

Estrategia de mejoramiento del proceso de digestión anaerobia de vinaza con
microorganismos pre-adaptados

Diana Carolina Gómez Bedoya

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

Cali

2017

Estrategia de mejoramiento del proceso de digestión anaerobia de vinaza con
microorganismos pre-adaptados

Diana Carolina Gómez Bedoya

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGRADO EN
BIOLOGÍA

MARÍA FRANCISCA VILLEGAS TORRES, PHD.

Cali

2017



APROBADO POR:

María Isabel Rivas Marm.
María Isabel Rivas
Evaluador

Ma. Francisca Villegas
María Francisca Villegas
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer enormemente a mi tutora María Francisca Villegas por darme la oportunidad de guiarme y enseñarme, en este proceso de aprendizaje, a crecer profesionalmente y personalmente. A las personas que me han contribuido en mi aprendizaje y formación compartiendo su conocimiento y experiencias. Al semillero de investigación, por su buena disposición a ayudar, aportar conocimiento y colaboración con obstáculos o tareas presentados a lo largo de este proyecto. A Luis David por ser mi compañero y amigo durante todo este tiempo, colaborándome y apoyándome siempre. A los profesores que han pasado por esta etapa, por su apoyo no solo en lo académico y profesional, también en lo personal. Agradezco inmensamente a mi familia por todo el apoyo, el amor y la ayuda que me han dado durante mi vida para ser la persona que soy hoy en día.

Contenido

Abstract	10
Introducción	11
1.1 Planteamiento y justificación	12
1.2 Marco Teórico	13
1.3 Objetivos	18
1.3.1 Objetivo general	18
1.3.2 Objetivos específicos	18
1.4 Metodología propuesta	19
1.4.1 Muestras de Vinaza, PTAR y Compostaje	19
1.4.2 Bioaumentación de las poblaciones microbianas pre-adaptadas a la vinaza	19
1.4.3 Enriquecimiento de inóculos de la digestión anaerobia con organismos bioaumentados	20
1.4.4 Cuantificación de producción de biogás y cuantificación de metano	20
1.4.5 Análisis estadístico	21
1.4.6 Matriz de marco lógico	22
1.5 Resultados y discusión	24
1.5.1 Bioaumentación de las poblaciones microbianas del compostaje	24
1.5.2 Enriquecimiento del inóculo de digestión anaerobia y producción de biogás	27
1.6 Conclusiones	31
1.7 Recomendaciones	32
2. Bibliografía	33

Lista de tablas

Tabla 1. Porcentaje de sólidos volátiles (w/w) para el inóculo de la PTAR, el cultivo de microorganismos del compostaje (CM) y la vinaza.	27
Tabla 2. Porcentaje de metano del biogás producido por las diferentes muestras.	29

Lista de gráficas

Gráfica 1. Recuentos microbianos en medio M9.	24
Gráfica 2. Recuentos microbianos en caldo nutritivo.	25
Gráfica 3 Rendimiento de biogás acumulativo del enriquecimiento del inóculo con la bioaumentación de los microorganismos de compostaje.	28

Tabla de anexos

Anexo 1. Recuentos microbianos de a. caldo nutritivo y de b. medio M9.	38
--	----

Resumen del proyecto

Las vinazas son uno de los residuos de la destilación de la caña de azúcar siendo producidos aproximadamente 10l de vinaza por 1l de alcohol. Estas son comúnmente usadas para la fertirrigación, siendo aprovechadas en los campos a modo de fertilizante y el compostaje. Estas tienen un impacto negativo para el medio ambiente, por lo que se han planteado alternativas para el aprovechamiento de estas vinazas como la digestión anaerobia. La digestión anaerobia de vinazas puede ser inhibida por diferentes moléculas o factores en las diferentes etapas del proceso. En la hidrólisis se presenta inhibición por moléculas como fenoles, iones, altas concentraciones de glucosa, aminoácidos, entre otros, afectando el proceso y disminuyendo la producción y la calidad de biogás. Por ello, con el fin de presentar una estrategia para mejorar la digestión anaerobia de vinazas, se evaluó el efecto del enriquecimiento de un inóculo de la PTAR (Planta de Tratamiento de Aguas Residuales) con microorganismos del compostaje de caña de azúcar pre-adaptados a la vinaza sobre la producción y calidad de biogás. Se realizó una bioaumentación de las poblaciones del compostaje de caña de azúcar, en medio M9 y caldo nutritivo, siendo el medio M9 escogido para realizar el enriquecimiento de la PTAR. Se evaluó el enriquecimiento del inóculo de la PTAR con el 10% de sólidos volátiles de los microorganismos del compostaje bioaumentados en reactores tipo batch. Se obtuvo un aumento en la producción de biogás por el enriquecimiento con diferencias significativas, con respecto al control de vinaza, pero no con respecto al control del enriquecimiento. Adicionalmente, no hubo una mejora en la calidad de biogás por parte de las muestras con respecto al control de vinaza. Por ello, se concluyó que el enriquecimiento del inóculo de la PTAR con microorganismos del compostaje, no tiene un efecto para la mejora en la producción y calidad de biogás. Sin embargo, por estudios de otros autores, se puede evidenciar que la estrategia del enriquecimiento si mejora la digestión anaerobia pero los microorganismos usados en este estudio no son los adecuados.

Palabras clave: Digestión anaerobia, Enriquecimiento, Compostaje.

Abstract

The vinasse is one of the residues of the distillation of the sugarcane being produced approximately 10l of vinasse per 1l of alcohol. These are commonly used for fertigation, being used in the fields as a fertilizer, or compost. Also, have a negative impact on the environment, so alternatives have been proposed for the use of these vinasses such as anaerobic digestion. The problem with the anaerobic digestion of vinasse is that it can be inhibited by different molecules or factors in the different stages of the process. In the hydrolysis inhibition occurs by molecules such as phenols, ions, high concentration of glucose, amino acids, among others, affecting the process and decreasing the production and quality of biogas. Therefore, in order to present a strategy to improve the anaerobic digestion of vinasse, was evaluated the effect of enrichment of an inoculum of the PTAR (by the initial in Spanish, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales) with pre-adapted microorganisms of sugarcane composting, onto the vinasse production and quality of biogas. Bioaugmentation of sugarcane composting populations was carried out in M9 medium and nutrient broth, with the M9 medium chosen to enrich the PTAR inoculum. The enrichment of the PTAR inoculum was evaluated with 10% volatile solids of the bioaugmented composting microorganisms in batch reactors. There was an increase in the yield of biogas by enrichment with significant differences, with respect to the vinasse control, but not with the enrichment control. However, there no was improvement in the quality of biogas of the sample, respect to the vinasse control. So it was concluded that the enrichment of the inoculum of PTAR with composting microorganism has no effect for the improvement in the production and quality of biogas. However, for studies by other authors, it can be shown that the enrichment strategy can improve the anaerobic digestion but the microorganisms used in this study are not adequate.

Key words: Anaerobic digestion, Enrichment, Compost.

Introducción

En la cuenca geográfica del valle del río Cauca, Colombia, se siembran más de 232,070 hectáreas de caña de azúcar (Asocaña, 2016). Esta producción de caña se destina principalmente a la elaboración de azúcar y alcohol carburante, produciendo miles de toneladas de bagazo, cachaza y varios litros de vinaza al año (Bohórquez, Puentes, & Menjivar, 2014). Aproximadamente 10 litros de vinaza por litro de alcohol (Ospina B., 2016). Estas vinazas son residuos industriales con impacto negativo sobre el ecosistema (Quintero, Montoya, Sánchez, Giraldo, & Cardona, 2008), causando gases de efecto invernadero, agotamiento de oxígeno, pH bajo, salinización de los suelos y eutrofización de los cuerpos de agua (Christofolletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013). Su aprovechamiento en la fertirrigación o en el compostaje, pueden reducir los efectos anteriores (Páez, Muñoz, Candela, Tamoh, & Valdes, 2016). El compostaje es una de las formas de convertir desechos orgánicos, posiblemente contaminantes como las vinazas, a productos que son beneficiosos y menos contaminantes (Cifuentes, De León, & Porres, 2011).

