

OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE VINAZA  
USANDO UNA ESTRATEGIA DE ENRIQUECIMIENTO CON  
MICROORGANISMOS PRE-ADAPTADOS.

Luis David Jaramillo Prado

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Biología

Programa de Biología

Santiago de Cali

2018

OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE VINAZA  
USANDO UNA ESTRATEGIA DE ENRIQUECIMIENTO CON  
MICROORGANISMOS PRE-ADAPTADOS.

Luis David Jaramillo Prado

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

María Francisca Villegas Torres, Ph.D.

Santiago de Cali

2018

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradezco a mi tutora María Francisca, por ser una guía y un apoyo durante este proceso, por ayudarme a crecer como persona y como un buen profesional. A los profesores que han aportado un poco de su conocimiento a mi formación. Doy las gracias infinitamente a mi compañera y amiga Diana Carolina, que siempre estuvo a mi lado durante esta etapa de mi vida, apoyándome y dándome ánimos. A los compañeros del grupo de investigación, por su colaboración con las tareas y dificultades que se presentaron, por su disposición y conocimiento aportado al desarrollo del proyecto. A las personas que de una u otra forma han pasado por mi vida dejando algo en mí. Agradezco a mi familia por el apoyo emocional y económico que me ha brindado durante la carrera y, especialmente a mi abuelo, quien fue mi padre y hoy ya no se encuentra a mi lado, por creer en mí e infundirme los valores y principios que me han llevado ser lo que soy en el presente.

## Contenido

RESUMEN DEL PROYECTO .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	12
2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN .....	12
2.2 MARCO TEÓRICO .....	13
2.3 OBJETIVOS.....	18
2.3.1 Objetivo General .....	18
2.3.2 Objetivos específicos .....	18
2.4 METODOLOGÍA .....	19
2.4.1 Colecta de muestras .....	19
2.4.2 Bioaumentación de microorganismos .....	20
2.4.3 Enriquecimiento y BMP .....	20
2.4.4 Análisis estadístico.....	22
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
2.5.1 Bioaumentación de cultivos.....	24
2.5.2 Enriquecimiento y BMP .....	26
2.5.3 Composición de biogás .....	30
2.6 Conclusiones .....	31
2.7 Recomendaciones .....	31
2.8 Referencias.....	32

## Lista de tablas

Tabla 1. Composición química de la vinaza de caña de azúcar. Fuente: (Christofolletti et al., 2013).....	14
Tabla 2. Ventajas y desventajas de las aplicaciones de vinaza. Fuente: (Cortez et al., 1992).....	15
Tabla 3. Tiempos en los que se tomaron las muestras de los suelos después de que fueron fertilizados con vinaza concentrada.....	19
Tabla 4. Composición del medio mínimo de sales M9 para 1 L de solución.....	20
Tabla 5. Diseño experimental para ensayos de BMP. Se usó vinaza como control general y cada cultivo autoclavado como control específico para cada ensayo. ...	22
Tabla 6. Matriz de marco lógico.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 7. Porcentaje de humedad y sólidos volátiles de las diferentes muestras, tomando como referencia el peso de la materia fresca. ....	26
Tabla 8. Promedio de porcentaje de metano en cada una de las muestras. Se muestra la composición de biogás del tratamiento que mostró un mayor rendimiento en la producción de biogás con respecto a la producción del control vinaza.....	30

## Lista de Gráficas

Gráfico 1. Dinámica de crecimiento microbiano durante la adaptación a vinaza con medio de cultivo (A) selectivo M9 y (B) medio nutritivo. Se alcanza una estabilización del crecimiento después de 120 días.....	25
Gráfico 2. Rendimiento de biogás de inóculo PTAR enriquecido con microorganismos de suelo de la finca Balsora A. Fertilizado hace 3 meses (B3), B. Fertilizado hace 14 meses (B14). Se realizaron mezclas de inóculo PTAR y los cultivos autoclavados (AC) como control. La curva negativa indica que se produjo poco biogás en el proceso. No se tienen barras de error debido a que solo se obtuvieron datos de una réplica. ....	28
Gráfico 3. Rendimiento de biogás de inóculo PTAR enriquecido con microorganismos de suelo de la finca La Judea A. fertilizado hace un mes y medio (J1.5), B. Fertilizado hace 14 meses (J14. Se utilizaron los cultivos autoclavados (AC) como control. No se tienen barras de error debido a que solo se obtuvieron datos de una réplica.....	29

