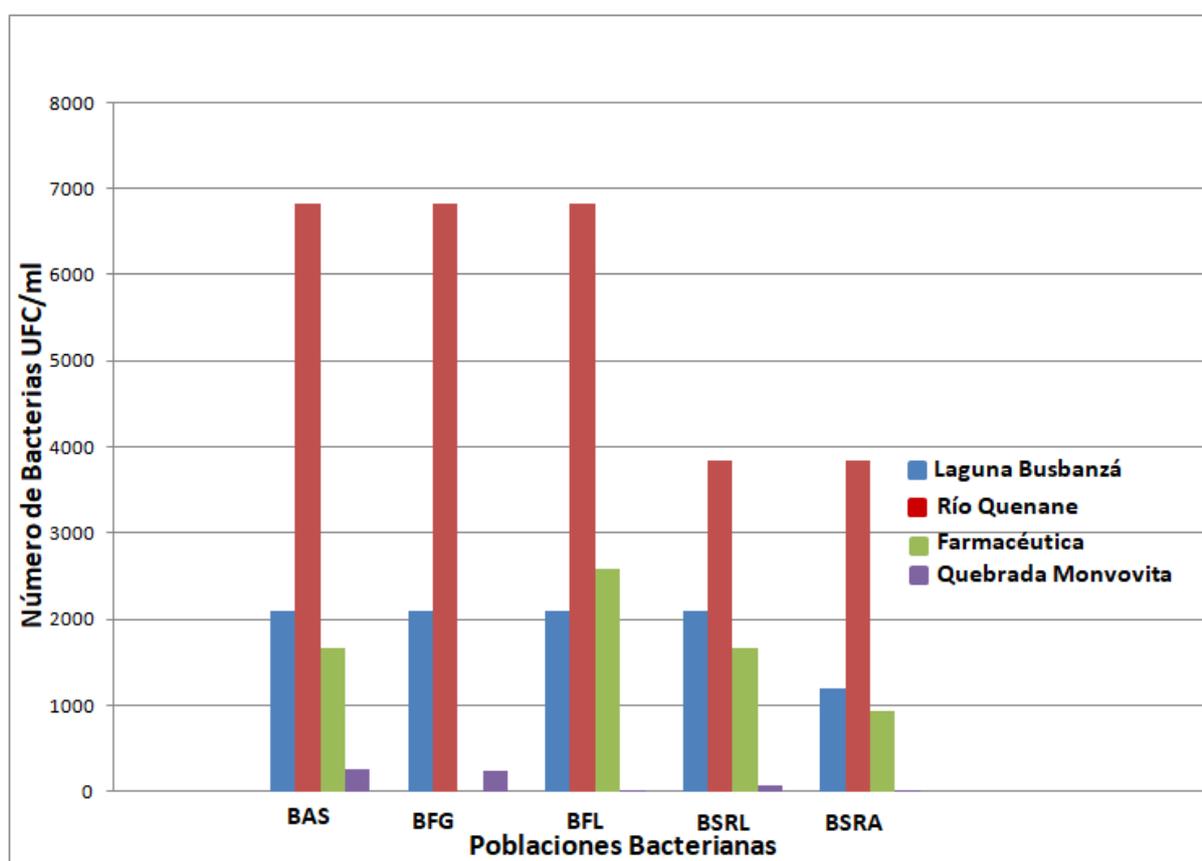


Figura 33. Microorganismos encontrados relacionados en el proceso de digestión anaerobia

Fuente: Varnero Moreno M. MANUAL DE BIOGÁS [Internet]. Santiago de Chile: "Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables"; 2011 [cited 8 May 2019]. Available from: <http://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf>

Encontrándose dos tipos de bacterias en la fase hidrolítica, las Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG) y las Bacterias Fermentadoras de Lactosa (BFL). En la fase fermentativa se encontraron las bacterias Sulfatoredutoras del Lactato (BSRL), en la fase acetogénica se encuentran las Bacterias Sulfatoredutoras del Acetato (BSRA) y en la fase metanogénica se encontraron las Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS) (ver figura 33).

Posteriormente se realiza el análisis del crecimiento obtenido por medio de la técnica de Número Más Probable permitiendo realizar un análisis comparativo entre los lodos en estudio que se encuentra reflejado en la *Gráfica 1*.



Gráfica 1: Poblaciones Bacterianas obtenidas por técnica de NMS para lodos de Laguna Busbanzá, Río Quenane, Farmacéutica y Quebrada Moncovita. Elaborado por los autores, 2018

En la *Gráfica 1* se nota una diferencia considerable de las poblaciones microbianas aisladas del lodo proveniente del Río Quenane de Villavicencio en cuanto al número de bacterias y presencia de poblaciones como BAS, BFG, BFL, BSRL y BSRA con respecto a las provenientes de los lodos de la laguna de Busbanzá y la empresa Farmacéutica quienes no presentan una diferencia considerable, mientras que la Quebrada Moncovita presentan una diferencia considerable respecto a todos los lodos en estudio.

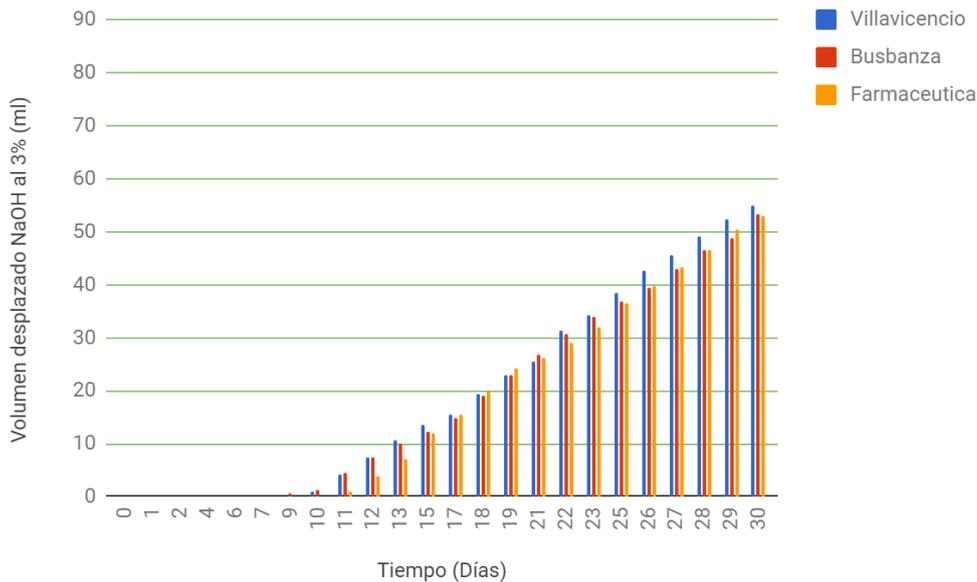
Posteriormente se realiza un análisis estadístico ANOVA (95%) y TUKEY (95%) con fin de establecer si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos a partir de la determinación de poblaciones bacterianas por medio de la técnica de NMP. **Ver Anexo 22.**

Gracias al análisis estadístico realizado por medio de los softwares ANOVA (95%) y TUKEY (95%) ($P= 0,001$; $F= 7,31$) se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones bacterianas del río Quenane con respecto a las demás, mientras que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones del lodo de la empresa Farmacéutica y el lodo de la Quebrada Moncovita y de la Laguna Busbanzá. **Ver Anexo 23.**

4.3 Actividad metanogénica específica (AME)

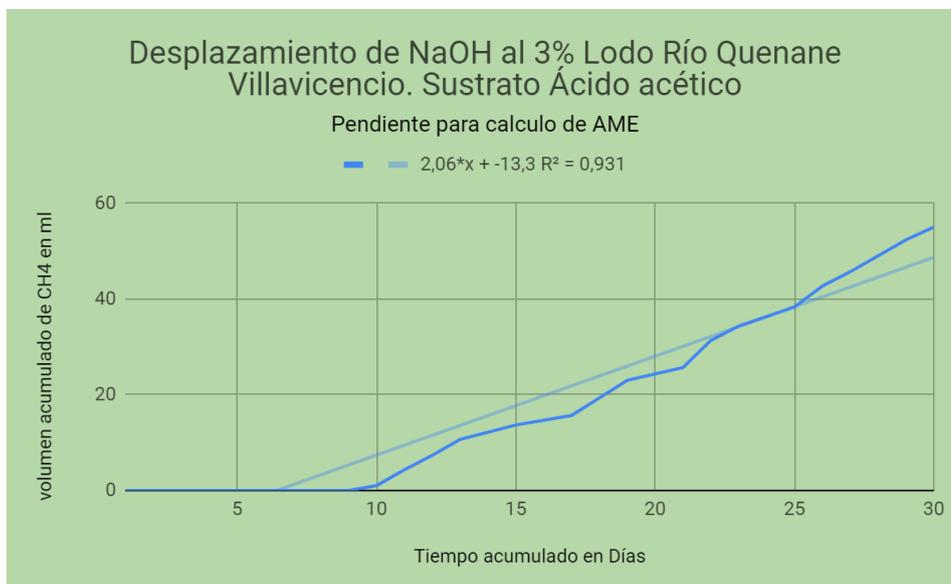
Tomando en cuenta el respectivo montaje desarrollado, las mediciones del volumen de NaOH desplazado fueron realizadas diariamente para cada uno de los lodos y controles durante 30 días como se puede identificar y determinar los volúmenes que se obtuvieron en el *Anexo 24*.

Obtenidas las respectivas mediciones tabuladas en la *Tabla 20* se puede observar por medio de la *Gráfica 2* los diferentes volúmenes obtenidos en la medición de dicho desplazamiento, donde se observa un patrón de corrido muy equilibrado entre los tres lodos en estudio durante el tiempo que se llevó a cabo la reacción de los biorreactores, como también cabe resaltar el tiempo necesario para que se pueda dar la reacción, es decir, producción de AME por cada uno de los lodos.

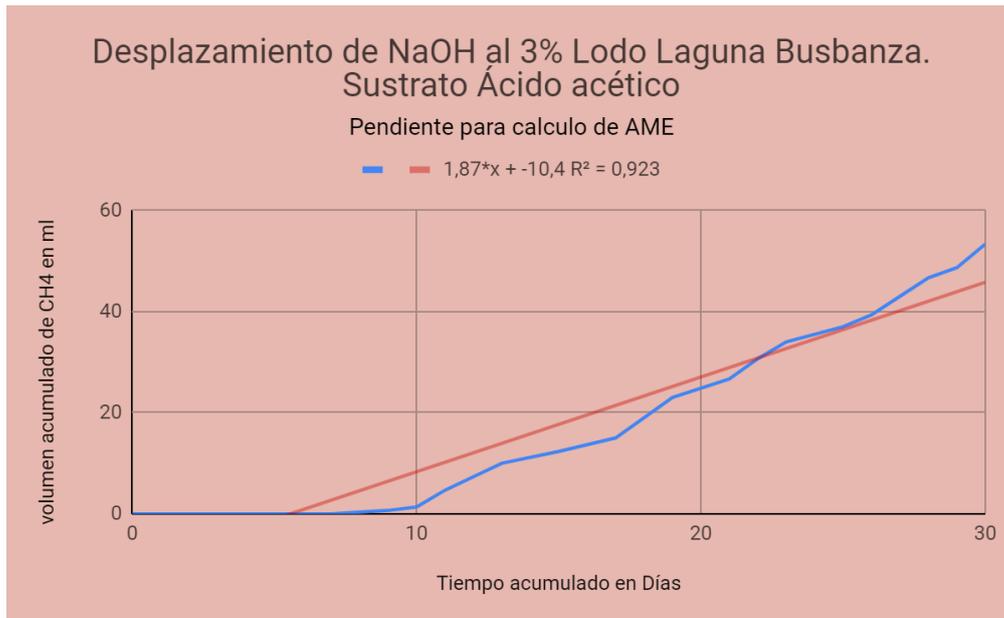


Gráfica 2: Volumen desplazado de NaOH al 3% generado por los lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.
Fuente: realizado por los autores