Otra forma de aprovechar la vinaza, es la digestión anaerobia para la producción de energía no renovable (Picionieri B., Silva S., Moni S., Mambeli B., & Martuscelli R., 2017). La digestión anaerobia es definida como un proceso de conversión biológico de la carga orgánica, a productos como biogás, sinceptor de electrones externo (Angelidaki & Batstone, 2011). Este proceso es mediado por microorganismos con capacidad de degradar vinazas u otro sustrato para convertirlas en metano y dióxido de carbono (Moraes, Zaiat, & Bonomi, 2015). El metano obtenido puede ser usado directamente para producir electricidad y calor o puede ser convertido en combustible (Angelidaki & Batstone, 2011), y el lodo residual puede aprovecharse como fertilizante por su valor nutricional (Chen & Neibling, 2014) siendo una estrategia más eficiente que el compostaje.

Sin embargo, la digestión anaerobia presenta inhibición causada por los componentes de la vinaza como moléculas aromáticas, ácidos grasos volátiles, entre otros (Vavilin, Fernandez, Palatsi, & Flotats, 2008). Esta inhibición baja la producción de biogás, y a su vez, de metano (Mata-Alvarez, Macé, & Llabrés, 2000), por lo que para mejorar la digestión anaerobia, existen estrategias como pre-tratamientos, separación de fases o el enriquecimiento del consorcio microbiano de la digestión anaerobia. El proyecto busca evaluar el efecto del enriquecimiento del inóculo de la PTAR con microorganismos del compostaje pre adaptados a la vinaza, sobre la producción y calidad de biogás.

1. Descripción del proyecto

1.1 Planteamiento y justificación

La producción de etanol a partir de la caña de azúcar, produce, a modo de residuo, cerca de 10 litros de vinaza por litro de alcohol (Ospina B., 2016). Este residuo es líquido, de color marrón oscuro, posee gran cantidad de sólidos suspendidos, pH bajo, un alto DQO y DBO (Christofoletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013) y compuestos como lactato, oxalato, etanol, ácido acético, y alto contenido de fenoles (España G., y otros, 2012). Igualmente, causa gases de efecto invernadero, agotamiento de oxígeno, pH bajo, alta corrosividad, eutrofización de los cuerpos de agua y desbalance iónico cambiando las propiedades del suelo (Christofoletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013). En Colombia, este residuo es aprovechado en el compostaje y la fertirrigación, para mitigar sus efectos contaminantes (Páez O., Muñoz A., Candela, Tamoh, & Valdes-Abellan, 2016), pero en países como Brasil, se usan en la digestión anaerobia reduciendo su carga orgánica, y produciendo biogás y lodo con alto contenido de nutrientes, al final del proceso (Moraes, Zaiat, & Bonomi, 2015). Por esto se quiere evaluar para la implementación en Colombia.

En la digestión anaerobia puede disminuirse la actividad metabólica de los microorganismos por la inhibición de moléculas aromáticas como fenoles (Wilkie, Riedesel, & Owens, 2000), altas concentraciones de azúcares, aminoácidos, y los pH bajos. Además, la composición del sustrato contenidos de carbohidratos biodegradables, proteínas y lípidos puede afectar la biodegradabilidad. A bajas concentraciones, la biodegradación de compuestos tóxicos puede prevenir la inhibición, pero a concentraciones altas, puede inhibir la digestión anaerobia. Además, las vías metabólicas de los diferentes materiales orgánicos pueden afectarse mutuamente (Vavilin, Fernandez, Palatsi, & Flotats, 2008). Estos inhibidores afectan la hidrólisis, bajando la producción de las reacciones, por lo que se produce menos biogás y a su vez, menor porcentaje de metano (Mata-Alvarez, Macé, & Llabrés, 2000).

En estudios anteriores se ha observado aumentos significativos en la producción de biogás y metano al añadir microorganismos al inóculo de la digestión anaerobia (Herrero & Stuckey, 2014; Čater, Fanedl, Malovrh, & Logar, 2015; Öner, y otros, 2017; Zhang, Yang, Zhang, Tian, & Jin, 2017). Por ello se quiere observar si el enriquecimiento con microorganismos del compostaje pre-adaptados a la vinaza, puede ser una estrategia para mejorar la producción y calidad del biogás, por la inhibición dada en la hidrólisis de la digestión anaerobia. Con ello se logra aportar conocimiento para futuros trabajos, una nueva estrategia para residuos como la vinaza, reduciendo su impacto ambiental. Por ejemplo reducir los gases de efecto invernadero, la materia orgánica contaminante, el uso de energía no renovable en los ingenios y el uso del digestado como fertilizante (Moraes, y otros, 2014).

1.2 Marco Teórico

En la región geográfica del Valle del Cauca, Colombia, son producidas grandes cantidades de caña de azúcar por los ingenios azucareros, alrededor de 232,070 hectáreas (Asocaña, 2016). La mayoría de caña de azúcar es usada en la producción de etanol comercial y azúcar (Coelho & Guardabassi, 2014) produciendo miles de toneladas de bagazo, cachaza, y varios litros de vinaza al año (Bohórquez, Puentes, & Menjivar, 2014). Aproximadamente producen 10 litros de vinaza por litro de alcohol (Ospina B., 2016) Estas vinazas están compuestas de agua, posee bastante materia orgánica en forma de ácidos orgánicos y cationes como potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), nitrógeno (N) y fósforo (P). Posee un pH de 3,9 a 5 aproximadamente, y un DBO de 5046 mg/L y DQO de 13380 mg/L (Christofolletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013).

Por su alto DQO y DBO, las vinazas poseen un impacto negativo sobre el ecosistema (Quintero, Montoya, Sánchez, Giraldo, & Cardona, 2008), causando gases de efecto invernadero, agotamiento de oxígeno, pH bajo, eutrofización de los cuerpos de agua y salinización de los suelos (Christofolletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013). Para disminuir su contaminación, en Colombia, se aprovechan en la fertirrigación y el compostaje (Páez, Muñoz, Candela, Tamoh, & Valdes, 2016).

El compostaje es un método de tratamiento de los residuos sólidos urbanos, agrícolas e industriales, basado en la degradación bioquímica de la fracción orgánica biodegradable de los mismos. Generalmente, la degradación se da en presencia de aire, y bajo microorganismos como bacterias y hongos (López Macías, 2002). Los microorganismos que participan en el compostaje requieren carbono y relativamente poco nitrógeno para su actividad (Camacho, Martínez, Ramírez Saad, Valenzuela, & Valdés, 2014). Esta práctica genera impactos positivos para el medio ambiente, previniendo el alto contenido de sales que puede dejar, los residuos como la vinaza, en el suelo al ser aplicada directamente sin tratamiento (Ospina B., 2016). Los principales productos del compostaje son el dióxido de carbono, agua y calor, además de la materia orgánica estable, la cual ayuda al mantenimiento del suelo, mejorando el crecimiento y la vitalidad de los cultivos (Haug, 1993).

El método de compostaje consta de tres fases, con cambios de temperatura, por lo que el proceso se divide de acuerdo a esta. En la primera etapa el material comienza a temperatura ambiente, la cual va aumentando hasta los 45°C ya que los microorganismos utilizan las fuentes sencillas de C y N generando calor. Esta etapa es llamada fase de latencia o mesófila y puede durar pocos días. Luego pasa a la fase termófila o de higienización, donde se alcanzan temperaturas mayores a 45°C y los microorganismos de la fase anterior se reemplazan por microorganismos termófilos. Estos degradan fuentes más complejas de carbono y transforman el

nitrógeno en amoníaco. Puede llegar hasta los 75°C, pero una vez agotadas las fuentes de carbono, la temperatura vuelve a bajar hasta 40 o 45°C, entrando a la fase de enfriamiento o mesófila dos. En esta fase, la degradación de polímeros como celulosa, continúa y puede durar varias semanas. Posteriormente, la temperatura sigue descendiendo hasta llegar a la temperatura ambiente y llegar a la maduración, donde se dan reacciones secundarias (Román, Martínez, & Pantoja, 2013).

El proceso del compostaje puede tener varias reacciones químicas mediadas por enzimas, como celulasas, proteasas, ureasas, entre otras (Cayuela, Mondini, Sánchez-Monedero, & Roig, 2008), que degradan los compuestos complejos a compuestos más biodisponibles, permitiendo que otros organismos como plantas puedan disponer de ellos (Haug, 1993).