## Lista de Figuras

Fig. 1. Diagrama de producción de etanol y sub-producción de vinaza de caña de azúcar. Fuente: (Christofolletti et al., 2013) .....	14
Fig. 2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada. ....	23

## RESUMEN DEL PROYECTO

Entre las principales actividades económicas de Colombia se encuentran la producción de azúcar y bioetanol, prácticas que generan alrededor de  $3,82 \times 10^{10}$  litros de vinaza anuales. Estos residuos presentan un gran problema ambiental debido a que tienen un pH bajo, alta demanda química (**DQO**) y bioquímica (**DBO**) de oxígeno y elevadas concentraciones de sólidos suspendidos, lo que conlleva a que este residuo sea altamente contaminante en los ecosistemas, especialmente acuáticos, en los que causa eutrofización y disminución de los niveles de oxígeno. Debido a su composición la vinaza se puede utilizar en procesos de digestión anaerobia (**AD**) para obtener biogás como fuente de energía renovable. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto que tiene el enriquecimiento de un inóculo PTAR con microorganismos de suelo fertilizado con vinaza sobre la producción y calidad de biogás, para que a futuro se pueda mejorar la producción de biogás y aprovechar mejor este residuo. Se evaluó el potencial de biogás (**BMP**) del enriquecimiento de un inóculo PTAR con 10% en gramos de sólidos volátiles (**gVS**) de microorganismos de suelos fertilizados con vinaza, provenientes de dos fincas aledañas a la ciudad de Cali. De cada una de las fincas se tomaron muestras de suelo recién fertilizado y suelo después de 14 meses de la fertilización. Se obtuvo que los microorganismos de suelo **B3** optimizaron el proceso, ya que el rendimiento y proporción de metano aumentó con respecto al control con vinaza, mientras que las muestras **J14** y **J1.5** obtuvieron un rendimiento alto gracias a que se adicionó mayor cantidad de materia orgánica. El cultivo **B14** inhibió el proceso.

## ABSTRACT

Within the main economic activities in Colombia the production of sugar and ethanol are practices that generate around  $3,82 \times 10^{10}$  annual vinasse liters. These residues impose a great environmental problem, because their low pH, high chemical (**COD**) and biochemical (**BOD**) oxygen demand and high concentration of suspended solids, which leads to this waste being highly polluting in ecosystems, specially aquatic in which causes eutrophization and decrease in oxygen levels. Due to its composition, vinasse can be used in anaerobic digestion (**AD**) processes to obtain biogas as a source of renewable energy. The objective of this study is to evaluate the effect of the enrichment of a **PTAR** inoculum with microorganisms obtained from soil fertilized with vinasse on the production and quality of biogas, so in the future the production of gas can be improved and take better advantage of the residue. The biogas potential (**BMP**) of the enrichment of the **PTAR** inoculum with 10% in grams of volatile solids (**gVS**) of the soil microorganisms was evaluated. The microorganisms were obtained from two farms near the city of Cali. Two samples of soils were taken from each farm, one freshly fertilized and the other after 14 months of fertilization. The yield of the **B3** culture was high due to the activity of the introduced microorganisms, while the samples **J14** and **J1.5** obtained a high yield thanks to the probably presence of more available organic matter for the **PTAR** inoculum. **B14** culture inhibited the process.

## 1. INTRODUCCIÓN

Entre las principales actividades económicas de Colombia se encuentran la producción de azúcar y bioetanol, prácticas que generan alrededor de  $3,82 \times 10^{10}$  litros de vinaza anuales (Asocaña, 2016; Cortez, Magalhaes, & Happi, 1992). Estos residuos presentan un gran problema ambiental debido a que tienen un pH bajo, alta demanda química (DQO) y bioquímica (DBO) de oxígeno y elevadas concentraciones de sólidos suspendidos, lo que conlleva a que este residuo sea altamente contaminante en los ecosistemas, especialmente acuáticos, en los que causa eutrofización y disminución de los niveles de oxígeno (Zúñiga & Gandini, 2013). En la actualidad, existen diversas estrategias para mitigar los impactos ambientales y darle uso a este residuo, entre las que se encuentra: la concentración por evaporación, uso como fertilizante y producción de biogás mediante digestión anaerobia (AD) (Christofolletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013; Weiland, Verstraete, & Van Haandel, 2009), proceso que consiste en la conversión de la materia orgánica de un sustrato animal o vegetal en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) y otros gases, gracias a la acción de consorcios microbianos que realizan hidrólisis, fermentación y metanogénesis (Angelidaki & Batstone, 2010).