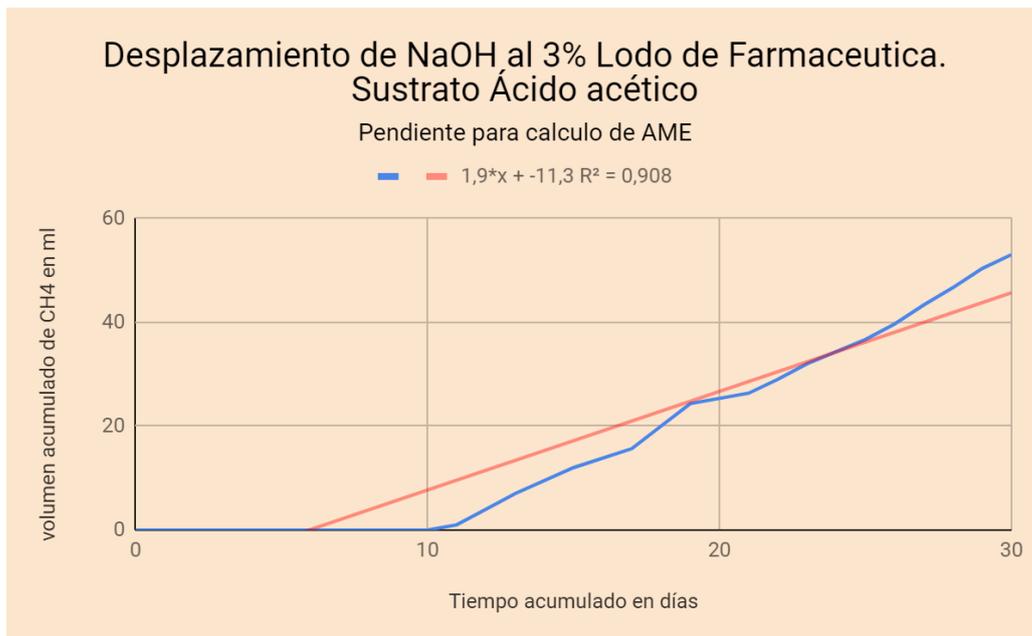
Ya obtenidos los resultados se procedió a obtener el promedio del volumen desplazado por cada lodo en estudio, para posteriormente mediante graficar los valores de los *Anexos 14, 15 y 16*, obtener el valor de la pendiente (P) y así poder ser aplicado en la *ecuación 1* para la determinación cuantitativa de la AME (actividad metanogénica específica) que fue generada por cada uno de los lodos en los respectivos biorreactores.



Gráfica 3: Obtención de P (pendiente) en el desplazamiento de NaOH por el lodo de Villavicencio.
Fuente: realizado por los autores



Gráfica 4: Obtención de P (pendiente) en el desplazamiento de NaOH por el lodo de Villavicencio.
Fuente: realizado por los autores



Gráfica 5: Obtención de P (pendiente) en el desplazamiento de NaOH por el lodo de Villavicencio.
Fuente: realizado por los autores

Por lo tanto, de acuerdo al nivel promediado en el desplazamiento de hidróxido de sodio al 3% dado en el montaje de los reactores el lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta obtuvo mayor volumen desplazado, 55 ml por 30 días; seguido

por el lodo de la laguna de Busbanzá, Boyacá con un volumen de 53,33 ml por 30 días y finalmente el lodo de la empresa farmacéutica un volumen desplazado de 53 ml por 30 días. (Ver anexo tabla promedio) El coeficiente de variación del estudio no fue menor a 10 %, tomando en cuenta que las condiciones en las que se manejó el montaje de reactores no fueron estables todo el tiempo de estudio.

El análisis ANOVA (95%) y TUKEY (95%) establecen que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0,98$; $F=0,02$; $gl= 2$), lo cual indica que todos los microorganismos en los lodos en estudio producen metano en tiempos y proporciones similares. **Ver Anexo 26 y 27**

De acuerdo al análisis estadístico ANOVA en el *Anexo 26* se precisa no existir una diferencia significativa en el volumen desplazado de NaOH por cada uno de los lodos, donde es un resultado positivo tomando en cuenta que los lodos de Villavicencio y Busbanzá en relación al desarrollo de AME se comporta igual que el lodo de farmacéutica que fue empleado como control positivo del respectivo trabajo.

Para la rectificación de los datos el análisis estadístico de TUKEY dado en el *Anexo 27* cerciora que existe igualdad en el comportamiento de los lodos, por lo tanto, hay presencia de consorcios microbianos capaces de convertir la materia orgánica en metano lo cual nos indica que los lodos del Río Quenane y la laguna de Busbanzá pueden ser utilizados como inóculos en procesos de digestión anaerobia tomando en cuenta los microorganismos que fueron aislados anteriormente.

Obtenidos los anteriores resultados, se hace uso de la *Ecuación 1* para el cálculo de la AME (actividad metanogénica específica), reemplazando los valores correspondientes que se verán a continuación y tomando la variable P (pendiente) obtenida de cada una de las gráficas realizadas para cada lodo de estudio en relación al volumen de NaOH desplazado por cada uno durante la realización de la técnica por un determinado número de días.

Cálculos:

Corrección de factor para cálculos de AME:

Factor de corrección * 760 / Presión atmosférica del lugar

P atm Bogotá = 560 mmHg

Factor de corrección a 20° C y ml de CH₄ Húmedo/ g DQO = 358

Corrección = 385 * 760 / 560

Corrección = 522,5

$$AME = P * 24 / FC * V * SSV$$

Ecuación 1. Calculo de Actividad Metanogénica Específica

Actividad Metanogénica Específica de Laguna Busbanzá:

$$AME = P * 24 / FC * V * SSV$$

$$AME = 1,87 * 24 / 522,5 * 0,0011 * 37,66$$

$$AME = \mathbf{2,073 \text{ gr DQO-CH}_4 / \text{gr SSV Día}^{1,25}}$$

Actividad Metanogénica Específica de Río Quenane:

$$AME = P * 24 / FC * V * SSV$$

$$AME = 2,06 * 24 / 522,5 * 0,00651 * 99,5$$

$$AME = \mathbf{0,146 \text{ gr DQO-CH}_4 / \text{gr SSV Día}^{1,25}}$$

Actividad Metanogénica Específica Lodo Farmacéutica:

$$AME = P * 24 / FC * V * SSV$$

$$AME = 1,9 * 24 / 522,5 * 0,0145 * 466,5$$

$$AME = \mathbf{0,012 \text{ gr DQO-CH}_4 / \text{gr SSV Día}^{1,25}}$$

En el trabajo titulado “*Evaluación de la actividad metanogénica específica (AME) del sedimento la quebrada Moncovita, 2012*”²⁵ se realizó la AME de la Quebrada Moncovita siendo el cálculo el siguiente:

Actividad Metanogénica Específica de Quebrada Moncovita

$$AME = P * 24 / FC * V * SSV$$

$$AME = 0,039 * 24 / 558 * 0,295 * 6$$

$$AME = \mathbf{0,003 \text{ gr DQO-CH}_4 / \text{gr SSV Día}^{1,25}}$$

Los resultados de la AME para cada tipo de lodo revelan el grado de efectividad para la producción de metano por acción de los microorganismos presentes en los lodos nativos, donde el lodo de la laguna de Busbanzá tiene mayor producción de AME seguido del lodo del río Quenane Villavicencio reflejando valores superiores al lodo de farmacéutica y quebrada Moncovita, lo cual demuestra congruencia con los datos obtenidos y graficados del desplazamiento de NaOH al 3%, indicando la presencia de microorganismos capaces de convertir la materia orgánica en metano siendo de efectividad en las reacciones ejercidas por microorganismos en el biorreactor tomando en cuenta la correlación que se tiene con las diferentes poblaciones microbianas encontradas.

A continuación, se presenta una tabla resumen de los lodos analizados con sus características fisicoquímicas y microbiológicas, incluyendo el análisis ANOVA (95%)

Característica fisicoquímica	Lodo Laguna de Busbanzá	Lodo río Quenane	Lodo empresa farmacéutica	ANOVA (95%) P <0,05 existen diferencias significativas entre tratamientos			Tukey (95%)
	Resultado			P	F	gl	HSD
Granulometría	0,98 µm	1,07 µm	0,697 µm	1,945	17,546	8	0,13
pH	5,08	5,20	7,2	-			-
SST en lodos en estudio	1.295.000 mg/l	1.181.333 mg/l	556.917	0,019	19,380	2	533509,51
SSV en lodos en estudio	376.665 mg/l	117.250 mg/l	481.250 mg/l	0,005	47,003	2	203870,8
Relación SSV/SST	0,209	0,099	0,864	-			-
DQO	384 mg/L DQO	215 mg/L DQO	351 mg/L DQO	-			-
Número de bacterias UFC/mL	2,1 x 10 ⁴	3,68 x 10 ³	1,66 x 10 ³	0,01	7,31	3	2454
Desplazamiento de NaOH al 3%	53,33 ml	55 ml	53 ml	0,98	0,02	2	13,00

5. DISCUSIÓN

5.1 Físico-químico

La determinación de aspectos físicos y químicos radica en la importancia de conocer las condiciones iniciales que presentan los microorganismos existentes allí, esto influirá de forma favorable o no en un exitoso proceso de digestión anaerobia. Para el caso de los gránulos, se observa que el lodo que posee gránulos de mayor tamaño es el de Villavicencio, 1.07 μm , aunque el tamaño de los gránulos puede variar (0.1 - 8 mm), el diámetro promedio encontrado en reactores UASB de escala industrial o laboratorio es de 0.5 - 5 mm, este tamaño está relacionado con factores como: Tipo de nutrientes, la cantidad de sólidos, crecimiento de microorganismos, la acidez, características del sustrato. Aunque, ni el lodo de Busbanzá, Villavicencio y farmacéutico presentarán el tamaño promedio de lodos encontrados usualmente en reactores, estos tienen la capacidad de generar una biogranulación alcanzando el diámetro ideal si se trabajan factores como: Velocidad de flujo ascendente, tiempo de retención hidráulico, tasa de carga orgánica, composición de las aguas residuales, tipo de inóculo, presencia de calcio y temperatura.⁵⁸ La característica granular de los lodos se relaciona con la existencia de diversidad microbiana, como la encontrada en los lodos en estudio, esta forma de distribución en orden de capas sucesivas, donde cada población posee diferentes niveles de potencial de oxidorreducción encontrándose en la capa más profunda los microorganismos anaerobios estrictos los responsable de la producción de metano.^{71, 85}

Para el pH los lodos de Busbanzá y Villavicencio presentaron un pH 5,08 a 5,20, ácido, mientras que el lodo farmacéutico un pH 7,2 neutro, diferentes autores establecen los valores de pH donde se obtiene una digestión anaerobia más efectiva, sin embargo, estudios indican que no se puede generalizar, pues, dependiendo de las características fisicoquímicas del sustrato, que tiene capacidad buffer y además, que cada grupo microbiano implicado tiene un rango óptimo específico. Según el estudio Digestión y Codigestión Anaerobia de Residuos Agrícolas, Ganaderos y Lodos de Depuradora, para el caso de los microorganismos fermentativos, el pH óptimo está entre 5.5 - 6.5, y para los microorganismos metanogénicos no puede ser por debajo de 6.6. Para que el proceso de digestión anaerobia funcione satisfactoriamente el rango de pH es de 6.5 a 7.5, por esto, se recomienda mantenerlo cercano a la neutralidad durante el proceso. En comparación con el anterior estudio, a pesar que los lodos nativos de la laguna Busbanza y río Quenane se encuentran ligeramente por debajo del rango óptimo para el proceso de digestión anaerobia, el pH es un factor que puede ser modificado al ideal en el reactor. Cuando el pH se encuentra bajo, aumenta la producción de los ácidos grasos volátiles, lo que puede alargar los procesos de hidrólisis, adaptación microbiana y se genera biogás pobre en metano, ósea, menos cualidad energética.^{59,72, 73, 74,75,93}

El conocimiento de la concentración de sólidos totales es crucial para la eficiencia y producción de biogás, con ensayos se ha demostrado que la carga para digestores semicontinuos debe estar entre un 8% al 12% y para discontinuos entre un 40% - 60%. Sin embargo, en la literatura se menciona diferentes valores recomendables, pero, eso depende de las características del sustrato e inóculo a utilizar, por esta razón se debe definir para cada sustrato e inóculo la proporción que garantice la producción de metano.^{60, 61}

A medida que aumenta la concentración de sólidos totales es proporcional el aumento en la producción de ácidos grasos volátiles, de biogás, el contenido de metano y el aumento de bacterias funcionales, siempre y cuando exista una concentración óptima de pH y de ácidos grasos volátiles, pues, si aumenta más

del límite el contenido de sólidos, implica aumento en la viscosidad donde las bacterias metanogénicas se ven retrasadas en su crecimiento y movilidad dentro del sustrato, por lo tanto, puede verse afectada la eficiencia y producción de gas.