En otros países como Brasil o Alemania, las vinazas son aprovechadas en digestión anaerobia como sustrato para producción de energía no renovable (Picionieri B., Silva S., Moni S., Mambeli B., & Martuscelli R., 2017; André, Pauss, & Ribeiro, 2017). En Colombia, se está empezando a estudiar este proceso para su implementación. La digestión anaerobia se trata de una serie de procesos biológicos que usa poblaciones diversas de microorganismos para degradar la materia orgánica en biogás y una combinación entre efluentes líquidos y sólidos. Este proceso ocurre en ausencia de oxígeno (Chen & Neibling, 2014). Este proceso emplea microorganismos con capacidad de degradar vinazas u otro sustrato, sin el uso de oxígeno, para convertirlas en metano y dióxido de carbono (Moraes, Zaiat, & Bonomi, 2015). El metano producido es mayormente usado en la producción de electricidad y calor (Mitchell, y otros, 2015). Normalmente, el metano y dióxido de carbono es acompañado por ácido sulfhídrico, oxígeno, y otros compuestos gaseosos en menor proporción (Cheng, 2010).

Esta forma de aprovechamiento de la vinaza, tiene ventajas sobre el compostaje, pues solamente produce material que puede ser usado como fertilizante, además, productos como el dióxido de carbono, o el sulfuro de hidrógeno son liberados a la atmosfera. Mientras que la digestión anaerobia, que no necesita un sistema de aireado, puede producir metano, y reducir los gases de efecto invernadero (Chynoweth, Owens, & Legrand, 2011). Igualmente, hay control de olores, el lodo digerido se puede usar como fertilizante y se puede reducir el consumo de energía no renovable (Holm-Nielsen, Al Seadi, & Oleskowicz-Popiel, 2009).

La digestión anaerobia, consta de 4 fases, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Moraes, Zaiat, & Bonomi, 2015). En la hidrólisis, la primera etapa, las partículas grandes son convertidas en moléculas pequeñas y solubles como la glucosa. Los compuestos que pueden ser hidrolizados son carbohidratos, proteínas, y lípidos. También pueden ser hidrolizados los compuestos lignocelulósicos, con ayuda de microorganismos que posean celulasas. Los productos de la hidrólisis son azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos largos (Vavilin, Fernandez, Palatsi,

& Flotats, 2008). En la acidogénesis, los azúcares y aminoácidos son convertidos en ácidos grasos volátiles, alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono, dando los productos para la acetogénesis, donde los ácidos grasos volátiles y alcoholes, son convertidos en acetato y ácido acético. Por último, en la metanogénesis, el acetato y el ácido acético son convertidos en metano y dióxido de carbono (Angelidaki & Batstone, 2011).

Por lo general, la temperatura de la digestión anaerobia es controlada, siendo mesofílica (35-37°C) o termofílica (55°C) (Mitchell, y otros, 2015). Además, se lleva a cabo en biorreactores o biodigestores, en los que células, o enzimas transforman el material en productos bioquímicos o en subproductos aprovechables (Spier, de Souza Vandenberghe, Pedroni Medeiros, & et al., 2012). Cada biodigestor es diferente ya que debido a las interacciones entre los microorganismos son múltiples y complejas, en cada uno se alcanzarán poblaciones distintas. Dentro del biodigestor coexisten distintos grupos de microorganismos: bacterias, hongos y protozoarios (Frioni, 1999).

Estos biodigestores pueden de varios tipos, dos fases, una fase, con agitación, sin agitación, etc. Siendo el más utilizado el de una sola fase, el cual consiste en un solo reactor donde se dan todas las etapas de la digestión anaerobia. Estos suelen estar con agitación, temperatura constante, y método de recolección de gas (Gerardi, 2003). El reactor tipo batch, es un reactor cerrado donde la materia orgánica se descompone en determinado tiempo produciendo biogás y fertilizante (Pedraza, Chara, Conde, Giraldo, & Giraldo, 2002). Este evalúa por medio del test de potencial bioquímico de metano, la producción del biogás y el metano durante la digestión anaerobia. Este test es usualmente utilizado en la industria durante el diseño para predecir el total de biogás producido (Mitchell, y otros, 2015).

Aunque este método de degradación de vinazas tiene un alto potencial, el proceso de digestión anaerobia se ve afectado por la inhibición de moléculas aromáticas, ácidos grasos volátiles de cadena larga, las concentraciones de azúcar, aminoácidos, lípidos y pH bajos, como también alcoholes, aldehídos, alcanos, aldehídos, etc (Vavilin, Fernandez, Palatsi, & Flotats, 2008; Chen, Cheng, & Creamer, 2008; Wilkie, Riedesel, & Owens, 2000). Estos compuestos afectan la hidrólisis, bajando la producción de biogás y metano (Mata-Alvarez, Macé, & Llabrés, 2000). Por ejemplo, se ha estudiado que el ácido gálico puede ser un inhibidor, particularmente el efecto de algunas enzimas hidrolíticas (Mousa & Foster, 1999). Además, la composición del sustrato contenidos de carbohidratos biodegradables, proteínas y lípidos puede afectar la biodegradabilidad. A bajas concentraciones, la biodegradación de compuestos tóxicos puede prevenir la inhibición, pero a concentraciones altas, puede inhibir la digestión anaerobia. Además, las vías metabólicas de los diferentes materiales orgánicos pueden afectarse mutuamente (Vavilin, Fernandez, Palatsi, & Flotats, 2008).

También el hidrógeno gaseoso, un intermediario que se produce en casi todas las etapas de la digestión anaerobia, en concentraciones altas, puede cambiar la vía

metabólica de algunos compuestos orgánicos. Además, la sal, otro posible inhibidor que normalmente se encuentra en aguas residuales, a altas cantidades puede deshidratar a las células microbianas, así como otros metales, como magnesio o calcio, en formas de cationes o aniones, a los cuales los microorganismos hidrolíticos son más sensibles (Cheng, 2010).

Para reducir la inhibición y mejorar el proceso de digestión anaerobia, existen distintas estrategias como pretratamientos para los sustratos que remueven los componentes tóxicos inhibitorios (Siles, El Bari, Ibn Ahmed, Chica, & Martín, 2010). Otra estrategia para mejorar la digestión anaerobia, es el enriquecimiento del inóculo con microorganismos específicos o pre adaptados al sustrato para que puedan degradarlo y dejar más biodisponibles los compuestos necesarios para el proceso.

El enriquecimiento es el proceso de adicionar microorganismos con función o propiedad específica en un sistema biológico para mejorarlo. Esta técnica es usada en muchas áreas, para incrementar el rendimiento de metano, recuperándose de la sobrecarga de compuestos elementos inhibitorios mencionados anteriormente (Tian, Fotidis, Mancini, & Angelidaki, 2017). El enriquecimiento del reactor anaeróbico puede ser aplicable si el cultivo específico se bioaumenta para un proceso clave en la digestión anaerobia. Por ello, la adición de microorganismos beneficiosos aumenta la tasa de degradación de compuestos orgánicos, reduciendo el tiempo de recuperación del reactor (Venkiteshwaran, Milferstedt, Hamelin, & Zitomer, 2016).

Para poder adicionar los microorganismos con función específica es necesario realizar una bioaumentación, ya que los microorganismos pueden presentarse en cantidades pequeñas. Normalmente se utiliza un medio líquido, donde proveen nutrientes y condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de microorganismos particulares, por lo general se utilizan medios selectivos (Tortora, Funke, & Case, 2007). La selección de microorganismos para el enriquecimiento es muy importante, muchos creen que depende principalmente del comportamiento del cultivo bioaumentado del enriquecimiento (Zhang, Yang, Zhang, Tian, & Jin, 2017). Ya que, en algunas ocasiones, los microorganismos enriquecidos pueden no crecer o inactivarse, se han presentado opciones de microorganismos para realizar un enriquecimiento. Las más comunes son la adición de cepas bacterianas pre-adaptadas, adición de consorcios pre-adaptados, introducción de bacterias modificadas genéticamente, o la adición de genes relevantes para la biodegradación (Herrero & Stuckey, 2015).

Para el enriquecimiento se siguen varias metodologías determinando la cantidad en que se añaden los microorganismos al inóculo exactamente. Esto puede hacerse por el volumen que se añade a los biorreactores, y pueden ir de 0% a 20% (Öner, y otros, 2017). Adicionalmente, para medir el efecto de los microorganismos, se autoclavan antes del enriquecimiento y se mide el efecto de las células muertas en

la producción de biogás para saber si los microorganismos de la bioaumentación sí mejoran el proceso o solo afecta los microorganismos de la digestión anaerobia (Čater, Fanedl, Malovrh, & Logar, 2015).