Actualmente se están evaluando estrategias para optimizar el proceso de AD de vinazas, pues son residuos que contienen compuestos recalcitrantes como fenoles y melanoidinas, haciéndolas tóxicas o inhibitorias para los microorganismos anaerobios (E. España-Gamboa et al., 2017). Una de las estrategias para contrarrestar estos compuestos recalcitrantes es la bioaumentación y enriquecimiento de los inóculos usados comúnmente, con microorganismos que favorecen la hidrólisis o fermentación (Čater, Fanel, Malovrh, & Marinšek Logar, 2015; E. G. Ozbayram, Akyol, Ince, Karakoç, & Ince, 2018; E. Gozde Ozbayram, Kleinstuber, Nikolausz, Ince, & Ince, 2017; Zhang et al., 2015). Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es evaluar el efecto del enriquecimiento de un inóculo de planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) con microorganismos de suelo cultivado con caña de azúcar fertilizado con vinaza sobre la producción y composición del biogás.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Una de las industrias que mayor crecimiento presenta en Colombia es la industria de la caña de azúcar, principalmente en la región del valle geográfico del río Cauca, la cual cuenta con aproximadamente 238.204 hectáreas cultivadas con caña, distribuidas entre los departamentos del Cauca, Valle del Cauca, Quindío, Risaralda y Caldas. Durante el año 2016 se produjeron 1.799.996 toneladas de azúcar y 2.549.793 toneladas de bioetanol (Asocaña, 2017), lo que permite estimar, según Navarro, Sepúlveda, & Rubio (2000), una producción de  $3,82 \times 10^{10}$  litros de vinaza en ese año.

La vinaza de caña de azúcar es un líquido de color marrón oscuro, con gran contenido de sólidos suspendidos, pH bajo y altos valores de DQO y DBO (Zúñiga & Gandini, 2013). Estas características hacen de las vinazas de caña de azúcar un contaminante para los ecosistemas ya que tiene la capacidad de cambiar las propiedades de los suelos, causando un desbalance iónico y aumentando los niveles de materia orgánica, lo que altera las relaciones y dinámicas poblacionales en esos ambientes. Además, es un compuesto que se filtra fácilmente hacia los cuerpos de aguas subterráneas, las cuales llegan a aguas superficiales y promueven la eutrofización, caracterizada por el aumento significativo de la materia orgánica y la disminución de los niveles de oxígeno, acabando con la vida aerobia en lagos o ríos (Christofolletti et al., 2013). Una de las estrategias más utilizadas para contrarrestar los efectos negativos de las vinazas de caña de azúcar y sacar provecho de ellas es el tratamiento con AD, porque a partir de esta se puede obtener bioenergía en forma de metano, el cual podría significar una fuente de ingresos importante para la industria (Cortez et al., 1992).

Esta área de investigación es importante para el contexto colombiano debido al aumento en la demanda de productos desarrollados a partir de la caña de azúcar y el crecimiento del consumo energético en Colombia, el cual se prevé, según Paez, Maldonado, & Castro (2017), aumentará anualmente 6.5% hasta alcanzar, en el año 2050, un consumo aproximado de 2000 TWh, frente a los casi 900 TWh consumidos hoy en día.

Es necesario hallar nuevas formas de utilizar los residuos agroindustriales contaminantes que actualmente no tienen una adecuada disposición y que podrían abrir la puerta a la creación y uso de energías renovables limpias, que no afecten el delicado equilibrio ecosistémico por el que pasa actualmente el planeta. Recientemente, la investigación sobre la digestión anaerobia de vinazas enfrenta grandes retos, puesto que no ha habido mucho interés en el sector de la caña de azúcar, gracias a que la viabilidad económica de la generación de electricidad por

medio de biogás es baja. La posibilidad de generar energía a partir de los subproductos de la industria azucarera está siendo reconsiderada, debido a la necesidad de reducir la carga orgánica de estos residuos y por ende su efecto adverso sobre el ecosistema; además de optimizar el balance energético de la industria azucarera (Moraes, Zaiat, & Bonomi, 2015). Es por lo anterior que el proyecto busca responder a la pregunta ¿se puede mejorar la producción de metano a partir de la digestión anaerobia de vinazas empleando una estrategia de bioaumentación y enriquecimiento de un inóculo PTAR con microorganismos de suelos cultivados con caña de azúcar, pre-adaptados a las vinazas?; con el fin de aportar a la disminución del impacto ambiental negativo generado por la mala disposición de las vinazas y a la creación de energías renovables a partir de biomasa residual.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