70, 72, 74,75

Los lodos analizados presentan alto contenido de SST, siendo el valor mayor del lodo de la laguna Busbanzá 1.295.000 mg/L, seguido por el río Quenane 1.181.333 mg/L y menor valor para el lodo de la empresa farmacéutica con 556.917 mg/L. La relación entre SSV/SST es de 0,290 para laguna Busbanzá, 0,099 para el río Quenane y el lodo farmacéutico presentó un valor de 0,864, valor similar a los que presenta un lodo granular, el cual presenta un valor entre 0,45 y 0,90.^{1,92}

En cuanto a los resultados obtenidos al determinar el DQO de cada uno de los lodos en estudio se logró determinar que el lodo que tuvo la menor cantidad de DQO fue el lodo del río Quenane (215 mg/L DQO) visto en la *Tabla 12*, lo cual se relaciona de manera inversamente proporcional con el número de bacterias obtenido en la determinación de poblaciones Bacterianas por NMP, ya que al tener una mayor cantidad de individuos por población determinada estos consumirían o degradarían mayormente la materia orgánica, por lo tanto al haber un mayor consumo de materia orgánica se obtendrá un valor más bajo al determinar el DQO, cabe también resaltar que al ser un río el agua no permanece reposada y es empujada por corrientes lo que determina también valores bajos de DQO debido a que la materia orgánica que pueda estar presente se encuentre en constante movimiento. Los lodos de la laguna Busbanzá y de la farmacéutica presentaron un comportamiento muy similar (384 mg/L DQO y 351 mg/L DQO respectivamente) tanto en la determinación del DQO como en las poblaciones bacterianas, de igual manera se relacionan la cantidad de materia orgánica determinada por DQO como la cantidad de bacterias por NMP y su relación con el consumo de la materia orgánica por los microorganismos.^{1, 33}

5.2 Microbiológico

Es importante recalcar que para la caracterización microbiológica se implementaron medios de cultivo no específicos para especies o géneros bacterianos en particular, puesto que dentro de los consorcios microbianos pueden encontrarse microorganismos no descritos o descubiertos anteriormente donde podrían verse inhibidas por componentes del medio de cultivo.⁵⁰

Los medios de cultivo utilizados con el lodo del río Quenane tales como el BAS y BFL permitió observar el crecimiento de biomasa con características diferentes a las de la turbidez comúnmente generada por el crecimiento bacteriano, esta biomasa fue aislada y repicada en un agar PDA y puesta posteriormente en anaerobiosis a 37 °C con su respectivo control negativo durante 8 días. Se obtuvo el crecimiento de un hongo carácter hialino y septado (imagen 25)

presuntivamente de género *Fusarium*, ya que este es uno de los géneros de hongos anaerobios más abundantes en el mundo y sus características macroscópicas y microscópicas concuerdan con el mismo.^{78, 79, 80}

Se considera que puede haber una relación entre los microorganismos del lodo del río Quenane y el hongo en cuestión pues se han descrito la existencia de hongos anaerobios relacionados a bacterias sulfato reductoras, arqueas acetogénicas y metanogénicas cumpliendo funciones de protección y potenciamiento de estos microorganismos a través de degradación de compuestos por acción mecánica y enzimática tales como el estudio realizado por Henrik Drake *et.al*, donde se describe hongos anaerobios fósiles y activos en sedimentos marinos del subsuelo marino donde se determinó por medio de técnicas de sincrotrón y el microanálisis de isótopos estables un acoplamiento de los hongos descritos a bacterias reductoras de sulfato.^{51, 56, 57}

Por tal motivo podría encontrarse relacionado al consorcio microbiano, ya que este demostró una gran capacidad de adaptabilidad a diferentes condiciones de temperatura, presión atmosférica, disponibilidad de recursos y humedad. Tal es esta capacidad que superó significativamente los consorcios microbianos de los lodos de la laguna Busbanzá y la empresa farmacéutica en cuanto al óptimo crecimiento microbiano del consorcio, pero aun así no hay una gran diferencia entre los microorganismos metanogénicos en cuestión, lo cual podría deberse a un posible acople del hongo a las otras poblaciones y no a las arqueas participantes en el proceso.^{54, 55, 78, 79}

Es de gran importancia denotar que los controles implementados no obtuvieron crecimiento alguno, por lo cual esto indica una correcta manipulación de los medios de cultivo y equipos necesarios para la realización de la técnica de NMP. Se implementó una temperatura de 37°C puesto que en su mayoría los microorganismos pertenecientes a consorcios microbianos son de carácter mesófilos, tales como lo son las arqueas *Methanococcus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*, entre otros. Aunque se logró evidenciar una importante diferencia entre el número de microorganismos pertenecientes a las poblaciones microbianas en cuestión, estos no reflejan una relación directamente proporcional en cuanto a la efectividad de la producción de metano.^{52, 53, 54}

En estudios similares realizados con lodos nativos como los de la quebrada Moncovita se encontraron también poblaciones microbianas como las Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG), bacterias Sulfatoredutoras del Lactato (BSRL) y Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS) (ver figura 33), lo cual puede deberse a las condiciones propias del ecosistema donde fue obtenido dicho lodo y en comparación con el presente estudio cabe resaltar la adaptabilidad que pueden generar los microorganismos a factores como la temperatura, tomando en cuenta que tanto los lodos en estudio como el lodo control positivo (lodo de farmacéutica) presentaron resultados positivos frente al cambio total del entorno y a las condiciones que se les generó para la investigación.²⁵

El estudio realizado permitió establecer que los lodos obtenidos de la laguna Busbanzá y el río Quenane presentan una diversidad microbiana ya que como se puede observar en la *Tabla 13* se presentan diferentes grupos bacterianos como BAS, BFG, BFL, BSRL, BSRA. Es decir, bacterias que hacen parte de la fase hidrolítica, fermentativa, acetogénica y metanogénica del proceso de digestión anaerobia, lo cual hace que sean considerados como posibles fuentes de inóculo de origen nativo para biodigestores utilizados para el tratamiento de aguas residuales con un alto contenido de materia orgánica.

5.3 Actividad metanogénica específica

Usando el método convencional del desplazamiento de hidróxido de sodio al 3% , fue posible determinar por medio del montaje desarrollado (*Figura 10*) la capacidad metanogénica que tenía cada tipo de lodo en generar actividad metanogénica, aunque la existencia de diferentes factores como los cambios bruscos de temperatura, presencia de oxígeno, cambios de pH, deficiencia de nutrientes, lentas tasas de digestión y degradación incompleta de partículas grandes de materia orgánica influyeron directamente a la hora de las mediciones y del desarrollo del método.^{62, 81, 82}

Mencionado lo anterior, cabe resaltar las cualidades que demostraron los lodos de la laguna Busbanzá y el río Quenane como el desarrollo de una adaptabilidad a

las condiciones ambientales por medio de los consorcios microbianos presentes en cada uno de ellos, tomando en cuenta que estos factores no impidieron que se desarrollará el proceso de digestión anaerobia dentro de los biorreactores, es decir, la generación de metano y CO₂ concluyendo así cada una de las etapas de la digestión anaerobia con éxito; superando prioritariamente conceptos importantes como lo es la temperatura y el pH como se pudo observar principalmente en el lodo del río Quenane, Villavicencio cuyo valor en el desplazamiento de Hidróxido de Sodio fue de 55 ml por 30 días y no se vio afectado (ver *anexo 25*), lo cual permite confirmar porque el uso de tecnología anaerobia es una buena opción de tratamiento para productos vertidos en la industria alimenticia, agrícola y sobre todo farmacéutica.⁶³

Se evidenció la efectividad de los lodos nativos con respecto al control (lodo empresa farmacéutica), tiempo, sustrato empleado (Ácido acético) y volumen desplazado destacándose la biodiversidad de microorganismos presentes en los lodos nativos para la implementación en procesos de tratamiento biológico. Esta biodiversidad presente en los lodos ha sido evaluada en plantas de tratamiento industrial con estudios metagenómicos que demuestran que gracias a la presencia de diferentes consorcios microbianos la producción de metano puede ser mucho más eficaz, donde géneros como *Methanosaeta* y *Methanosarcina* han sido los principales metanógenos presentes. Los cuales se pueden presentar posiblemente en los lodos nativos.^{64, 65, 88, 89}

La AME obtenida para el lodo de la laguna de Busbanzá, 2,073 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día y el río Quenane, 0,146 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día fue superior en comparación a la que se obtuvo del lodo de la empresa farmacéutica, 0,012 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día. Sin embargo, el desplazamiento de NaOH al 3% indicó producción de metano similar en los tres lodos de estudio no diferenciándose estadísticamente ($P=0,98$; $F=0,02$ $gl=2$) en cada tratamiento. El lodo generado en la empresa farmacéutica al provenir de descargas elevadas de sustancias químicas como lo son los antibióticos; puede causar la disminución de la AME porque en estas industrias se vierten contaminantes químicos que generan toxicidad, alto contenido salino y, por lo tanto, disminución en la población microbiana.^{63, 83, 90}

Con respecto al lodo farmacéutico usado ya en reactores UASB para el tratamiento biológico de las aguas residuales, no fue identificada la concentración ni sustancias químicas presentes. Por lo tanto, puede inferir que existan inhibidores de la capacidad metanogénica de los consorcios microbianos que se encuentren en el proceso de digestión anaerobia. Algunos inhibidores que fueron reportados en la literatura por diferentes estudios son los compuestos que interfieren en los procesos metabólicos de los microorganismos y que son clasificados en dos grupos: *Inhibidores inespecíficos* e *Inhibidores específicos*.^{66, 84, 91}

El cloro mencionado en diferentes estudios es un claro ejemplo de inhibidor inespecífico debido a que se ha encontrado que puede bloquear la función de las enzimas corrinoides e inhibir la metil-coenzima M reductasa en los metanógenos, inhibiendo la metanogénesis y parcialmente la reducción de sulfato dependiente de acetato empleado para la producción de H₂, como también se ha encontrado efectos de inhibición por parte de la presencia de concentraciones de amonio que interfieren en el sistema de digestión anaerobia afectando el pH, la temperatura y el inóculo de lodo (población microbiana).^{66, 67, 68}

Al mismo tiempo, el 2-bromoetanosulfonato de sodio (BES) es un análogo de la coenzima M (2-mercaptoetanosulfonato) utilizada en la fase final de la metanogénesis, lo cual lo convierte en un inhibidor específico de esta ruta metanogénica, asimismo se ha encontrado que una dosis baja (1.0 mM) de BES es suficiente para inhibir la metanogénesis acetoclásica y con una dosis alta (50 mM) se inhibe completamente el CO₂.^{66, 69}

Cabe aclarar que este tipo de inhibición generada por diferentes sustancias no representan un dato negativo, debido a que al inhibir ciertas etapas de la digestión anaerobia se pueden obtener mayor concentración de energía, gases y selección de consorcios microbianos que posean resistencia a diferentes ambientes, aunque se debe mencionar que la presencia de antibióticos en este tipo de lodos también puede generar resistencias microbianas representando un posible problema a futuro.^{77, 86, 87}

En cuanto al lodo proveniente de la quebrada Moncovita observamos que el ensayo de determinación de la capacidad metanogénica específica (AME) fue diferente a el realizado en este estudio, pues para ello las autoras implementaron

un volumen final de 500 ml, mientras que el ensayo en este estudio fue llevado a un volumen final de 60 ml. La quebrada Moncovita posee una actividad metanogénica específica baja, 0,003 DQO-CH₄ / gr SSV Día en comparación con las obtenidas en la laguna Busbanzá 2,073 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, río Quenane 0,146 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, y Farmacéutica 0,012 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día, esto podría deberse a las poblaciones encontradas en el lodo de la quebrada Moncovita. Estas poblaciones demostraron una baja concentración al realizar la técnica de NMP en comparación a los lodos en estudio, este consorcio microbiano pudo sufrir algún tipo de inhibición al momento de realizar la determinación de la actividad metanogénica específica, ya sea por la naturaleza química del sustrato implementado o las condiciones físicas a las que fueron sometidas en el estudio.²⁵

Al comparar los valores obtenidos de AME de los lodos nativos con la AME de los lodos granulares que están entre 0,2 y 1,9 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día¹ y de los sedimentos de laguna entre 0,002 – 0,005 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día¹, se puede establecer que los lodos tomados de la Laguna Busbanzá y del Río Quenane tienen una buena biomasa con capacidad para transformar la materia orgánica en metano y cumplen con las características de AME de un lodo granular.¹ Lo cual concuerda con las poblaciones microbianas encontradas de todas las fases de proceso de digestión anaerobia, como en la fase hidrolítica, las Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG) y las Bacterias Fermentadoras de Lactosa (BFL). En la fase fermentativa se encontraron las bacterias Sulfatoredutoras del Lactato (BSRL), en la fase acetogénica se encuentran las Bacterias Sulfatoredutoras del Acetato (BSRA) y en la fase metanogénica se encontraron las Bacterias Anaerobias Estrictas (BAS).