Anteriormente en estudios similares, se ha encontrado que el enriquecimiento del proceso de digestión anaerobia con contenido lignocelulósico, con microorganismos celulósicos promueve la producción de metano (Ozbyram, Kleinstauber, Nikolausz, & Ince, 2017). Igualmente, microorganismos que actúan en otras fases de la digestión anaerobia como las bacterias fermentativas de tipo acetato. Estas bacterias lograron aumentar la producción de metano hasta un 23% (Zhang, y otros, 2015). adicionalmente se han hecho estudios para mejorar la hidrólisis usando el microorganismo anaerobio *Clostridium lundense*, el cual puede ayudar a la solubilización de lípidos en la digestión anaerobia. Este estudio obtuvo un aumento en la producción de metano, reduciendo la inhibición por el alto contenido de lípidos (Cirne, Bjornsson, Alves, & Mattiasson, 2006).

En estudios pasados se ha pensado el proceso de compostaje como un pretratamiento para la degradación de la materia orgánica, más específicamente, la degradación de lignina, celulosa y otros componentes. Este pretratamiento acelera el inicio de la digestión anaerobia y mejora los productos de esta (Zou & Kang, 2018). También se ha observado la posibilidad de usar, a modo de sustrato, el compostaje en la digestión anaerobia, lo cual ha demostrado que podría ser un sustrato interesante aumentando la tasa de degradación. Aun así, falta indagar más en los procesos microbianos que conducen a este aumento (Wagner, Janetschek, & Illmer, 2018).

Por último, otro intento de ligar el método de compostaje con la digestión anaerobia ha sido a modo de tratamiento para recuperar energía y nutrientes. Esta unión de condiciones aeróbicas y anaeróbicas parece ser un proceso eficiente para la biodegradación de algunos compuestos (Cucina, Zadra, Marcotullio, Di Maria, & Sordi, 2017). Por eso se quiere realizar un enriquecimiento de un inóculo de digestión anaerobia con microorganismos pre adaptados a la vinaza, que provienen del compostaje. Con esto se espera un aumento en la producción de biogás y a su vez, en la producción de metano. Para ello, el compostaje a utilizar debe de estar compuesto por residuos de caña de azúcar o por lo menos, debe de contener vinaza de caña de azúcar.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del Enriquecimiento del inóculo de la PTAR con microorganismos del compostaje pre-adaptados a la vinaza, sobre la producción y calidad de biogás.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Bioaumentar las poblaciones microbianas del compostaje pre-adaptadas a la vinaza, en medios de cultivos selectivo y nutritivo.
2. Cuantificar la producción diaria del biogás de la vinaza, con el inóculo de la PTAR enriquecido con los microorganismos bioaumentados.
3. Determinar la composición del biogás producido, por el inóculo de la PTAR enriquecido con los microorganismos bioaumentados.
4. Identificar cuál de los inóculos tiene mejor efecto en la producción y calidad de biogás.

1.4 Metodología propuesta

1.4.1 Muestras de Vinaza, PTAR y Compostaje

Para el sustrato de la digestión anaerobia, se tomó muestra de vinaza proveniente de un ingenio del Valle del Cauca, Colombia, cercano a la ciudad de Cali, y se almacenó con refrigeración en el laboratorio. Para determinar el inóculo a usar, se utilizó uno cercano a la ciudad de Cali. Como inóculo se tomó lodos de la digestión anaerobia de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Cañaveralejo, la cual está ubicada en el norte de la ciudad de Cali. La muestra de compostaje se tomó de un ingenio azucarero aledaño a la ciudad de Cali, donde el proceso de producción del compostaje contiene vinaza. La muestra se colectó en la fase de maduración, en cantidades aproximadamente de igual proporción en diferentes zonas de la pila de compostaje, empaquetadas en bolsas zip de 1Kg de capacidad, agitando y aireando lo menos posible. Las muestras colectadas se llevaron al laboratorio ubicado en la Universidad Icesi antes de las 24 horas.

1.4.2 Bioaumentación de las poblaciones microbianas pre-adaptadas a la vinaza

Se escogió el medio selectivo líquido mínimo de sales (M9), para seleccionar las poblaciones microbianas pre-adaptadas a la vinaza. Este medio es un medio salino mínimo que debe ser suplementado con una fuente de carbono para proveer un medio químicamente definido para el crecimiento microbiano (Dra. Mónica Bonilla Salinas, 2016). Está compuesto de 6g de fosfato de disódio (Na_2HPO_4), 3g de fosfato de potasio (KH_2PO_4), 1g de cloruro de amonio (NH_4Cl), 0,5g de cloruro de sodio (NaCl) y 3gm de cloruro de calcio (CaCl_2), y a modo de fuente de carbono, se tomó el 10% de vinaza añadida al compostaje para 1l de medio. De igual manera, se realizó una bioaumentación en caldo de cultivo nutritivo para seleccionar los microorganismos utilizando una fuente adicional de carbono, en este caso, la vinaza. El caldo nutritivo es un medio líquido de uso general para el cultivo de organismos exigentes (MAST, s.f.).

Para la bioaumentación de las poblaciones microbianas pre-adaptadas a la vinaza, se tomaron 10g de la muestra de compostaje en un Erlenmeyer de 250mL con 100mL de medio M9, por duplicado y otro Erlenmeyer del mismo tamaño con 100mL de caldo nutritivo. Se incubaron por 24 horas con agitación a 35°C en condiciones semi-aerobias y posteriormente se filtró el medio de cultivo, removiendo la tierra, dejando la fase líquida en frascos Schott de 500mL, con incubación a 35°C y 5mL de vinaza añadidos a cada medio. Cada dos semanas se realizó conteos de células viables por el método de gota en placa (Valencia Z., 2004), con diluciones seriadas

de 10^{-1} hasta 10^{-8} para medir el número de unidades formadoras de colonias (UFC), posterior a cada conteo, se le añadió 5mL de vinaza. Todo esto se realizó hasta que la concentración de UFC del último conteo fuera la misma que la concentración de UFC del conteo anterior.

1.4.3 Enriquecimiento de inóculos de la digestión anaerobia con organismos bioaumentados

Los sólidos volátiles se determinaron para el inóculo, la vinaza y los medios de cultivo luego de la bioaumentación. Para ello se tomó una alícuota de cada muestra, se pesaron y se llevaron a una temperatura de 105°C por 24 horas. Luego de ello, se volvió a pesar cada alícuota y posteriormente se llevaron a 500°C por 24 horas, pesando de nuevo al final de todo el proceso. Con la diferencia de peso entre el peso inicial y el peso final se calculó los sólidos volátiles. Todo el proceso se realizó por triplicado. Una vez calculado los sólidos volátiles, se calculó la cantidad a agregar, por peso, de cultivo bioaumentado con microorganismos pre-adaptados para enriquecer el inóculo, para esto se tomó el 10% de los sólidos volátiles y se agregó al inóculo de la PTAR. El enriquecimiento se realizó en reactores tipo batch, con agitación constante y temperatura de 37°C .

1.4.4 Cuantificación de producción de biogás y cuantificación de metano

Una vez realizado el enriquecimiento, se calculó la cantidad de vinaza a agregar tomando en cuenta el inóculo, para obtener una relación inóculo:sustrato de 4:1 en cada reactor. Todo se calculó teniendo en cuenta reactores de 1L, los cuales tuvieron agitación continua y un baño maría a 37°C , cada uno con una muestra diferente. Uno contenía el inóculo de la PTAR sin sustrato para poder calcular la cantidad de biogás que es producido solo por el inóculo, comparándolo con las demás pruebas y calculando la producción de biogás neta de cada prueba. El siguiente contenía inóculo de PTAR y vinaza (PTAR+Vinaza) a modo de control positivo para comparar con el inóculo enriquecido. El siguiente reactor contenía inóculo de PTAR enriquecido con el cultivo de microorganismos bioaumentados (PTAR+CM), y el último reactor contenía inóculo de PTAR enriquecido con el cultivo de microorganismos bioaumentados, autoclavado (PTAR+CM AC), para utilizarlo como control para la bioaumentación. Esto último fue para descartar que el material dentro del cultivo bioaumentado no influyera en la producción de biogás y los microorganismos si estuvieran mejorando el proceso de la digestión anaerobia. A los últimos dos mencionados se les añadió vinaza como sustrato y esto se hizo por duplicado.

Para determinar el volumen de gas producido se utilizó un medidor de flujo de biogás que consiste en una celda para cada reactor, llena de agua ácida, con una

perilla que gira cada cierta cantidad de gas retenido. Al girar libera el biogás producido que retiene y con un software hace los cálculos para calcular cuánto biogás se ha producido, reportando en ml el biogás acumulado en todo el experimento. Para esto último, cada celda debe estar previamente calibrada para conocer el volumen de biogás que puede retener. Adicionalmente, el volumen producido por cada muestra en el reactor se dividió por los sólidos volátiles agregados para normalizar la cantidad de biogás.