Una de las industrias con más importancia en Colombia es la industria de la caña de azúcar. Este sector industrial se encuentra distribuido en el valle geográfico del río Cauca, abarcando 47 municipios que van desde el norte del departamento del Cauca hasta el sur del departamento de Risaralda. En estas zonas se encuentran cultivadas aproximadamente 238.204 hectáreas con caña de azúcar, destinadas a la producción de azúcar y bioetanol. En el proceso productivo de azúcar y etanol (Fig 1.) se generan unos residuos líquidos conocidos como vinazas, los cuales tienen altos valores de DQO y DBO, además de concentraciones altas de sulfato y calcio, como se muestra en la tabla 1.

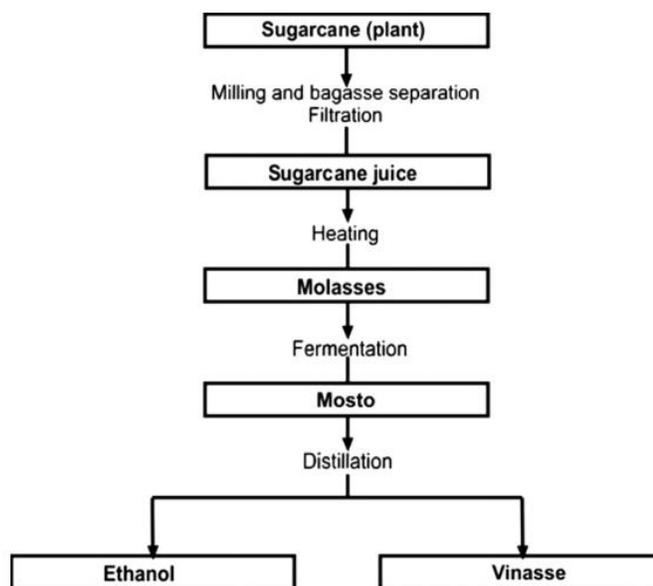


Fig. 1. Diagrama de producción de etanol y sub-producción de vinaza de caña de azúcar. Fuente: (Christofoletti et al., 2013)

Tabla 1. Composición química de la vinaza de caña de azúcar. Fuente: (Christofoletti et al., 2013).

Parámetro	Valor (mg/L), excepto pH	Parámetro	Valor (mg/L)
pH	3.9	Dureza	2493
DBO	5046	Bario	0.41
DQO	13380	Cromo	0.04
Potasio	2056	Cobre	0.35
Sodio	50.2	Mercurio	0.0019
Sulfato	710	Molibdeno	0.008
Calcio	719	Níquel	0.03
Magnesio	237	Zinc	1.66
Fósforo total	190		

Actualmente se está avanzando en la investigación y desarrollo de estrategias para usar o desechar este residuo, entre ellas se encuentran la fertiirrigación, producción de levadura, alimentación animal, combustión en calderas, producción de proteínas y por último la producción de biogás. El proceso que mejores resultados está presentando es la biodigestión para producir gas, ya que se aprovecha en mayor proporción el residuo, pues los productos de la biodigestión anaerobia son biogás y fertilizante. En la tabla 3 se muestran los principales procesos de tratamiento/uso de las vinazas con sus respectivas ventajas desventajas.