6. CONCLUSIONES

- El análisis fisicoquímico a los lodos procedentes de la Laguna de Busbanzá (Boyacá) y el Río Quenane de Villavicencio (Meta), estableció que los lodos presentan un tamaño de gránulo de 0,98 μm, 1.07 μm y 0,697 μm en el lodo

de la laguna Busbanzá, río Quenane y Farmacéutica respectivamente; pH de 5,08, 5,20 y 7,2 en el lodo de la laguna Busbanzá, río Quenane y Farmacéutica respectivamente; SST de 1.295.000 mg/L, 1.181.333 mg/L y 556.917 mg/L en el lodo de la laguna Busbanzá, río Quenane y Farmacéutica respectivamente; SSV de 376.665, 117.250 y 481.250 en el lodo de la laguna Busbanzá, río Quenane y Farmacéutica respectivamente; Relación SSV/SST de 0,290, 0,099 y 0,864 en el lodo de la laguna Busbanzá, río Quenane y Farmacéutica respectivamente; DQO de 215 mg/L DQO, 384 mg/L DQO y 351 mg/L DQO en el lodo del río Quenane, laguna Busbanzá y Farmacéutica respectivamente. Según el ANOVA (95%) realizado hay diferencias significativas entre los lodos frente a los parámetros de granulometría, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles, la diferencia significativa esta entre los lodos nativos frente al lodo de empresa farmacéutica.

- La caracterización microbiológica realizada de los lodos muestreados de la laguna de Busbanzá y el río Quenane demostraron la presencia de poblaciones microbianas como BAS, BFG, BFL, BSRL, BSRA, es decir, los lodos nativos procedentes de lagos y ríos son una fuente de inóculo que se debe tener en cuenta para procesos de digestión anaerobia porque como se observó en este estudio tienen una variedad en población microbiana y en el lodo procedente de la empresa farmacéutica se identificó menor cantidad poblaciones microbianas como BAS, BFL, BSRL y BSRA debido a que se presume presencia de sustancias inhibitorias o tóxicas como cloro, fenoles y antibióticos disminuyendo así que se pueda convertir la materia orgánica en metano reflejado en los valores obtenidos de AME del presente estudio. El ANOVA (95%) estableció diferencias significativas entre los lodos estudiados ($P= 0,001$; $F= 7,31$; $gl= 3$) siendo mejor los lodos procedentes de la laguna y el Río Quenane.
- La relación entre la AME (Actividad Metanogénica Específica) de los lodos muestreados del río Quenane Villavicencio y de la laguna, Busbanzá y las poblaciones microbianas presentes de todas las fases del proceso de digestión anaerobia permiten proponerlos como fuentes de inóculos para

biorreactores utilizados en el tratamiento de aguas residuales industriales con alto contenido de materia orgánica.

- El lodo de laguna, Busbanzá posee la mayor actividad metanogénica específica (AME), 2,073 gr DQO-CH₄ / gr SSV Día¹, de los lodos en estudio de acuerdo a los resultados obtenidos, demostrando existencia de consorcios naturales colombianos con buena capacidad para convertir la materia orgánica en metano, cumpliendo con los intervalos de un lodo granular.

7. Recomendaciones

- Se recomienda el uso de técnicas moleculares para la determinación de los microorganismos pertenecientes a los consorcios microbianos hallados en los lodos en estudio.
- Se recomienda el uso de técnicas que permitan una cuantificación más exacta o precisa de la producción de metano tal como lo es la determinación de metano por medio de la cromatografía de gases.

- Se recomienda realizar estudios de AME con diferentes sustratos, al igual de estudios de inhibición por sustancias químicas para poder así determinar la viabilidad de los lodos para ser implementados en el tratamiento de aguas residuales.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz-Báez M, Espitia Vargas S, Molina Pérez F. Digestión anaerobia. Bogotá, D.C. Universidad Nacional de Colombia. 2002.
2. Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Kamagata, Y., Ohashi, A. and Harada, H. (2008). *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2008;58(1):294-301.
3. Acuña González, P., Ángel García, L., Borray Montoya, E., Corrales Ramírez MSC, L. and Sánchez Leal MSC, L. Aislamiento e identificación de microorganismos del género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá D.C. *Nova*.2008;6(10):156.

4. del Real Olvera, J. and Islas Gutiérrez, J. Biodegradación anaerobia de las aguas generadas en el despulpado del café. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2010;12(2):230-239.
5. Torres Lozada, P. and Pérez, A. ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECÍFICA: UNA HERRAMIENTA DE CONTROL Y OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*. 2010; 9:5-14.
6. Gao, W., Leung, K., Qin, W. and Liao, B. Effects of temperature and temperature shock on the performance and microbial community structure of a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*. 2011;102(19):8733-8740.
7. Huang, J., Liu, L., Shao, Y., Song, H., Wu, L. and Xiao, L. Study on Cultivation and Morphology of Granular Sludge in Improved Methanogenic UASB. *Applied Mechanics and Materials*.2012;209-211:1152-1157.
8. Méndez-Novelo, R., Chan-Gutiérrez, E., Castillo-Borges, E., Vázquez-Borges, E. and Espadas-Solís, A. Digestión anaerobia de efluentes de fosas sépticas. *Ingeniería, investigación y tecnología*. 2012;13(3):339-349.
9. Galvis Toro, J., Rivera Guerrero, X. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los lodos presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales (PTARI) de la empresa jugos hit en la ciudad de Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira.2013.
10. Martínez, A. Optimización de la producción de metano a partir de la cogestión anaerobia de residuos orgánicos. Universidad Nacional Autónoma De México.2013.
11. Feng, Y., Lin, X., Yu, Y., Zhang, H., Chu, H. and Zhu, J. Elevated ground-level O₃ negatively influences paddy methanogenic archaeal community. *Scientific Reports*.2013;3(1).
12. Bialek, K., Cysneiros, D. and O'Flaherty, V. Hydrolysis, acidification and methanogenesis during low-temperature anaerobic digestion of dilute dairy wastewater in an inverted fluidised bioreactor. *Applied Microbiología and Biotechnology*. 2014;98(20):8737-8750.
13. Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A. and Ahmad Asad, S. Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *The Scientific World Journal*. 2014:1-21.
14. Cesaro, A., Velten, S., Belgiorno, V. and Kuchta, K. Enhanced anaerobic digestion by ultrasonic pretreatment of organic residues for energy production. *Journal of Cleaner Production*. 2014; 74:19-124.

15. Westerholm, M., Müller, B., Isaksson, S. and Schnürer, A. Trace element and temperature effects on microbial communities and links to biogas digester performance at high ammonia levels. *Biotechnology for Biofuels*. 2015;8(1).
16. Nikitina, A., Kevbrina, M., Kallistova, A., Nekrasova, V., Litti, Y. and Nozhevnikova, A. Intensification of microbial decomposition of organic fraction of municipal waste: Laboratory and field experiments. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015;51(4):393-401.
17. Yu, H., Wang, Z., Wu, Z. and Zhu, C. Enhanced waste activated sludge digestion using a submerged anaerobic dynamic membrane bioreactor: performance, sludge characteristics and microbial community. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
18. Wang, Q., Liang, Y., Zhao, P., Li, Q., Guo, S. and Chen, C. Potential and optimization of two-phase anaerobic digestion of oil refinery waste activated sludge and microbial community study. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
19. Lin, Q., He, G., Rui, J., Fang, X., Tao, Y., Li, J. and Li, X. Microorganism-regulated mechanisms of temperature effects on the performance of anaerobic digestion. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1).
20. Hussain, A. and Dubey, S. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Applied Water Science*. 2015;7(2):535-542.
21. Gryta, A., Oszust, K., Brzezińska, M., Ziemiński, K., Bilińska-Wielgus, N. and Frąc, M. Methanogenic community composition in an organic waste mixture in an anaerobic bioreactor. *International Agrophysics*. 2017;31(3):327-338.
22. Gladchenko, M., Kovalev, D., Kovalev, A., Litti, Y. and Nozhevnikova, A. Methane production by anaerobic digestion of organic waste from vegetable processing facilities. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(2):242-249.
23. García-Mancha, N., Monsalvo, V., Puyol, D., Rodriguez, J. and Mohedano, A.. Enhanced anaerobic degradability of highly polluted pesticides-bearing wastewater under thermophilic conditions. *Journal of Hazardous Materials*. 2017; 339:320-329.
24. Chen, Z., Xu, J., Hu, D., Cui, Y., Wu, P., Ge, H., Jia, F., Xiao, T., Li, X., Su, H., Wang, H. and Zhang, Y. Performance and kinetic model of degradation on treating pharmaceutical solvent wastewater at psychrophilic condition by a pilot-scale anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*. 2018; 269:319-32.

25. Gonzalez, O *et. al.* Evaluación de la actividad metanogénica específica (AME) del sedimento de la Quebrada la Moncovita. Universidad College Mayor de Cundinamarca. 2012.
26. Tchobanoglous, G., Burton, F. and Stensel, H. Wastewater engineering. New York: McGraw-Hill. 2004.
27. Vasquez, J. Vargas, G. Aprovechamiento de lodos planta de tratamiento de aguas residuales municipio de Funza, como insumo de cultivo y mejoramiento del suelo. Universidad Católica de Colombia Facultad De Ingeniería. 2018
28. ASALE, R. *agua*. [online] «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. 2018. Available at: <https://dle.rae.es/?id=1BKpQj3> [Accessed 26 Sep. 2019].
29. Colombia-sa.com. *Hidrografía de Colombia*. [online]. 2019. Available at: <https://www.colombia-sa.com/geografia/geografia2.html> [Accessed 26 Sep. 2019].
30. Mapa de escasez de agua en el mundo. *El mapa de escasez de agua que amenaza a la mitad del mundo*. [online]. 2017. Available at: <https://www.dinero.com/edicion-impres/la-grafica/articulo/mapa-de-escasez-de-agua-en-el-mundo/243940> [Accessed 26 Sep. 2019].
31. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente. Decreto 2811 del 18 de diciembre de 1974.
32. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Decreto 1076 de 2015.
33. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Decreto 3930 del 25 de octubre del 2010.
34. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 631 del 7 de marzo del 2015.
35. Foro Económico Mundial. *La economía del agua cada vez será más importante*. [online]. 2019. Available at: <https://es.weforum.org/agenda/2017/03/la-economia-del-agua-cada-vez-sera-mas-importante/> [Accessed 25 Sep. 2019].
36. Ideam.gov.co. *Autoridades Ambientales - IDEAM*. [online]. 2019. Available at: <http://www.ideam.gov.co/web/ocga/autoridades> [Accessed 25 Sep. 2019].
37. Corrales, L., Antolinez Romero, D., Bohórquez Macías, J. and Corredor Vargas, A. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 2015;13(24):55.