El biogás producido por cada muestra se colectó en bolsas colectoras de 10l, con el fin de determinar la composición del biogás obtenido. Para ello se utilizó un analizador de gas portable, el cual nos muestra la cantidad de metano, dióxido de carbono y ácido sulfhídrico en una muestra gas. El contenido de cada bolsa, mínimo 1l, se analizó con el equipo anteriormente descrito y se determinó la cantidad de metano producido por la muestra.

1.4.5 Análisis estadístico

Por fallos presentados con uno de los equipos, no se pudo obtener resultados de las réplicas de las muestras, por lo que se realizó una prueba t para una muestra. En esta prueba se compara la producción de biogás observado, con la producción de biogás teórico, en este caso, el control de vinaza. Dado que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, se realizó el test de suma de rangos de Mann-Whitney. Se utilizó un nivel de confianza del 95% para analizar los datos obtenidos y hacer comparaciones entre las pruebas. Se comparó la muestra PTAR+CM con el control PTAR+Vinaza, PTAR+CM AC con PTAR+Vinaza y PTAR+CM con PTAR+CM AC. Para realizar este análisis estadístico se utilizó el programa SigmaPlot para Windows.

1.4.6 Matriz de marco lógico

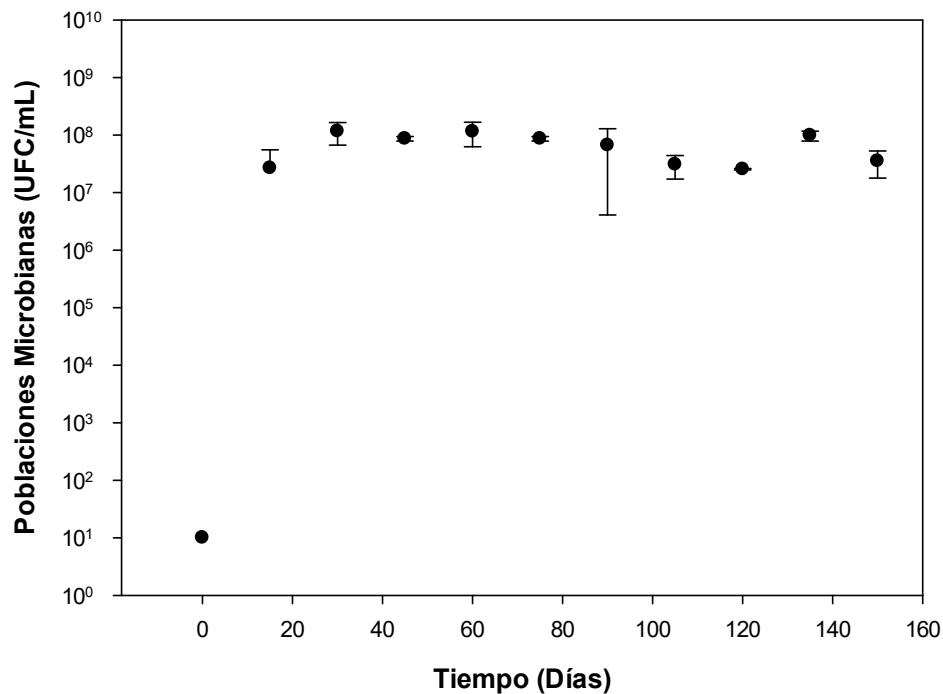
Objetivo general: Evaluar el efecto del Enriquecimiento del inóculo de la PTAR con microorganismos del compostaje pre adaptados a la vinaza, sobre la producción y calidad de biogás.			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicadores
Bioaumentar las poblaciones microbianas del compostaje pre adaptadas a la vinaza, en medios de cultivo selectivo.	Revisión bibliográfica sobre compostaje y muestreo, medios de cultivos selectivos y temas sobre digestión anaerobia.		Bases de datos revisadas/Bases de datos por revisar
	Reconocimiento de ingenios productores de compostaje con vinaza		Ingenios productores de compostaje con vinaza
	Solicitud de permisos para muestrear compostaje y PTAR		Solicitudes enviadas/Solicitudes por enviar
	Muestreo de compostaje y PTAR		Ingenios muestreados/Ingenios por muestrear
	Cultivo de microorganismos de muestras de compostaje en medio selectivo M9	Medio M9 selecciona los microorganismos de interés	

<p>Cuantificar la producción diaria del biogás de la vinaza, con el inóculo de la PTAR enriquecido con los microorganismos bioaumentados</p>	<p>Enriquecimiento del inóculo de PTAR con microorganismos bioaumentados en biorreactores anaerobios</p>		<p>Inóculo de PTAR enriquecido/Inóculos de PTAR por enriquecer</p>
	<p>Medición de la producción diaria de biogás por 20 días máximo</p>	<p>Correcto funcionamiento de todos los reactores</p>	<p>Días medidos /días por medir</p>
<p>Determinar la composición del biogás producido, por el inóculo de la PTAR enriquecido con los microorganismos bioaumentados.</p>	<p>Cuantificación del porcentaje de metano del biogás producido por el enriquecimiento</p>	<p>Producción de más de 1L por cada muestra</p>	<p>Porcentaje de metano producido/Litro de biogás producido</p>
<p>Identificar cuál de los inóculos tiene mejor efecto en la producción y calidad de biogás</p>	<p>Análisis estadístico de diseño completo al azar de producción de biogás y porcentaje de metano</p>		<p>Datos estadísticos que puedan determinar el inóculo con mayor rendimiento</p>

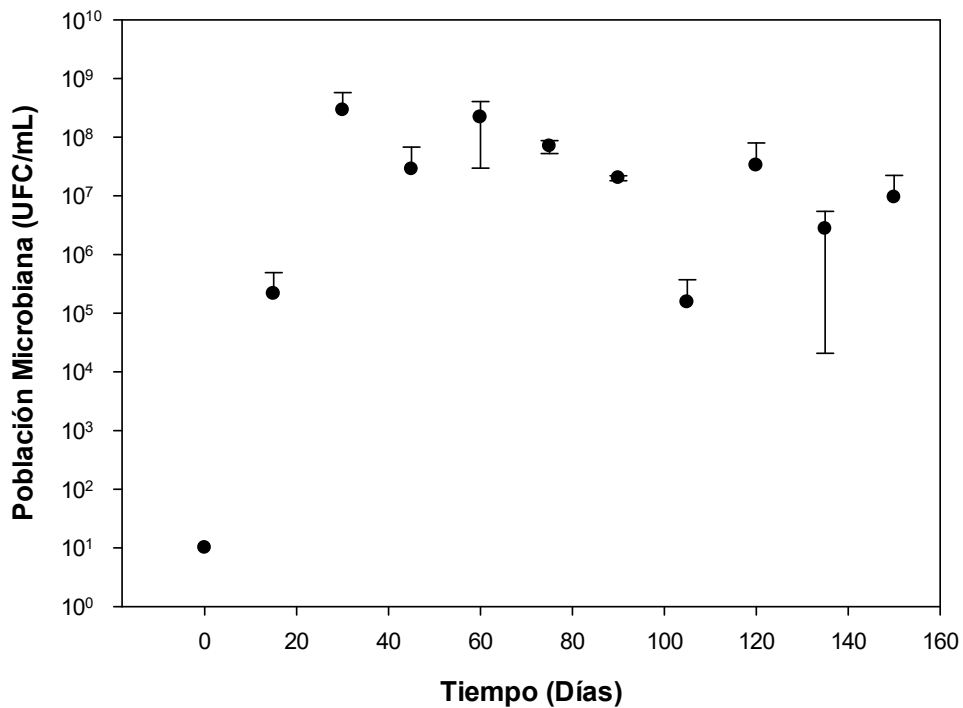
1.5 Resultados y discusión

1.5.1 Bioaumentación de las poblaciones microbianas del compostaje

Se realizó la bioaumentación de microorganismos del compostaje en medios líquidos M9 y caldo nutritivo con el fin de aumentar las poblaciones microbianas y posteriormente realizar el enriquecimiento del inóculo de la digestión anaerobia. Para la bioaumentación de las poblaciones microbianas del compostaje, se realizaron recuentos en placas, como se muestra en anexo 1, y se determinó la concentración UFC, los cuales se muestran en las Gráficas 1 y 2. Para determinar la bioaumentación a usar, se esperó que el último recuento fuera del mismo orden de magnitud que el anterior.



Gráfica 1. Recuentos microbianos en medio M9.