*Tabla 2. Ventajas y desventajas de las aplicaciones de vinaza. Fuente: (Cortez et al., 1992)*

Proceso/uso	Ventajas	Desventajas
Fertiirrigación	Bajo costo Fácil implementación	Transporte costoso Se filtra fácilmente y llega a aguas subterráneas
Alimento animal	Bajo costo Fácil implementación	Se ha estudiado poco
Combustión en calderas	Disposición completa Producción de energía Recuperación de potasio en las cenizas	Se ha estudiado poco Pruebas en escala pequeña
Producción de proteínas	Alimento No genera residuos	Costoso Se ha estudiado poco
Biodigestión	Producción de energía Reducción de DBO Efluente se usa como fertilizante	Costoso Uso de tecnología

El proceso de AD es un proceso biológico que consiste en la degradación de materia orgánica tanto animal como vegetal, para luego ser convertida en biogás, compuesto principalmente por CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y trazas de otros compuestos. Estos procesos son desarrollados por consorcios microbianos relacionados sintróficamente. Los procesos de AD son ampliamente usados en el mundo con diferentes fines, que van desde el tratamiento de aguas residuales hasta la generación de energía renovable a partir de residuos agroindustriales (Angelidaki & Batstone, 2010; Carballa, Regueiro, & Lema, 2015). La AD es un proceso en el que se pueden evidenciar cuatro fases o etapas entrelazadas, las cuales son hidrólisis, fermentación (acidogénesis y acetogénesis) y metanogénesis, pudiendo ser observados microorganismos que operan más o menos específicamente en cada etapa (Collins, Woods, Mchugh, Carton, & Flaherty, 2003).

La evaluación del potencial de biometano (BMP) es un proceso de AD que se lleva a cabo en biodigestores, tanques cerrados donde la materia orgánica junto con los microorganismos permanece interactuando durante un tiempo determinado para lograr la descomposición de los sustratos y produciendo gas y biofertilizante

(Pedraza, Chara, Conde, Giraldo, & Giraldo, 2002). El inóculo es muy importante en la AD, pues la producción de metano depende de los microorganismos que se encuentren allí y las relaciones que se generen (Esposito, 2012)

Cuando se realiza un experimento sobre AD se deben tener en cuenta varios factores que influyen en el proceso de producción de biogás. Uno de estos factores es el tipo de sustrato que se quiere evaluar, ya que dependiendo de la composición puede tardar más o menos tiempo en ser digerido y completar el proceso (Doelsch, Masion, Cazevieille, & Condom, 2009; E. I. España-Gamboa, Mijangos-Cortés, Hernández-Zárate, Maldonado, & Alzate-Gaviria, 2012). Para el caso de sustratos con concentraciones altas de lípidos, el proceso puede tomar más tiempo, debido a las largas cadenas de carbono y a las insaturaciones que puedan tener los compuestos agregados (Menezes, Alves, Valeriano, & Guimarães, 2013). En el caso contrario, cuando se usan sustratos con mayor cantidad de azúcares, el potencial máximo puede ser alcanzado en menos tiempo, gracias a la facilidad con la que se metabolizan estos compuestos.

Otro factor decisivo para tener en cuenta en los procesos anaeróbicos es la cantidad de sustrato a usar, pues usando la cantidad adecuada, el rendimiento del proceso incrementa; pero si no se controla bien el sustrato adicionado se puede provocar una inhibición de los microorganismos por una concentración alta de sustrato (Christofolletti et al., 2013). La inhibición del proceso puede ser ocasionada también por la presencia de metales en concentraciones altas o compuestos fenólicos (Seiffert, Kaltschmitt, & Miranda, 2009; Vitória, Rodrigues, Vitória, & Rodrigues, 2016)

La producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de diferentes desechos agroindustriales tuvo sus inicios en Colombia hace más o menos 30 años siguiendo la influencia generada por países europeos como Dinamarca, Alemania, Suecia e Inglaterra. Estas prácticas surgieron como una apuesta para aprovechar los desechos de animales, subproductos de industrias agrícolas o residuos municipales, producidos por ganaderos, grandes industrias y municipios; con el fin de desarrollar nuevas fuentes de energías renovables y aportar a la conservación del medio ambiente (Quintero, Montoya, Giraldo, Sánchez, & Cardona, 2006).

Después del establecimiento de la AD como proceso para tratar residuos municipales y agroindustriales se han evaluado diferentes formas de optimizar el proceso para obtener un mayor rendimiento y producción de metano. Dos de las estrategias que se han empezado a evaluar como métodos para la optimización de la AD son la bioaumentación y el enriquecimiento de los inóculos usados para la AD. La bioaumentación consiste en el aumento de las poblaciones microbianas en un cultivo, con el fin de tener una concentración elevada de microorganismos a partir de una muestra poco concentrada. Por otro lado, el enriquecimiento consiste en agregar microorganismos diferentes a los presentes en la comunidad microbiana

del inóculo usado en la AD, con la finalidad de reforzar y mejorar las relaciones mutualistas entre los microorganismos (Stolp, 1988).