38. Lorenzo Acosta, Y. and Obaya Abreu, M. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. 2005; XXXIX(1):35-48.
39. MANUAL DE BIOGÁS. [evos] Santiago de Chile: Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables". 2011:11-62. Available at: <http://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf> [Accessed 8 May 2019].
40. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Política Nacional para la Gestión Integral del Recurso Hídrico. 2010
41. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Política Nacional para la Gestión integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos(PNGIBSE).2011
42. Corrales, L., Antolínez Romero, D., Bohórquez Macías, J. and Corredor Vargas, A. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Nova. 2015;13(24):55-81.
43. Olguín Pérez, L. Rodríguez Magadán, H. Cromatografía de gases. Universidad Nacional Autónoma de México. 2004
44. Veiga Barbazán, M. Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB). Inditex. FT-BIO-009. 2015.
45. Ramos Alvariño, C. Los residuos en la industria farmacéutica. CENIC. 2006;37(1).
46. Tejada, C. Quiñónez, E. Peña, M. CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS: METABOLITOS DE FÁRMACOS. UNA REVISIÓN. Facultad de Ciencias Básicas. 2014;10(1).
47. Velásquez Arias, J. Análisis de PPcPs (*pharmaceutical and personal care products*) en aguas residuales y suelos. RIAA. 2016;7(2).
48. Mora Collazos, A. and Bravo Montaña, E. Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente. *Acta Biológica Colombiana*. 2017;22(1):27.
49. E. Zavaleta. Los ácidos volátiles, fuente de energía de los rumiantes. Departamento de Nutrición y Bioquímica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005.
50. Xiao, D., Peng, S. and Wang, E. Fermentation Enhancement of Methanogenic Archaea Consortia from an Illinois Basin Coalbed via DOL Emulsion Nutrition. *PLOS ONE*. 2015;10(4): e0124386.

51. Cheng, Y., Shi, Q., Sun, R., Liang, D., Li, Y., Li, Y., Jin, W. and Zhu, W. The biotechnological potential of anaerobic fungi on fiber degradation and methane production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018;34(10).
52. Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, E., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., Yamaguchi, T., Tomaru, H., Takeuchi, R., Morono, Y., Inagaki, F. and Takai, K. Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *The ISME Journal*. 2011;5(12):1913-1925.
53. Kern, T., Rother, M. and Linge, M. (). *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(6):1975-1980.
54. Enzmann, F., Mayer, F., Rother, M. and Holtmann, D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express*. 2018;8(1).
55. Wojcieszak, M., Pyzik, A., Poszytek, K., Krawczyk, P., Sobczak, A., Lipinski, L., Roubinek, O., Palige, J., Sklodowska, A. and Drewniak, L. Adaptation of Methanogenic Inocula to Anaerobic Digestion of Maize Silage. *Frontiers in Microbiology*. 2017:8.
56. Dollhofer, Veronika & Podmirseg, Sabine & Callaghan, Tony & Griffith, G.W. & Fliegerová, Katerina. Anaerobic Fungi and Their Potential for Biogas Production. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2015;151: 41-61.
57. Drake, H., Ivarsson, M., Bengtson, S., Heim, C., Siljeström, S., Whitehouse, M., Broman, C., Belivanova, V. and Åström, M. Anaerobic consortia of fungi and sulfate reducing bacteria in deep granite fractures. *Nature Communications*. 2017;8(1).
58. Mancera, M. Efectos de la tasa de la carga sobre la estabilidad de los lodos granulares. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. 2011.
59. Parra, B. *et al.* Influencia del pH sobre la digestión anaerobia de biorresiduos de origen municipal. *U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 2014;17(2):553-562
60. Yi J, Dong B, Jin J, Dai X. Effect of increasing total solids contents on anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: performance and microbial characteristics analysis. *PLoS One*. 2014;9(7).

61. Kelly Orhororo, E. (). Experimental Determination of Effect of Total Solid (TS) and Volatile Solid (VS) on Biogas Yield. *American Journal of Modern Energy*. 2017;3(6):131.
62. Zhu, H., Parker, W., Conidi, D., Basnar, R. and Seto, P. Eliminating methanogenic activity in hydrogen reactor to improve biogas production in a two-stage anaerobic digestion process co-digesting municipal food waste and sewage sludge. *Bioresource Technology*. 2011;102(1):7086-7092.
63. Shi, X., Leong, K. and Ng, H. (). Anaerobic treatment of pharmaceutical wastewater: A critical review. *Bioresource Technology*. 2017; 245:1238-1244.
64. Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F., Tang, D., Fung, W., Fang, H. and Zhang, T. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(12):5709-5718.
65. Wang, M., Sahu, A., Rusten, B. and Park, C. (). Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technology*. 2013;142:585-590.
66. Xu, K., Liu, H. and Chen, J. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion. *Bioresource Technology*. 2010;101(8):2600-2607.
67. Yenigün, O. and Demirel, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry*. 2013;48(5-6):901-911.
68. Feng, Y., Zhang, Y., Quan, X. and Chen, S. Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron. *Water Research*, 2014;52:242-250.
69. Arenas I, Rojas G, G N. Efecto de un inhibidor sobre la producción de CO₂ y CH₄ de un cultivo microbiano proveniente de un pozo petrolero. ResearchGate. 2012.
70. Parra, B. *et al.* Efecto de la relación sustrato-inóculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 2015;16(4):515-526
71. Cajacuri, M. Rincón, N. Behling, E. Colina, G. Marín, J. Araujo, I. Diversidad microbiológica del lodo anaerobio durante el tratamiento de aguas de producción petroleras venezolanas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 2013;14(3):325-334
72. Núñez, L. Modelamiento y control de proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás a partir de residuos orgánicos y/o aguas residuales

(Tesis de Máster en Ingeniería Mecánico-Eléctrica con Mención en Automática y Optimización). Universidad de Piura. Facultad de Ingeniería. Piura, Perú. 2017.

73. Chiva, S. Guillermo, J. Martínez, R. Climent, J. Depuración de aguas residuales: digestión anaerobia. Universitat Jaume I. 2018.
74. Crombet, S. Abalos, A. Rodríguez, S. Pérez, N. Evaluación del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de una comunidad universitaria [Internet]. Colombo. Biotecnol. 2016;18(1):49-56
75. Sospedra, C. Estudios de optimización y diseño del proceso de digestión anaerobia para la EDAR de ALCOI. Universitat Politècnica de Valencia. 2017
76. García N. Lodos residuales: estabilización y manejo 1st ed. Chetumal, México: Caos Conciencia. 2006
77. Amorim, N., Amorim, E., Kato, M., Florencio, L. and Gavazza, S. The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. *Biodegradation*. 2017;29(1):41-58.
78. Kurakov, A., Khidirov, K., Sadykova, V. and Zvyagintsev, D. Anaerobic growth ability and alcohol fermentation activity of microscopic fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(2):169-175.
79. Amorim, N., Amorim, E., Kato, M., Florencio, L. and Gavazza, S. The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. *Biodegradation*. 2017;29(1):41-58.
80. Griffith, G., Callaghan, T., Podmirseg, S., Hohlweck, D., Edwards, J., Puniya, A. and Dagar, S. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycologyKeys*. 2015;9:11-28.
81. Nakazawa, M., Florencio, L., Kato, M., Gavazza, S. and Sanz, J. Effects of the operational conditions on the production of 1,3-propanediol derived from glycerol in anaerobic granular sludge reactors. *Water Science and Technology*. 2016;75(4):963-970.
82. Emilson, E., Carson, M., Yakimovich, K., Osterholz, H., Dittmar, T., Gunn, J., Mykytczuk, N., Basiliko, N. and Tanentzap, A. Climate-driven shifts in sediment chemistry enhance methane production in northern lakes. *Nature Communications*. 2018;9(1).
83. Hao, L., Mazéas, L., Lü, F., Grossin-Debattista, J., He, P. and Bouchez, T. Effect of ammonia on methane production pathways and reaction rates in

- acetate-fed biogas processes. *Water Science and Technology*. 2017;75(8):1839-1848.
84. Munisamy, P., Ravichandran, M., Natarajan, S. and Varadhaaraju, C. BIOLOGICAL ASPECTS OF ANAEROBIC DIGESTION AND ITS KINETICS: AN OVERVIEW. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2017;6(4):1090-1097.
85. Zamanzadeh, M., Hagen, L., Svensson, K., Linjordet, R. and Horn, S. Biogas production from food waste via co-digestion and digestion- effects on performance and microbial ecology. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
86. Candry, P., Van Daele, T., Denis, K., Amerlinck, Y., Andersen, S., Ganigué, R., Arends, J., Nopens, I. and Rabaey, K. A novel high-throughput method for kinetic characterisation of anaerobic bioproduction strains, applied to *Clostridium kluyveri*. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
87. Candry, P., Van Daele, T., Denis, K., Amerlinck, Y., Andersen, S., Ganigué, R., Arends, J., Nopens, I. and Rabaey, K. A novel high-throughput method for kinetic characterisation of anaerobic bioproduction strains, applied to *Clostridium kluyveri*. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
88. Gryta, A., Oszust, K., Brzezińska, M., Ziemiński, K., Bilińska-Wielgus, N. and Frąç, M. Methanogenic community composition in an organic waste mixture in an anaerobic bioreactor. *International Agrophysics*. 2017;31(3):327-338.
89. Carr, S., Schubotz, F., Dunbar, R., Mills, C., Dias, R., Summons, R. and Mandernack, K. Acetoclastic Methanosaeta are dominant methanogens in organic-rich Antarctic marine sediments. *The ISME Journal*. 2017;12(2):330-342.
90. Wenner, B., Wagner, B., Yu, Z., St. Pierre, N. and Firkins, J. 1613 Inhibition of methanogenesis by nitrate, with or without defaunation, in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 2016;94(suppl_5):785-785
91. Hu, L., Long, Y. and Fang, C. Effect of Dissimilatory Iron Reduction on the Reduction of CH₄ Production in Landfill Conditions. *Journal of Chemistry*. 2019:1-10.
92. Crombet, S., Abalos, A., Rodriguez, S. Evaluación del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de una comunidad universitaria. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2016;18(1):49-56.
93. Arhoun, B. DIGESTIÓN Y CODIGESTIÓN ANAEROBIA DE RESIDUOS AGRÍCOLAS, GANADEROS Y LODOS DE DEPURADORA. Universidad de Málaga. Facultad de Ciencias. Málaga. 2017.

94. GRUPO AGUA SUBDIRECCIÓN DE GESTIÓN Y CONTROL AMBIENTAL. DOCUMENTO IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE USUARIOS Y ESTADO DE LAS FUENTES HÍDRICAS PRIORIZADAS. CORMACARENA Y ECOPETROL S.A. 2018.
95. Información general de Busbanzá. Alcaldía del municipio de Busbanzá. 2015.
96. APHA. Manual de procedimientos analíticos para agua y efluentes, Ministerio de Vivienda. Dir Nac medio Ambient Montevideo, Uruguay. 1996
97. Tran, Toan. "Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 23nd Edition." Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 23nd Edition,

8. ANEXOS

Granulometría lodo Busbanzá		
Agar 1	Agar 2	Agar 3
0,8	0,7	0,8

2	1,2	0,9
1,3	0,6	0,9
1,2	1	1,2
0,7	0,8	3,2
1,2	1,6	0,9
1	2,1	1,5
1,3	0,7	0,8
0,7	0,7	1
1,3	0,8	1,6
0,8	0,8	0,7
0,6	0,7	0,4
1	0,8	0,6
1	0,6	0,8
0,9	0,5	0,7
0,8	0,6	1
0,7	0,5	1,4
0,6	0,7	0,9
0,9	1,6	1,1
0,8	1,2	0,8
0,5	1	0,6
0,6	1,3	0,8
1,1	0,7	1,1
0,8	0,6	0,7
1,3	0,9	0,9
1,2	0,8	1,1
0,7	1,4	1,7

0,5	1	0,7
0,7	0,7	1
0,7	1,1	1,1
0,9	1,6	1,3
1,1	1,1	1,6
1	0,6	1,3
0,9	0,9	1,1
1,6	0,6	1,3
1,6	0,8	0,7
1,3	0,8	0,8
0,9	0,9	0,9
0,8	1,6	1,1
2	1,4	1,1
0,7	0,7	1,3
0,5	0,6	0,8
2	1,1	0,7
0,8	0,8	2
0,7	2	0,8
0,9	1,4	1
1,2	1	1,3
0,8	0,6	0,7
0,8	1	1,1
1,1	1,5	0,7
0,9	0,9	0,9
0,8	1,3	1,5
1,1	1,4	0,8

0,8	1,6	0,9
1,3	0,6	0,7
0,9	0,8	0,7
1,2	1	0,8
0,7	3,7	1,5
1,8	1,2	1,1
1,5	1,6	0,7
1,4	0,5	0,7
0,8	0,6	0,6
0,8	0,7	0,9
2	0,5	1,4
1,1	1,1	1
0,9	1	1
1,1	0,4	1,6
0,9	1	0,7
0,8	0,9	1,6
0,5	0,1	0,8
0,6	1,2	1,8
1,2	0,8	1,1
0,7	0,9	0,5
0,4	1	0,8
2	0,8	1,5
0,6	0,7	1,3
0,5	0,9	0,7
0,8	1,1	1
0,6	0,4	1