Gráfica 2. Recuentos microbianos en caldo nutritivo.

En las gráficas 1 y 2, el tiempo son los días en que se realizaron los recuentos, desde que se inició la bioaumentación, hasta que el último orden de magnitud fue el mismo que el anterior. Las barras de error es la desviación estándar.

En la gráfica 1 se puede observar que la concentración de las poblaciones microbianas en el tiempo cero es cerca de 10^1 UFC/ml. Luego de la primera adición de vinaza como fuente de carbono, esta concentración pequeña tiene un crecimiento exponencial, por lo que aproximadamente para el día 15, su concentración aumenta seis órdenes de magnitud, 10^7 . Esto sugiere que han utilizado la vinaza como fuente de carbono y los nutrientes del medio. Luego del día 20, aumentan su concentración aproximadamente a 10^8 UFC/mL. En los siguientes días, se ve que la concentración se mantiene entre 10^7 y 10^8 UFC/mL. Del día 20 al día 145 aproximadamente, el crecimiento de las poblaciones microbianas es menor, pudiendo ser que tengan recursos limitados, o posea compuestos inhibitorios en el medio, por lo que no pueden crecer de manera exponencial.

En la gráfica 2 se observa un inicio similar a la gráfica 1, la concentración inicial de las poblaciones microbianas en el tiempo cero, es aproximadamente 10^1 UFC/ml. A diferencia de las poblaciones de la gráfica 1, en la gráfica 2 se ve un crecimiento exponencial aproximadamente hasta los 40 días. A partir de este día, las

poblaciones microbianas comienzan a bajar, llegando hasta 10^5 UFC/ml aproximadamente en el día 100. Luego del día 100, se da otro crecimiento exponencial. Este crecimiento exponencial puede ser porque al ser un medio nutritivo, tiene nutrientes del medio y nutrientes por la vinaza, agotando primero los nutrientes del medio y luego los de la vinaza. Por esto podemos pensar que en luego del día 100 se empezaron a seleccionar los microorganismos que degradan la vinaza a diferencia del medio M9 en la gráfica 1, donde se empezaron a seleccionar desde el comienzo.

Con lo anterior, puede decirse que la fase exponencial se ve reflejada en el crecimiento inicial que se ve en las gráficas 1 y 2, del medio M9 y caldo nutritivo, respectivamente. La diferencia de esta fase en los dos medios, es que en el caldo nutritivo se da por un mayor tiempo que en el medio M9. Esto puede ser por la composición de cada medio, ya que el caldo nutritivo posee mayor cantidad de nutrientes. En el medio M9, los microorganismos pueden llegar a una fase donde algunos microorganismos crecen y otros mueren, siendo una fase estacionaria. Esto se puede dar porque se acumulan algunos productos de desecho en niveles inhibitorios, haciendo que decrezca el crecimiento exponencial (Madigan, Martinko, & Parker, 2008).

Otro factor que puede estar afectando el crecimiento, es el metabolismo que utilizan los microorganismos, ya que los que utilizan un metabolismo aerobio crecen más rápido que los anaerobios. Igualmente están los anaerobios facultativos también, que son los que pueden usar el metabolismo aerobio y pasar al metabolismo anaerobio cuando hay menor concentración de oxígeno o no está disponible (Tortora, Funke, & Case, 2007). Por ejemplo, la tasa de crecimiento para bacterias anaerobias para lodos municipales es de 0,006g biomasa/DBO, mientras que para las bacterias aerobias es de 0,6g biomasa/DBO (Cheng, 2010). Dado las condiciones usadas, semi-aerobias, es posible que se haya afectado el crecimiento, ya que la producción de energía es menor cuando el nivel de oxígeno es reducido, afectando el crecimiento de estos organismos.

Aunque lo anterior pueden ser explicaciones de lo ocurrido, no hay suficientes estudios de las dinámicas microbianas con estos medios. Finalmente, con los recuentos microbianos se logró escoger las poblaciones bioaumentadas a usar para el enriquecimiento del inóculo de PTAR. Siendo escogida la bioaumentación en el medio M9 para el enriquecimiento del inóculo y la bioaumentación en el caldo nutritivo fue descartada. Estas poblaciones microbianas de M9 se escogieron porque la concentración en UFC/ml, fueron muy cercanas en su orden de magnitud, siendo el último recuento en placa del mismo orden de magnitud en su concentración, que el anterior.

1.5.2 Enriquecimiento del inóculo de digestión anaerobia y producción de biogás

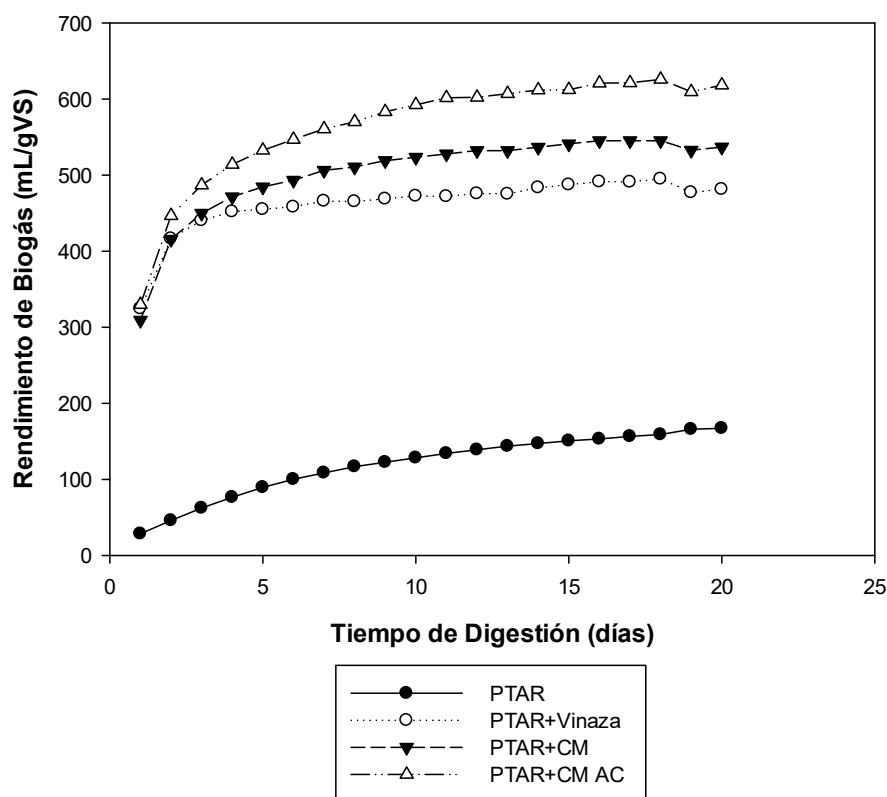
Luego de escoger el cultivo bioaumentado para el enriquecimiento del inóculo, el cual fue el del medio M9, se procedió a medir los sólidos volátiles de la bioaumentación, la vinaza y el inóculo de PTAR, los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de sólidos volátiles (w/w) para el inóculo de la PTAR, el cultivo de microorganismos del compostaje (CM) y la vinaza.

Muestra	%Sólidos Volátiles (w/w)
PTAR	1,35
Cultivo CM	4,74
Vinaza	25,76

Con la medición de los sólidos volátiles se realizó el enriquecimiento, en los reactores tipo batch de 1L, con el 10% de sólidos volátiles del cultivo bioaumentado. Se escogió el 10% de sólidos volátiles ya que Zhang et al. (2015), comparó la producción de metano al utilizar el 5%, 10% y 20% v/v de la bioaumentación para enriquecer un inóculo, obteniendo una mayor producción de metano al 10% v/v.

Para el proceso de digestión anaerobia se usó una relación de inóculo/sustrato de 4:1, calculado con los sólidos volátiles. Se usó esta relación ya que esta entre los valores es que el sustrato no inhibe a los microorganismos de digestión anaerobia. Posteriormente se midió el rendimiento de biogás por 20 días, el cual se muestra en la Gráfica 3.



Gráfica 3 Rendimiento de biogás acumulado del enriquecimiento del inóculo con la bioaumentación de los microorganismos de compostaje.