Las relaciones mutualistas entre las bacterias hidrolíticas, fermentativas y metanogénicas son muy importantes para que el proceso de digestión anaerobia pueda ocurrir de manera eficiente (Werner et al., 2011), ya que de ellas depende el rendimiento, cantidad y velocidad de producción de biogás. Recientemente, las investigaciones están enfocando su interés en las estrategias de bioaumentación y enriquecimiento, para mejorar principalmente la tasa de hidrólisis y por consiguiente la producción de metano, a partir de residuos municipales y biomasa vegetal residual de industrias (E. Gozde Ozbayram et al., 2017). Actualmente, el éxito de la bioaumentación sólo ha sido evaluado en sistemas a escala de laboratorio, ya que son sistemas en los cuales las condiciones pueden ser controladas para favorecer la actividad prolongada de las poblaciones microbianas introducidas en el inóculo (Fotidis et al., 2014; Gentry, Rensing, & Pepper, 2004).

Para la AD de vinazas se han evaluado estrategias diferentes de mejoramiento, como el uso de biorreactores de dos fases, en los cuales se separan las etapas de hidrólisis y fermentación de la etapa metanogénica, con el fin de controlar mejor las condiciones de cada fase; por otro lado, también se ha evaluado la codigestión de las vinazas de caña de azúcar con sustratos ricos en lignocelulosa (Cabrera-Díaz, Pereda-Reyes, Oliva-Merencio, Lebrero, & Zaiat, 2017; López González, Pereda Reyes, & Romero Romero, 2017). Es necesario resaltar que el mayor inconveniente por el que pasa la investigación sobre vinazas de caña de azúcar es que las industrias encuentran más fácil utilizarlas directamente como fertilizante de sus cultivos sin tener en cuenta los problemas que pueda ocasionar al ambiente, además de que es necesaria una valorización del biogás como fuente de energía alternativa en los países en desarrollo; lo que conlleva a que haya poco uso de la estrategia de AD en procesos industriales de aprovechamiento de biomasa, viéndose reflejado en la ausencia de plantas de digestión anaerobia en las biorefinerías de caña de azúcar (Moraes et al., 2015).

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del enriquecimiento de un inóculo PTAR con microorganismos de suelo fertilizado con vinaza sobre la producción y calidad de biogás.

### 2.3.2 Objetivos específicos

- Bioaumentar, con un medio de cultivo selectivo, la población de microorganismos adaptados a vinazas.
- Cuantificar la producción de biogás diaria, en los biorreactores anaerobios, del inóculo PTAR y el enriquecido.
- Determinar el porcentaje de metano producido por el inóculo PTAR y el inóculo enriquecido.
- Identificar el inóculo que presente un mejor rendimiento.

## 2.4 METODOLOGÍA

### 2.4.1 Colecta de muestras

Se tomaron muestras de suelos fertilizados con vinaza concentrada, provenientes de dos fincas en las afueras de la ciudad de Cali seleccionadas con base en los siguientes criterios:

- a. Está asociada a Asocaña, por cuestiones de organización en cuanto a la información del tipo de suelo y variedad de caña cultivada en la finca.
- b. Ubicada cerca de la ciudad de Cali, ya que se facilita la recolección de las muestras.
- c. Los cultivos de caña son fertilizados con vinaza.
- d. El cultivador es el administrador de la finca, para mayor facilidad en cuanto a la solicitud de autorizaciones y comunicación.

Una vez seleccionadas las fincas se procedió a la colecta de las muestras siguiendo el método descrito por Tan (2005). Se tomaron cinco submuestras de cada uno de los lotes hasta completar 2000 g. de cada uno, cada submuestra fue tomada de un lugar al azar dentro del área establecida. Las muestras fueron colectadas a una profundidad de 20 cm.

De cada finca se colectaron dos muestras diferentes, una para suelo que fue recientemente fertilizado y otra para suelos que llevaban más de un año sin ser fertilizados, como se muestra en la siguiente tabla.