1,2	0,7	1,2
1,3	0,5	0,9
0,7	1	1,1
1,1	1,6	0,7
0,5	0,9	0,8
0,8	1	1
1,2	1,3	1,2
0,5	1,1	0,8
0,7	0,8	0,9
2	1,2	0,6
1,3	1	1,3
1	0,9	1
1,4	0,8	1,2
1	0,5	1
0,7	1,3	1,3
0,9	0,7	0,7
0,8	1,1	1,1
1,1	0,9	0,8
0,7	0,8	0,5
0,5	1	0,8
0,8	0,6	0,6
0,982	0,971	1,016
PROMEDIO		0,989
DESVIACIÓN ESTÁNDAR		0,40
COEFICIENTE DE VARIANZA %		40,93

Anexo 1. Granulometría lodo laguna de Busbanzá, Boyacá

Granulometría lodo Villavicencio		
Agar 1	Agar 2	Agar 3
1,3	0,4	1,2
1	1,3	2,1
1,5	0,7	2
1,3	0,5	1,1
0,8	0,5	1
1,3	0,7	0,6
1,5	0,8	1
0,9	0,7	0,6
3	0,8	1,1
1,6	1	1
0,7	1,3	0,8
0,8	0,6	1,2
0,6	1,1	0,9
1	0,9	1,8
1,1	0,6	1,6
1,2	0,9	0,7
1	0,6	2,6
2	0,7	1,2
0,8	0,6	0,8
1,3	0,7	1
1,4	0,5	0,9
0,7	0,1	1,1

0,8	1,4	0,5
1,2	1,2	1,2
1,2	2,8	0,9
2	1,2	0,6
0,4	0,8	0,7
2,6	1,3	1
1,6	1,5	1,4
0,8	2	0,7
1,7	1,8	1,1
0,6	1	0,6
0,8	2,1	0,5
1,3	1,6	1,2
0,6	2,4	0,6
1,3	0,8	1,1
1,4	0,8	0,7
0,6	0,9	2,2
0,7	2,7	1,3
2,1	0,6	1
1,3	0,6	0,8
1,2	1,1	1,3
1,3	1,1	1,6
0,7	2	1,1
0,4	0,7	0,9
1,2	1	0,8
1,3	2	0,7
0,6	0,5	0,6

0,8	1,6	1,1
0,8	0,7	0,9
1,3	0,7	0,5
3,1	0,8	0,6
2,6	1,5	1,2
0,9	1,1	1
1,2	0,5	1,1
1,2	2,1	0,8
0,9	0,7	0,6
0,6	1,4	1,3
0,7	1,6	0,9
0,9	0,9	0,6
0,5	1,1	1
0,8	0,6	0,9
1,9	0,7	1
1,4	0,7	1,1
1,2	0,4	0,9
2,5	0,4	1,3
1,2	0,9	0,8
0,7	0,7	0,9
0,5	0,5	0,7
0,6	1	1,3
0,9	0,7	1
1,2	1,8	1,4
2,3	0,8	0,9
1,1	0,6	0,5

0,8	1,3	0,6
1	0,8	0,9
0,6	2,6	1,1
1,5	0,5	1
0,9	1	1,3
0,7	1,5	0,8
0,9	2	0,8
0,8	0,8	0,5
1	0,6	1,3
1,1	0,5	2
1,3	1,1	1,7
1,2	1,1	0,5
0,8	1,5	0,7
0,5	0,9	1
1,1	2,3	0,9
1,6	1,3	1,3
0,7	1,2	1,1
0,5	0,8	0,8
1,4	1,3	0,9
0,7	0,9	0,6
1,2	1	1,6
1,6	0,7	0,7
1,2	0,7	1,2
1	1	1,3
0,7	0,7	1
0,8	0,6	1,3

1,139	1,051	1,026
PROMEDIO		1,072
DESVIACIÓN ESTÁNDAR		0,50
COEFICIENTE DE VARIANZA %		46,83

Anexo 2. Granulometría lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta

Granulometría lodo empresa Farmacéutica		
Agar 1	Agar 2	Agar 3
0,5	0,4	0,6
0,7	0,7	0,7
0,8	0,5	0,8
0,7	0,4	1,2
0,4	0,7	0,7
0,4	0,4	0,8
0,7	0,6	0,6
0,6	0,8	1,1
0,4	1	0,5
0,5	0,7	0,8
0,3	0,8	0,4
0,7	0,6	1
0,9	0,6	0,8
0,4	0,5	1
0,8	0,9	0,6
0,9	0,5	0,7
1,5	0,3	0,7

0,7	0,6	0,5
0,9	0,9	0,7
1,8	0,5	0,6
0,7	0,7	0,5
0,5	0,7	0,4
0,9	0,5	0,4
0,8	0,5	0,4
0,3	0,4	0,3
0,4	0,4	1
0,7	0,6	0,5
1,3	1,2	0,7
0,7	1,4	1
0,6	0,7	0,5
0,6	0,8	1,3
0,7	0,4	0,5
0,9	0,5	0,6
0,8	0,8	1
0,5	1	0,4
0,6	0,4	0,5
0,9	0,5	0,6
0,7	0,6	0,7
0,4	0,5	1,5
0,7	0,6	0,5
0,9	0,4	0,6
0,3	0,9	0,3
0,6	0,5	0,5

1	2	0,5
0,6	0,5	0,7
0,4	1,2	0,4
0,5	0,5	0,5
1,4	0,5	0,7
0,6	0,5	0,6
0,8	0,4	0,6
0,9	0,3	0,3
1,3	1	0,5
0,9	0,8	0,6
0,6	0,7	3
1,2	0,4	0,6
0,7	0,4	0,5
0,5	0,5	0,5
0,9	0,3	0,3
1,4	0,5	0,6
1,5	0,7	0,6
1	0,6	0,7
0,8	0,7	0,5
0,7	0,9	0,5
0,9	0,6	0,7
0,5	0,3	0,8
0,7	0,5	0,5
0,8	0,6	1
1	0,6	0,8
0,9	0,9	0,9

0,6	1	2,4
0,5	0,5	0,7
0,7	0,4	0,5
0,6	0,6	0,6
0,9	0,7	0,5
0,5	0,3	0,8
0,9	0,5	0,6
0,6	0,6	0,6
0,5	0,8	0,7
0,7	0,7	0,7
1,4	0,5	0,6
0,9	0,4	0,8
1,3	0,6	0,6
0,2	0,9	0,4
0,7	1,3	0,4
0,6	0,5	0,3
0,5	0,4	0,6
0,4	0,7	0,4
0,9	0,5	0,8
0,4	1,1	0,6
0,5	0,9	2,3
0,7	0,8	0,5
0,8	0,6	0,4
0,9	0,5	0,6
1	0,6	0,5
1,3	0,7	0,5

0,5	0,9	0,7
0,7	0,6	0,7
0,6	0,5	0,5
2	0,2	0,3
0,4	0,7	1,1
0,758	0,643	0,69
PROMEDIO		0,69
DESVIACIÓN ESTÁNDAR		0,33
COEFICIENTE DE VARIANZA %		48,42

Anexo 3. Granulometría lodo de empresa farmacéutica

ANOVA	
P	1,945 E-24
F	17,546
Grados de libertad	8
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?	Si

Anexo 4. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos del procedimiento granulometría para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

TUKEY

HSD=	0,13	
Diferencias entre lodos en estudio		
Dif. Busbanzá y Villavicencio	Dif. Busbanzá y Farmacéutica	Dif. Villavicencio y Farmacéutica
-0,08	0,29	0,37
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?		
No	Si	Si

Anexo 5. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos del procedimiento granulometría para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

PESO DE CÁPSULAS	P1	P2	P3	SST mg/l	SSV mg/l	Promedio sst mg/l	Desviación estándar	Coficiente de Varianza %	Promedio ssv mg/l	Desviación estándar	Coficiente de Varianza %
Lodo Farmacéutico	29,21	46,41	30,21	573333,33	540000	556917	23217	4	481250	83085,046	17,26
	20,07	30,88	22,43	540500	422500						
Lodo Busbanzá	32,49	67,02	65,94	1151000	36000	1295000	203647	16	37665	2357,022	6,25
	18,34	61,51	60,33	1439000	39333,33						
Lodo Villavicencio	27,82	61,5	57,66	1122666,66	128000	1181333	82967	7	117250	15202,795	12,96
	18,32	43,12	40,99	1240000	106500						

Anexo 6. SST y SSV en lodos en estudio

ANOVA	
P	0,019
F	19,380
Grados de libertad	2
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?	Si

Anexo 7. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos totales para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

ANOVA	
P	0,0054
F	47,003
Grados de libertad	2
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?	Si

Anexo 8. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos volátiles para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

TUKEY

HSD=	533509,514	
Diferencias entre lodos en estudio		
Dif. Busbanzá y Villavicencio	Dif. Busbanzá y Farmacéutica	Dif. Villavicencio y Farmacéutica
113667	-738083	-624417
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?		
No	Si	Si

Anexo 9. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos totales para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

TUKEY		
HSD=	203870,809	
Diferencias entre lodos en estudio		
Dif. Busbanzá y Villavicencio	Dif. Busbanzá y Farmacéutica	Dif. Villavicencio y Farmacéutica
-79583	443583	364000
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?		
No	Si	Si

Anexo 10. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos del procedimiento concentración de sólidos volátiles para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

Farmacéutico

$$\text{ST mg/l} = (46.41-29.21) /30*1000000 = 573.333 \text{ mg/l}$$

$$\text{ST mg/l} = (30.88-20.07)/30*1000000= 540.500 \text{ mg/l}$$

$$\text{STV mg/l} = (46.41-30.21)/30*1000000= 540.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{STV mg/l} = (30.88-22.43)/30*1000000= 422.500 \text{ mg/l}$$

$$\text{SST mg/l} = (46.41-29.21) *1000/ (30/1000) = 573.330 \text{ mg/l}$$

$$\text{SST mg/l} = (30.88-20.07) *1000/ (30/1000) = 540.500 \text{ mg/l}$$

El promedio de los sólidos suspendidos totales del lodo farmacéutico es $573.330 \text{ mg/l} + 540.500 \text{ mg/l} / 2 = 556.915 \text{ mg/l}$

$$\text{SSV mg/l} = (46.41-30.21) *1000/ (30/1000) = 540.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{SSV mg/l} = (30.88-22.43) *1000/ (30/1000) = 422.500 \text{ mg/l}$$

El promedio de los sólidos suspendidos volátiles del lodo farmacéutico es $540.000 \text{ mg/l} + 422.500 \text{ mg/l} / 2 = 481.250 \text{ mg/l}$

Anexo 11. Cálculos de ST y SSV para lodo de empresa farmacéutica

Busbanzá

$$\text{ST mg/l} = (67.02-32.49) /30*1000000= 1.151.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{ST mg/l} = (61.51-18.34) /30*1000000= 1.439.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{STV mg/l} = (67.02-65.94) /30*1000000 = 36.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{STV mg/l} = (61.51-60.33)/30*1000000 = 39.333 \text{ mg/l}$$

$$\text{SST mg/l} = (67.02-32.49) *1000/ (30/1000) =1.151.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{SST mg/l} = (61.51-18.34) *1000/ (30/1000) = 1.439.000 \text{ mg/l}$$

El promedio de los sólidos suspendidos totales del lodo de la laguna de Busbanzá es $1.151.000 \text{ mg/l} + 1.439.000 \text{ mg/l} / 2 = 1.295.000 \text{ mg/l}$

$$\text{SSV mg/l} = (67.02-65.94) *1000/ (30/1000) = 36.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{SSV mg/l} = (61.51 - 60.33) * 1000 / (30 / 1000) = 39.333 \text{ mg/l}$$

El promedio de los sólidos suspendidos volátiles del lodo de la laguna de Busbanzá es
 $36.000 \text{ mg/l} + 39.333 \text{ mg/l} / 2 = 37.665 \text{ mg/l}$