En la gráfica 3 se observó una producción exponencial de biogás al inicio del experimento entre los días cero y 4 del proceso. Se puede ver que las muestras PTAR+CM, PTAR+CM AC y PTAR+Vinaza tienen esta fase muy parecida por lo que se podría suponer que la hidrólisis, que es la etapa inicial de la digestión anaerobia, no se mejoró con la bioaumentación. Luego de esta rápida producción de biogás se ve que la pendiente empieza a disminuir alcanzando una asíntota. Esta asíntota es la producción máxima de biogás de cada muestra. La asíntota de PTAR+CM fue mayor que el control, por lo que sí se dio un aumento en la producción de biogás, sin embargo, PTAR+CM AC tuvo una mayor producción de biogás que PTAR+CM. Por último, se puede ver que la muestra PTAR, que es el inóculo sin vinaza ni bioaumentación, muestra una pendiente pequeña y muy parecida durante todo el proceso.

Se procedió a realizar un análisis estadístico de sumas de rango de Mann-Whitney dado que no pasó la prueba de normalidad para la prueba t para una muestra, donde se compara la muestra con una muestra teórica. Para ello se comparó la muestra con los dos controles, PTAR+Vinaza y PTAR+CM AC, y los dos controles entre sí con un nivel de confianza del 95%. Se encontraron diferencias significativas entre el rendimiento de biogás de la muestra PTAR+CM y el control PTAR+Vinaza

($P \leq 0,001$), entre PTAR+CM AC y PTAR+Vinaza ($P \leq 0,001$), y entre PTAR+CM y PTAR+CM AC ($P \leq 0,001$).

Teniendo en cuenta lo anterior, se observó que el rendimiento de biogás de la muestra PTAR+CM tiene un rendimiento mayor al control PTAR+Vinaza, por lo que se podría decir que mejoró el proceso. Ozbayram et al. (2017), realizaron un enriquecimiento con microorganismos anaerobios de rumen de una oveja al 2% y al 4%. Este enriquecimiento también dio un aumento en la producción de biogás (Ozbayram, Kleinstеuber, Nikolausz, & Ince, 2017).

Sin embargo, PTAR+CM AC se realizó para conocer si de verdad el proceso se mejoró o los microorganismos de la bioaumentación podrían estar afectando la digestión anaerobia. Por esto, al observar en la gráfica 3, y las diferencias significativas, se vio que el rendimiento de biogás fue menor por parte de la bioaumentación PTAR+CM que PTAR+CM AC. Por el contrario, Čater et al. (2015), utilizaron bacterias hidrolíticas, obteniendo que el cultivo sin autoclavar fue el responsable del aumento de la producción de metano, incrementando la hidrólisis (Čater, Faneli, Malovrh, & Logar, 2015).

Esto sugiere que el enriquecimiento con la bioaumentación no mejoró el proceso. Probablemente, porque los microorganismos de la bioaumentación produjeron moléculas inhibitorias a los microorganismos del inóculo de la PTAR. También puede ser que los microorganismos muertos de PTAR+CM AC quedaron como material biodisponible para los microorganismos del inóculo.

Muchas veces los microorganismos seleccionados no actúan en el enriquecimiento como actúan en la bioaumentación. Puede ser porque el enriquecimiento cambia la composición del cultivo, ya sea por competición o inhibición (Herrero & Stuckey, 2014). Además, los microorganismos metanogénicos son muy sensibles a cambios de temperatura, pH, o por la concentración de materia orgánica. Por esto, es posible que el establecimiento de algún microorganismo dio pie para la inhibición de los microorganismos metanogénicos (Nzila, 2016).

La composición del biogás se midió al obtener como mínimo 1L en las bolsas recolectoras. Con ayuda del biogás 5000, se determinó el porcentaje de metano y de dióxido de carbono presente en el biogás producido por la bioaumentación. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de metano producido por las diferentes pruebas.

Tabla 2. Porcentaje de metano del biogás producido por las diferentes muestras.

Prueba	%de metano	Desviación Estándar
PTAR+CM	56,6%	-
PTAR+CM AC	57,6%	-
PTAR+Vinaza	67,4%	7,2

En la Tabla 2 se puede ver que el control PTAR+Vinaza produjo mayor porcentaje de metano. Por el contrario, las otras dos pruebas dieron una diferencia en la producción de metano, aunque tuvieran mayor rendimiento de biogás. Esta composición no pudo hacerse con réplicas para la prueba de PTAR+CM y PTAR+CM AC ya que no se produjo suficiente gas para hacer más de una medición.

Aún que no fue posible determinar si había diferencias significativas, se puede ver que el porcentaje de metano de las muestras PTAR+CM AC y PTAR+CM, fue menor que el porcentaje en el biogás de PTAR+Vinaza. Sin embargo, este porcentaje está dentro del rango que se puede producir por digestión anaerobia el cual, generalmente está entre 50 y 80% de metano (Waites, Morgan, Rockey, & Higton, 2009; Cheng, 2010).

La reducción del porcentaje de metano se puede dar porque dentro de las poblaciones microbianas existen microorganismos que median la oxidación del acetato a hidrógeno y dióxido de carbono, el cual es el sustrato para los microorganismos metanogénicos (Nzila, 2016). También, porque el porcentaje de metano del biogás producido en la digestión anaerobia depende del sustrato digerido y del inóculo utilizado (Van Lier, et al., 2001).

1.6 Conclusiones

Con los resultados obtenidos al bioaumentar las poblaciones microbianas del compostaje pre-adaptadas a la vinaza, se concluyó que es mejor un medio selectivo ya que se da una selección desde el inicio de la bioaumentación al solo tener vinaza como fuente de carbono. Por el contrario, el medio de cultivo nutritivo puede ser más demorado con la selección de los microorganismos ya que presenta mayor cantidad de nutrientes distintos a los de la vinaza.

Al cuantificar la producción diaria del biogás se concluyó que el aumento en la producción del inóculo de la PTAR enriquecido no se debe a los microorganismos bioaumentados. Esto se evidenció al verse un aumento en la producción diaria del control de la bioaumentación PTAR+CM AC. Además, se observó que tuvieron un comportamiento esperado para la digestión anaerobia de vinazas.

Al determinar la composición del biogás producido se observó que hay una disminución de metano dentro del biogás obtenido del inóculo de la PTAR enriquecido con los microorganismos bioaumentados. Adicionalmente, se identificó que el inóculo con mayor producción de biogás lo obtuvo el PTAR+CM AC, el cual fue designado como control de la bioaumentación. Además, el control PTAR+Vinaza fue quien obtuvo mejor efecto en la calidad de biogás.

Por último, se concluyó que el enriquecimiento del inóculo de la PTAR con microorganismos del compostaje, no tiene un efecto para la mejora en la producción y calidad de biogás. Sin embargo, por estudios de otros autores, se puede evidenciar que la estrategia del enriquecimiento si mejora la digestión anaerobia pero los microorganismos usados en este estudio no son los adecuados.

1.7 Recomendaciones

Para mejorar la producción y calidad de biogás con la estrategia de enriquecimiento, se recomienda lo siguiente:

- 1.** Buscar otras fuentes de microorganismos pre-adaptados a la vinaza, como suelos donde se realizan fertirrigación con vinaza.
- 2.** Utilizar los microorganismos el compostaje para sustratos lignocelulósicos.
- 3.** Realizar mediciones de pH para futuras bioaumentaciones como parámetro adicional que pueda explicar el crecimiento de los microorganismos.
- 4.** Mayor exactitud en la medición del peso a agregar de la bioaumentación y los controles y el sustrato.
- 5.** Probar una relación de inóculo sustrato diferente, puede ser entre 6:1 y 2:1-
- 6.** Separar las fases de la digestión anaerobia en reactores de dos fases.
- 7.** Utilizar otra técnica para la medición de la composición del biogás ya que en algunos casos la producción de biogás es menor al volumen requerido con el equipo.
- 8.** Revisión de los equipos y conexiones de estos para que no se afecte la obtención de datos por fallas de los mismos.
- 9.** Realizar estudios posteriores a la digestión anaerobia para determinar si el digestado puede ser usado como fertilizante.

2. Bibliografía

- André, L., Pauss, A., & Ribeiro, T. (2017). Solid anaerobic digestion: state-of-art, scientific and technological hurdles. *Bioresource Technology*, 1-43.
- Angelidaki, I., & Batstone, D. J. (2011). 9.4 Anaerobic Digestion: Process. In T. H. Christensen, *Solid Waste Technology & Management* (pp. 583-600). Blackwell Publishing Ltd.
- Asocaña. (2016). *Asocaña, Sector Agroindustrial de la Caña*. Retrieved from Balance Azucarero colombiano Asocaña 2000-2016.
- Bohórquez, A., Puentes, Y. J., & Menjivar, J. C. (2014). Evaluación de la calidad del compost producido a partir de subproductos agroindustriales de caña de azúcar. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 73-81.
- Caccavale, F., Iamarino, M., Pierri, F., & Tufano, V. (2011). *Control and Monitoring of Chemical Batch Reactors*. Springer.
- Camacho, A. D., Martínez, L., Ramírez Saad, H., Valenzuela, R., & Valdés, M. (2014). POTENCIAL DE ALGUNOS MICROORGANISMOS EN EL COMPOSTAJE DE RESIDUOS SÓLIDOS. *Terra Latinoamericana*, 291-300.
- Čater, M., Fanel, L., Malovrh, S., & Logar, R. M. (2015). Biogas Production from Brewery Spent Grain Enhanced by Bioaugmentation with Hydrolytic Anaerobic Bacteria. *Bioresource Technology*, 2-36.
- Cayuela, M. L., Mondini, C., Sánchez-Monedero, M. A., & Roig, A. (2008). Chemical properties and hydrolytic enzyme activities for the characterisation of two-phase olive mill wastes coposting. *Bioresource Technology*, 4255-4262.
- Chen, L., & Neibling, H. (2014). Anaerobic Digestion Basics. *University of Idaho Extension*, 1-6.
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technol*, 4044-4064.
- Cheng, J. J. (2010). Anaerobic Digestion for Biogas Production. In J. Cheng, *Biomass to Renewable Energy Processes* (pp. 151-208). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*.
- Chynoweth, D. P., Owens, J. M., & Legrand, R. (2011). Renewable methane from anaerobic digestion. *Renewable Energy*, 1-8.
- Cifuentes, R., De León, R., & Porres, C. (2011). Producción de abono orgánico a partir de cachaza y tallos de caña de azúcar recuperados de las carreteras. *Revista 23 de la Universidad del Valle de Guatemala*, 1-10.

- Cirne, D. G., Bjornsson, L., Alves, M., & Mattiasson, B. (2006). Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1745–1752.
- Coelho, S. T., & Guardabassi, P. (2014). Chapter 3 Bazil: Ethanol. In B. D. Solomon, & R. Bailis, *Sustainable Development of Biofuels in Latin America and the Caribbean* (pp. 70-101). Sao Pablo: Springer.
- Cucina, M., Zadra, C., Marcotullio, M. C., Di Maria, F., & Sordi, S. (2017). Recovery of energy and plant nutrients from a pharmaceutical organic waste derived from a fermentative biomass: Integration of anaerobic digestion and composting. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2213-3437.
- Dra. Mónica Bonilla Salinas, D. S. (2016). *MANUAL DE PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA BÁSICA*.
- España G., E., Mijangos C., J., Barahona P., L., Dominguez M., J., Hernández Z., G., & Alzate G., L. (2012). Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*, 1–16.
- Frioni, L. (1999). Capítulo 19 Biotransformación de residuos orgánicos. In L. Frioni, *Procesos Microbianos*. Argentina: Fundación Universidad Nacional del río Cuarto.
- Fu, S. F., Xu, X. H., Dai, M., Yuan, X. Z., & Guo, R. B. (2017). Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection*, 81-86.
- Gerardi, M. H. (2003). 23 Types of Anaerobic Digesters. In M. H. Gerardi, *The Microbiology of Anaerobic Digesters* (pp. 143-151). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Haug, R. T. (1993). *The Practical Handbook of Compost Engineering*. United States: Lewis Publishers.
- Herrero, M., & Stuckey, D. C. (2014). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 1-10.
- Herrero, M., & Stuckey, D. C. (2015). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 119-128.
- Holm-Nielsen, J. B., Al Seadi, T., & Oleskowicz-Popiel, P. (2009). The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*, 5478–5484.
- Li, Y., Li, L., Sun, Y., & Yuan, Z. (2018). Bioaugmentation strategy for enhancing anaerobic digestion of high C/N ratio feedstock with methanogenic enrichment culture. *Bioresource Technology*, 1-25.
- López Macías, P. (2002). *Compostaje orgánico*. Cali: Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2008). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Prentice Hall.
- MAST. (s.f.). Nutrient Broth. United Kingdom.

- Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource technology*, 3-16.
- Mitchell, S. M., Kennedy, N., Ma, J., Yorgey, G., Kruger, C., Ullman, J. L., & Frear, C. (2015). ANAEROBIC DIGESTION EFFLUENTS AND PROCESSES: THE BASICS. *WSU EXTENSION*, 1-16.
- Moraes, B. S., Junqueira, T. L., Pavanello, L. G., Cavalett, O., Mantelatto, P. E., Bonomi, A., & Zaiat, M. (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: profit or expense? *Applied Energy*, 825-835.
- Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugar cane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 888-903.
- Mousa, L., & Foster, C. F. (1999). The use of glucose as a growth factor to counteract inhibition in anaerobic digestion. *Trans IChemE*, 193-198.
- Nzila, A. (2016). Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production. *Anaerobe*, 1-31.
- Öner, B. E., Akyol, Ç., Bozan, M., Ince, O., Aydin, S., & Ince, B. (2017). Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology*, 1-24.
- Ospina B., I. C. (2016). Influencia de la aplicación de compost producido a partir de residuos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en un Vertisol de Valle del Cauca. Palmira.
- Otero, O. (2017). Evaluación del potencial de producción de biogás a partir de residuos agroindustriales de la caña de azúcar.
- Ozbayram, E. G., Kleinstuber, S., Nikolausz, M., & Ince, B. (2017). Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. *Anaerobe*, 1-9.
- Páez O., G., Muñoz A., F., Candela, L., Tamoh, K., & Valdes-Abellan, J. (2016). Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). *Science of the total environment*, 410-419.
- Páez, G., Muñoz, F., Candela, L., Tamoh, K., & Valdes, J. (2016). Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). *Science of the Total Environment*, 410-419.
- Pedraza, G., Chara, J., Conde, N., Giraldo, S., & Giraldo, L. (2002). Evaluation of polyethylene and PVC tubular biodigesters in the treatment of swine wastewater. *Livestock Research for Rural Development*, 1-18.
- Picionieri B., A., Silva S., I. F., Moni S., A. P., Mambeli B., R., & Martuscelli R., E. (2017). Vinasse biogas for energy generation in Brazil: An assessment of economic feasibility, energy potential and avoided CO₂ emissions. *Journal of Cleaner Production*.

- Quintero, J. A., Montoya, M. I., Sánchez, O. J., Giraldo, O. H., & Cardona, C. A. (2008). Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, 385–399.
- Román, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). *Manual de Compostaje del agricultor*. Santiago de Chile: FAO.
- Siles, J. A., El Bari, H., Ibn Ahmed, S., Chica, A. F., & Martín, M. A. (2010). PRE-TREATMENT: THE KEY ISSUE IN VINASSE. *Pre-processing of manure and organic waste for energy production*.
- Spier, M. R., de Souza Vandenberghe, L. P., Pedroni Medeiros, A. B., & et al. (2012). Application of Different Types of Bioreactors in Bioprocesses. In P. G. Antolli, & Z. Liu, *Bioreactors: Design, Properties and Applications* (pp. 53-87). Brasil: Nova Science Publishers, Inc.
- Tian, H., Fotidis, L. A., Mancini, E., & Angelidaki, I. (2017). Different cultivation methods to acclimatise ammonia-tolerant methanogenic consortia. *Bioresource Technology*, 1-32.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Microbiology: an introduction*. United States of America: Pearson Education, Inc.
- Valencia Z., H. A. (2004). Cuantificación de microorganismos. In H. A. Z., *Manual de prácticas de microbiología básica* (pp. 53-62). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Van Lier, J. B., Tilche, A., Ahring, B. K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., . . . Verstraete, W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 1-18.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J., & Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*, 939-951.
- Venkiteshwaran, K., Milferstedt, K., Hamelin, J., & Zitomer, D. H. (2016). Anaerobic digester bioaugmentation influences quasi steady state performance and microbial community. *Water Research*.
- Wagner, A. O., Janetschek, J., & Illmer, P. (2018). Using Digestate Compost as a Substrate for Anaerobic Digestion. *Chem. Eng. Technol*, 1-9.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., & Higton, G. (2009). *Industrial Microbiology: An Introduction*. Malden, USA: Blackwell Science.
- Wilkie, A. C., Riedesel, K. J., & Owens, J. M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 63-102.
- Zhang, J., Guo, R., Qiu, Y., Qiao, J., Yuan, X. Z., Shi, X. S., & Wang, C. (2015). Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 306-313.
- Zhang, Q. Q., Yang, G. F., Zhang, Z. Z., Tian, G. M., & Jin, R. C. (2017). Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: Application and mechanisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-23.