Anexo 12. Cálculos de SST y SSV para lodo laguna de Busbanzá, Boyacá

Villavicencio

$$\text{ST mg/l} = (61.50 - 27.82) / 30 * 1000000 = 1.122.666 \text{ mg/l}$$

$$\text{ST mg/l} = (43.12 - 18.32) / 30 * 1000000 = 1.240.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{STV mg/l} = (61.50 - 57.66) / 30 * 1000000 = 128.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{STV mg/l} = (43.12 - 40.99) / 30 * 1000000 = 106.500 \text{ mg/l}$$

$$\text{SST mg/l} = (61.50 - 27.82) * 1000 / (30 / 1000) = 1.122.666 \text{ mg/l}$$

$$\text{SST mg/l} = (43.12 - 18.32) * 1000 / (30 / 1000) = 1.240.000 \text{ mg/l}$$

El promedio de los sólidos suspendidos totales del lodo de la quebrada del río Quenane en Villavicencio es $1.122.666 \text{ mg/l} + 1.240.000 \text{ mg/l} = 1.181.333 \text{ mg/l}$

$$\text{SSV mg/l} = (61.50 - 57.66) * 1000 / (30 / 1000) = 128.000 \text{ mg/l}$$

$$\text{SSV mg/l} = (43.12 - 40.99) * 1000 / (30 / 1000) = 106.500 \text{ mg/l}$$

El promedio de los sólidos suspendidos volátiles del lodo de la quebrada del río Quenane en Villavicencio es $128.000 \text{ mg/l} + 106.500 \text{ mg/l} / 2 = 117.250 \text{ mg/l}$

Anexo 13. Cálculos de SST y SSV para el lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS DESPLAZAMIENTO DE NaOH al 3% LODO DEL RÍO QUENANE, VILLAVICENCIO, META				
Días (xi)	Volumen promedio (fi)	Fi	xi*fi	xi²*fi
0	0	0	0	0

1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	1	1	10	100
11	4,33	5,33	47,63	523,93
12	7,33	12,66	87,96	1055,52
13	10,66	23,26	138,58	1801,54
15	13,66	36,86	204,9	3073,5
17	15,66	52,52	266,22	4525,74
18	19,33	71,85	347,94	6262,92
19	23	94,85	437	8303
21	25,66	120,51	538,86	11316,06
22	31,33	151,84	689,26	15163,72
23	34,33	186,17	789,59	18160,57
25	38,33	224,5	958,25	23956,25
26	42,66	267,16	1109,16	28838,16
27	45,66	312,82	1232,82	33286,14
28	49	361,82	1372	38416
29	52,33	414,15	1517,57	44009,53
30	55	469,15	1650	49500
Σ	469,15		11397,74	288292,58
MEDIA	24,29			
DESVIACIÓN	4,94			

ESTÁNDAR	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	20,33%

Anexo 14. Cálculos estadísticos desplazamiento de NaOH al 3% del lodo del río Quenane,
Villavicencio, Meta

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS DESPLAZAMIENTO DE NaOH AL 3% DEL LODO DE LAGUNA DE BUSBANZA, BOYACÁ				
Días (xi)	Volumen promedio (fi)	Fi	xi*fi	xi²*fi
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
9	0,66	0,66	6	53,46
10	1,33	2	13,33	133
11	4,66	6,66	51,33	563,86
12	7,333	14	88	1055,52
13	10	24	130	1690
15	12,33	36,33	185	2774,25
17	15	51,33	255	4335
18	19	70,33	342	6156
19	23	93,33	437	8303
21	26,66	120	560	11757,06

22	30,66	150,66	674,66	14839,44
23	34	184,66	782	17986
25	37	221,66	925	23125
26	39,33	261	1022,66	26587,08
27	43	303	1161	31347
28	46,66	349,66	1306,66	36581,44
29	48,66	398,32	1411,33	40923,06
30	53,33	452	1600	47997
Σ	452		10951	276207,17
MEDIA	24,22			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	4,94			
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	20,3%			

Anexo 15. Cálculos estadísticos desplazamiento de NaOH al 3% del lodo de laguna de Busbanzá,
Boyacá

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS DESPLAZAMIENTO DE NaOH AL 3% DEL LODO DE EMPRESA FARMACÉUTICA				
Días (xi)	Volumen promedio (fi)	Fi	xi*fi	xi²*fi
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0

9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	1	1	11	121
12	4	5	48	576
13	7	12	91	1183
15	12	24	180	2700
17	15,66	39,66	266,33	4525,74
18	20	59,66	360	6480
19	24,33	83,99	462,33	8783,13
21	26,33	110,32	553	11611,53
22	29	139,32	638	14036
23	32	171,32	736	16928
25	36,66	207,98	916,66	22312,5
26	39,66	247,64	1031,33	26810,16
27	43,33	290,97	1170	31587,57
28	46,66	337,63	1306,66	36581,44
29	50,33	387,96	1459,66	42327,53
30	53	441	1590	47700
Σ	441		10820	274263,6
MEDIA	24,53			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	4,49			
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	18,3%			

Anexo 16. Cálculos estadísticos de desplazamiento de NaOH al 3% del lodo de empresa farmacéutica

Determinación de grupos microbianos por técnica de NMP:

NMS para poblaciones pertenecientes a lodo de Laguna Busbanzá, Boyacá						
Cálculos para tubos según Mcgrady para 5 tubos por dilución						
Medios de Cultivo	Combinación de tubos positivos	Número de Bacterias	NMP	Desviación estándar	Coefficiente de Variación	Media
BAS	554	160	$2,1 \times 10^4$	0	0%	160
BFG	554	160	$2,1 \times 10^4$	75,43	0,70%	106,66
BFL	554	160	$2,1 \times 10^4$	50,12	0,46%	107,5
BSRL	554	160	$2,1 \times 10^4$	86,27	0,63%	136,66
BSRA	553	90	$1,19 \times 10^4$	0	0%	90
BMH ₂	331	2	$2,65 \times 10^2$	0,14	0,07%	1,8
BMA	432	4	$5,30 \times 10^2$	0,70	0,2%	3,5

Anexo 17. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo de laguna de Busbanzá, Boyacá

NMS para poblaciones pertenecientes a lodo del Río Quenane, Villavicencio, Meta						
Cálculos para tubos según Mcgrady para 5 tubos por dilución						
Medios de Cultivo	Combinación de tubos positivos	Número de Bacterias	NMP	Desviación estándar	Coefficiente de Variación	Media

BAS	554	160	$3,68 \times 10^3$	0	0%	160
BFG	554	160	$3,68 \times 10^3$	75,43	0,70%	106,66
BFL	554	160	$3,68 \times 10^3$	50,12	0,46%	107,5
BSRL	553	90	$2,07 \times 10^3$	86,27	0,63%	136,66
BSRA	553	90	$2,07 \times 10^3$	0	0%	90

Anexo 18. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo del río Quenane, Villavicencio, Meta

NMS para poblaciones pertenecientes a lodo de empresa farmacéutica						
Cálculos para tubos según Mac Grady para 5 tubos por dilución						
Medios de Cultivo	Combinación de tubos positivos	Número de Bacterias	NMP	Desviación estándar	Coficiente de Variación	Media
BAS	554	160	$1,6 \times 10^3$	0	0%	160
BFG	000	0	0	75,43	0,70%	106,66
BFL	500	2.5	$2,59 \times 10^3$	50,12	0,46%	107,5
BSRL	554	160	$1,6 \times 10^3$	86,27	0,63%	136,66
BSRA	553	90	$9,35 \times 10^2$	0	0%	90

Anexo 19. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo de empresa farmacéutica

NMS para poblaciones pertenecientes a lodo de la Quebrada Moncovita

Cálculos para tubos según Mac Grady para 5 tubos por dilución						
Medios de Cultivo	Combinación de tubos positivos	Número de Bacterias	NMP	Desviación estándar	Coficiente de Variación	Media
BAS	Sin información	Sin información	$2,60 \times 10^2$	Sin información	Sin información	Sin información
BFG	Sin información	Sin información	$2,40 \times 10^2$	Sin información	Sin información	Sin información
BFL	Sin información	Sin información	$1,80 \times 10^1$	Sin información	Sin información	Sin información
BSRL	Sin información	Sin información	$6,80 \times 10^1$	Sin información	Sin información	Sin información
BSRA	Sin información	Sin información	7,0	Sin información	Sin información	Sin información

Anexo 20. Cálculos para NMS para poblaciones pertenecientes al lodo de la quebrada Moncovita

Cálculos

Fórmula: # de bacteria (según tabla) * máxima Dil * 5000 / gSSV

Ejemplo Busbanzá: $160 * 10^{-3} * 5000 / 0,037666 = 21239,31397 = 2,1 \times 10^4$

Ejemplo Villavicencio: $160 * 10^{-3} * 5000 / 0,217250 = 3682,3935 = 3,68 \times 10^3$

Ejemplo Farmacéutica: $160 * 10^{-3} * 5000 / 0,481250 = 1662,3376 = 1,66 \times 10^3$

Anexo 21. Cálculos número de bacterias para los lodos en estudio

ANOVA	
P	0,001
F	7,31
GL	3
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?	
SI	

Anexo 22. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos de técnica NMP para lodos de Laguna Busbanzá, Río Quenane, Quebrada Moncovita y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

TUKEY					
HSD=	2454				
Diferencias entre lodos en estudio					
Dif. Laguna Busbanzá y Río Quenane	Dif. Laguna Busbanzá y Farmacéutica	Dif. Río Quenane y Farmacéutica	Dif. Río Quenane y Quebrada Moncovita	Dif. Laguna Busbanzá y Quebrada Moncovita	Dif. Farmacéutica y Quebrada Moncovita
2663	395,07	3058,07	3959,57	1296,57	901,5
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?					
SI	NO	SI	SI	NO	NO

Anexo 23. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos de técnica NMP para lodos de Laguna Busbanzá, Río Quenane, Quebrada Moncovita y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

Días	Volumen Reactor	Volumen Reactor	Volumen Reactor Farmacéutica	Volumen Reactor Control negativo
------	-----------------	-----------------	------------------------------	----------------------------------

	Villavicencio (ml NaOH)			Busbanzá (ml NaOH)			(ml NaOH)			(ml NaOH)		
REACTOR												
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4	7	2	9	4	1	0	3	0	0	0	0
12	8	9	5	12	7	3	0	9	3	0	0	0
13	13	11	8	16	9	5	3	11	7	0	0	0
15	17	15	9	18	10	9	7	17	12	0	0	0
17	19	17	11	21	11	13	11	19	17	0	0	0
18	23	19	16	25	15	17	15	23	22	0	0	0
19	29	21	19	31	19	19	19	27	27	0	0	0
21	33	23	21	33	23	24	21	29	29	0	0	0
22	39	29	26	35	29	28	26	31	30	0	0	0
23	41	33	29	38	33	31	29	34	33	0	0	0

25	44	38	33	41	37	33	34	39	37	0.2	0	0.3
26	49	42	37	43	40	35	37	43	39	0.7	0	0.5
27	50	45	42	47	45	37	39	49	42	0.7	0	0.9
28	51	49	47	51	49	40	42	53	45	0.9	0	1.2
29	54	53	50	53	50	43	47	57	47	0.9	0	1.5
30	57	55	53	58	54	48	49	60	50	1.0	0	2.0

Anexo 24. Medición de Metano obtenido por medio de la técnica desplazamiento de NaOH al 3% para lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

Tiempo en días	Lodo de Río Quenane,Villavicencio,Meta	Lodo Laguna de Busbanzá, Boyacá	Lodo de empresa farmacéutica
	Volumen acumulado de CH4 en ml	Volumen acumulado de CH4 en ml	Volumen acumulado de CH4 en ml
0	0	0	0
1	0	0	0
2	0	0	0
4	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
9	0	0,66	0
10	1	1,33	0
11	4,33	4,66	1

12	7,33	7,33	4
13	10,66	10	7
15	13,66	12,33	12
17	15,66	15	15,66
18	19,33	19	20
19	23	23	24,33
21	25,66	26,66	26,33
22	31,33	30,66	29
23	34,33	34	32
25	38,33	37	36,66
26	42,66	39,33	39,66
27	45,66	43	43,33
28	49	46,66	46,66
29	52,33	48,66	50,33
30	55	53,33	53
Media	24,29	24,22	24,53
Desviación Estándar	4,94	4,94	4,49
Coefficiente de Variación	20,33%	20,33%	18,33%

Anexo 25. Promedio, Media, Desviación estándar y Coeficiente de variación en el desplazamiento de NaOH al 3% para los lodos en estudio

Fuente: realizado por los autores

ANOVA	
P	0,98
F	0,02
¿Existe diferencia significativa en el promedio de desplazamiento de volumen de NaOH al 3% entre los lodos de estudio?	
NO	

Anexo 26. Análisis estadístico ANOVA de resultados obtenidos de técnica Desplazamiento de NaOH al 3% en lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

TUKEY		
HSD=	13,00	
Diferencias entre lodos en estudio		
Dif. Busbanzá y Villavicencio	Dif. Busbanzá y Farmacéutica	Dif. Villavicencio y Farmacéutica
0,70	0,49	1,18
¿Existen diferencias estadísticamente significativas entre los lodos en estudio?		
NO	NO	NO

Anexo 27. Análisis estadístico TUKEY de resultados obtenidos de técnica Desplazamiento de NaOH al 3% en lodos de Busbanzá, Villavicencio y Farmacéutica.

Fuente: realizado por los autores

Procedimiento Granulometría

1. Preparar agar bacteriológico como lo recomienda la casa comercial; no se requiere su esterilización. Como alternativa se puede utilizar gelatina sin sabor.

2. En 5 cajas de Petri, colocar 1 ml de lodo en el centro.
3. Enseguida verter el agar aún tibio, procurando formar una película lo más delgada posible.
4. Distribuir la muestra en el agar de manera uniforme, con movimientos circulares de la caja de Petri hacia la derecha y los mismos hacia la izquierda, formando ochos.
5. Esperar a que se solidifique el agar.
6. Observar en el microscopio óptico empleando un ocular de Whipple previamente calibrado, determinando el tamaño de cada cuadrado del micrómetro ocular.
7. Para su lectura se debe tener en cuenta:
8. Presencia de gránulos bien definidos y compactos.
9. El valor del diámetro promedio se debe realizar sobre una muestra al azar de mínimo 100 gránulos.

Para granos no esféricos se debe medir el diámetro mayor.

CÁLCULOS: Con los datos obtenidos de las mediciones de los gránulos se determina el valor promedio de los gránulos.

Anexo 28. Procedimiento de granulometría para los lodos en estudio

Recuento de bacterias anaerobias estrictas (BAS)

Volumen 150 ml:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	7,5 ml
K_2HPO_4	0.045 g
$Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0.2%)	150 ul
Solución de oligoelementos sin sulfatos	1,5 ml

NiCl ₂ ·6H ₂ O (0.5g/L)	75 ul
Azul de bromotimol (1.0%)	150 ul
Extracto de levadura	300 mg
Bio trypcase (Peptona trípsica de caseína)	300 mg
Glucosa	1500 mg

Se completa con agua destilada a 150 ml, se ajusta pH con NaOH 1N, agregar 10% en volumen de agua destilada, hervir hasta llegar al volumen de 1 litro y enfriar bajo atmósfera de nitrógeno (N₂)

Cuando esté a temperatura ambiente agregar

NaHCO ₃	0,75 g
Cisteína	0.075 g

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

Na ₂ S · 9H ₂ O (2.0%)	0.05 ml/ 5 ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05 ml/ 5 ml

Después del autoclave el pH debe ser 7.1

Anexo 29. Medio para recuento de bacterias anaerobias estrictas (BAS)

Recuento bacterias fermentadoras del lactato y de la glucosa (BFL Y BFG)

Volumen 150 ml:

Solución mineral de Balch sin sulfatos	15 ml
Oligoelementos de Balch sin sulfato	3 ml
K_2HP0_4	90 mg
$Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0.2%)	300 ul
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.5g/L)	300 ul
Azul de bromotimol (1.0%)	300 ul
Extracto de levadura	600 mg
BIOtrypcase (Peptona trípica de caseína)	600 mg
Selenita de sodio (1.73g/L)	300 ul

Para las BFG tomar 75 mL del medio anterior y agregar 0,75 g de glucosa. Ajustar pH a 7.1. Después de hervir enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 y agregar:

Cisteína- HCl	37,5 mg
$NaHCO_3$ (10%)	375 mg

Para las BFL tomar los 75 ml de medio restantes y agregar 420 ul de lactato de sodio (60% en peso) o 2.8 ml de ácido láctico. Ajustar el pH a 7.25. Después de hervir, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 .

Cuando está a temperatura ambiente agregar:

Cisteína- HCl	0,0375 mg
---------------	-----------

NaHCO ₃ (10%)	0,375 mg
--------------------------	----------

Servir 5 mL en tubos Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase N₂/CO₂ (80% / 20%) durante un minuto. Llevar al autoclave durante 15 minutos (121°C - 15 psi).

Antes de utilizarlo agregar:

Na ₂ S. 9H ₂ O (2.0%)	0.05ml/5ml
Vitaminas diluidas de Balch	0.05ml/5ml

Anexo 30. Medio para recuento de bacterias fermentadoras de lactato y de la glucosa (BFL y BFG)

Recuento de bacterias sulfatoreductoras del acetato y lactato (BSRLAc y BSRAc)

Volumen 150 ml:

KH ₂ O ₄	60 mg
NH ₄ Cl	150 mg
Na ₂ SO ₄	900 mg
NaCl	360 mg
FeCl ₂ 4H ₂ O	108 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	120 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	45 mg
Extracto de levadura	300 mg
Oligoelementos P.W. sin sulfato	300 ul
Solución de resazurina (0.1 %)	300 ul

Para las bacterias sulfato reductoras del acetato se toman 75 mL del medio anterior y agregar 225 mg de acetato de sodio. $3H_2O$. Ajustar pH a 6.7.

Después de hervir, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2 y agregar antes de servir 375 mg $NaHCO_3$

Para las bacterias reductoras del lactato tomar los 75 mL de medio restantes y agregar 495 ul de lactato de sodio (60%). Ajustar el pH a 6.8. Después de hervir, enfriar bajo atmósfera de N_2/CO_2

Cuando está a temperatura ambiente agregar antes de servir 375 mg $NaHCO_3$

Servir 5 mL en tubos Hungate, bajo atmósfera de nitrógeno, hacer cambio de fase N_2/CO_2 (80% /20%) durante un minuto, llevar al autoclave durante 15 minutos (121°, 15 psi).

Cisteína HCl (2.5%)	0.1 ml/5ml
Vitaminas P.W. diluidas	0.05ml/5ml

Anexo 31. Medio para recuento de bacterias sulfatoreductoras del acetato y lactato (BSRL y BSRA)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución mineral de Balch

	Con sulfatos	Sin sulfatos *
KH_2PO_4	6.0 g	900 mg
$(NH_4)_2SO_4$	6.0 g	
NH_4Cl		750 mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$		315 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.6 g	

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.16 g	24 mg
NaCl	12.0 g	1800 mg

* Para evitar inhibición por la presencia de bacterias sulfato-reductoras.

Diluir en **150** ml de agua destilada., preparara en aerobiosis, almacenar en refrigerador a 4°C.

Anexo 32. Preparación de solución mineral de Balch

Solución oligoelementos sin sulfatos

	Con sulfatos	Sin sulfatos*
Ácido nitrilotriacético**	1.5 g	no aplico
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.0 g	
MgCl ₂ · 6H ₂ O		0,375 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.5 g	
MnCl ₂ · 4H ₂ O		0,09 g
NaCl	1.0 g	0,15 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g	
FeCl ₂ · 4H ₂ O		0,015 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O		0,015 g
CoSO ₄ · 6H ₂ O	0.1 g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g	0,015 g
ZnCl ₂		0,015 g
ZnSO ₄	0.1 g	

CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g	
CuCl ₂ · 2H ₂ O		1,5 mg
ALK(SO ₄) ₂	0.01 g	
ALCl ₃		1,5 mg
H ₃ BO ₃	0.01 g	1,5 mg
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.01 g	1,5 mg

*Para evitar inhibición por la presencia de bacterias sulfato reductoras.

**Se disuelven 1.5g de ácido nitrilotriacético con KOH 10N o 1N hasta pH 6.5.

La solución se prepara en aerobiosis. Después de adicionar todo, ajustar el pH a 7.0 con KOH 1N, almacenar en el refrigerador a 4°C.

Anexo 33. Preparación de oligoelementos sin sulfatos

Solución diluida de vitaminas de Balch

Volumen 150 ml:

Tiamina HCl (vitamina B 1)	0,75 mg
D. L. Pantotenato de Ca	0,75 mg
Ácido nicotínico	0,75 mg
Piridoxina - HCl (vitamina B6)	1,5 mg
Ácido fólico	0,3 mg
Riboflavina (vitamina B2)	0,75 mg
Ácido Lipoico (thioico)	0,75 mg
Biotina (vitamina H)	0,3 mg
Ácido p-aminobenzóico (PABA)	0,75 mg

Cianocobalamina (vitamina B12)	0,015 mg
--------------------------------	----------

Esterilizar por filtración en membranas de 0.22mm en anaerobiosis

Almacenar protegido de la luz en refrigerador a 4°C.

Se preparan en frascos de 60mL con cambio de fase de N₂/CO₂ y estériles.

Anexo 34. Preparación de solución diluida de vitaminas de Balch

Solución mineral de PEENNIG ET WIDDEL (SIN SULFATO)

Volumen 150 ml:

KH ₂ PO ₄	30 mg
NH ₄ Cl	75 mg
NaCl	180 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	60 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	22,5 mg
KCl	75 mg

Anexo 35. Preparación de solución mineral de PEENNING ET WIDDEL (sin sulfato)

Solución de vitaminas de PEENNIG y WIDDEL

Volumen 1 litro:

Biotina (vitamina H)	0,15 mg
Acido para-Amino benzoico (PABA)	0,75 mg
Cianocobalamina (vitamina B12)	0,75 mg

Thiamina, HCl	1,5 mg
DL panthotenato de Ca	0,75 mg
Ácido nicotínico	0,75 mg
Pyridoxamina (Pyridoxina HCl)	1,5 mg

Nota: Esterilizar por filtración, en anaerobiosis. Almacenar a 4° C y protegido de la luz.

Anexo 36. Preparación de solución de vitaminas de PEENNING y WIDDEL

Medición de metano por desplazamiento de líquido

Para la determinación de la actividad metanogénica producida por los lodos en estudio, se debe tener en cuenta que es una medida experimental de la capacidad generada entre la materia orgánica y el sustrato para la formación de metano (CH₄), de ese modo se implementa el uso de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 3% conectado directamente en los reactores con los lodos de interés, para por medio del desplazamiento de este líquido se pueda determinar la actividad metanogénica producida por los lodos en estudio.

Procedimiento

1. Adicionar 30 ml de agua destilada hervida, así como los volúmenes de AGV y de lodo. El volumen dependerá de si el sistema es estático o agitado.
2. Cuando se sospecha una limitación de nutrientes y elementos traza se adiciona la solución de nutrientes en una relación de 1ml /L. El extracto de levadura se adiciona en una concentración de 0.2g/L.
3. La temperatura de incubación es de 30°C a 35°C de acuerdo con las condiciones que se fijan para el ensayo.

4. En otra botella de suero se colocan 60 ml de la solución de NaOH, se sella con tapón de caucho el cual se perfora con dos agujas de jeringa. La botella con NaOH se coloca boca abajo, y se conecta a la botella con el lodo.
5. La "T" de la manguera de conexión funciona como trampa para NaOH e impide la entrada de NaOH a la botella de lodo. La segunda aguja en el frasco con NaOH permite la salida del líquido y medir el volumen de gas producido, el cual es equivalente al volumen de NaOH desplazado y recogido en el cilindro graduado.
6. Determinar la producción diaria de metano a intervalos regulares de tiempo para determinar el periodo de tiempo en el cual se obtiene la mayor producción de metano. Es importante agitar la botella que contiene el lodo antes de realizar la lectura para liberar el
7. gas del lodo y conseguir mayor contacto entre el sustrato y el lodo.
8. Cada muestra se realiza por duplicado. Para cada serie de ensayos se incluye un blanco que contiene agua destilada y un control al que no se le agrega sustrato, a fin de corregir la producción endógena de gas, así como el volumen desplazado por cambios de temperatura y presión atmosférica.

Anexo 37. Metodología para la medición de metano por el método de desplazamiento de NaOH al

3%