*Tabla 3. Tiempos en los que se tomaron las muestras de los suelos después de que fueron fertilizados con vinaza concentrada.*

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo desde la fertilización hasta el muestreo</b>
Hacienda Balsora ( <b>B3</b> )	3 meses
Hacienda Balsora ( <b>B14</b> )	14 meses
Hacienda La Judea ( <b>J1.5</b> )	45 días
Hacienda La Judea ( <b>J14</b> )	14 meses

Para el inóculo fueron colectados 20 L de lodo anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la ciudad de Cali.

#### 2.4.2 Bioaugmentación de microorganismos

Se tomaron 10 g de cada muestra y se sembraron en 100mL de medios de cultivo líquido diferentes (medio M9 con 5% de vinaza concentrada y medio nutritivo) en frascos Schott de 1 L, fueron incubadas a 30°C con agitación durante 24 horas y luego se filtraron para remover el suelo. El medio de cultivo filtrado luego fue llevado a incubar a 30°C sin agitación. Se hicieron recuentos de unidades formadoras de colonias siguiendo el método de recuento en placa (Goldman & Green, 2009) y alimentación de los cultivos con 5% de vinaza concentrada cada 15 días, durante más de 120 días. Después de 80 días el volumen del medio fue aumentado hasta alcanzar 1 L.

En la tabla 4 se muestra la composición del medio mínimo de sales M9.

*Tabla 4. Composición del medio mínimo de sales M9 para 1 L de solución.*

<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)</b>
Fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	12
Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	6
Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	2
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	1
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	0,03

#### 2.4.3 Enriquecimiento y BMP

Se calculó el porcentaje de sólidos volátiles del inóculo PTAR y cada uno de los cultivos. La determinación de sólidos volátiles se realizó tomando una muestra de cada sustrato previamente pesada y secándola a 100°C por 24 horas, de ahí se llevó a una mufla a 500°C por otras 24 horas. Luego de que la muestra estuvo seca se volvió a pesar con el fin de determinar el peso perdido por el calentamiento. La diferencia entre el peso inicial y el peso final fue el peso de los sólidos volátiles, los

cuales son compuestos orgánicos que al momento de darse la combustión se convierten principalmente en CO<sub>2</sub>.

Una vez determinados los sólidos volátiles se calculó el total de sólidos volátiles que se tiene del inóculo PTAR en 700 g de muestra, que es la masa usada en los biorreactores disponibles. Se determinó el 10% de los sólidos volátiles del inóculo y se agregó ese valor en sólidos volátiles de cada cultivo, con el fin de enriquecer los microorganismos sin afectar el proceso. Se escogió un valor de 10% g VS con base en el estudio realizado por Zhang et al., (2015).

Una vez realizado el enriquecimiento con el 10 % de cultivo, se procedió a estimar la cantidad de vinaza concentrada a usar como sustrato, empleando una relación inóculo:sustrato de 4:1. Se prosiguió con el montaje de cada reactor con las cantidades de inóculo, cultivo y sustrato establecidas anteriormente. Los biorreactores se dejaron en baño maría con agitación durante 20 días. Se realizó el proceso con duplicados y los controles usados fueron vinaza y los cultivos autoclavados (AC).

Se usa la vinaza como control para contrastar la producción de cada uno de los enriquecimientos. Además, se realizaron controles adicionales agregando el cultivo autoclavado y vinaza, con la finalidad de hallar si la producción de biogás se debe a la participación de los microorganismos adicionados o a que simplemente se agregó materia orgánica al inóculo PTAR, pues una vez autoclavados los cultivos, los microorganismos ahí contenidos pasan a convertirse en materia orgánica que se suma a la agregada en la vinaza.

En la tabla 5 se muestra el diseño experimental, para el cual se montaron 10 biorreactores de 1 L.

*Tabla 5. Diseño experimental para ensayos de BMP. Se usó vinaza como control general y cada cultivo autoclavado como control específico para cada ensayo.*

<b>Muestra</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Proporción de mezcla (sustrato:cultivo)</b>
PTAR	-	-
PTAR	Vinaza	-
PTAR + Cultivo B3	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo B3 Autoclavado (AC)	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo B14	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo B14 AC	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo J1.5	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo J1.5 AC	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo J14	Vinaza	(90:10)
PTAR + Cultivo J14 AC	Vinaza	(90:10)

La curva de rendimiento de biogás se realiza restando el volumen de biogás producido por el inóculo base (PTAR) del volumen producido por el tratamiento, así se evita tener en cuenta el biogás residual que es capaz de producir el inóculo base sin sustrato.

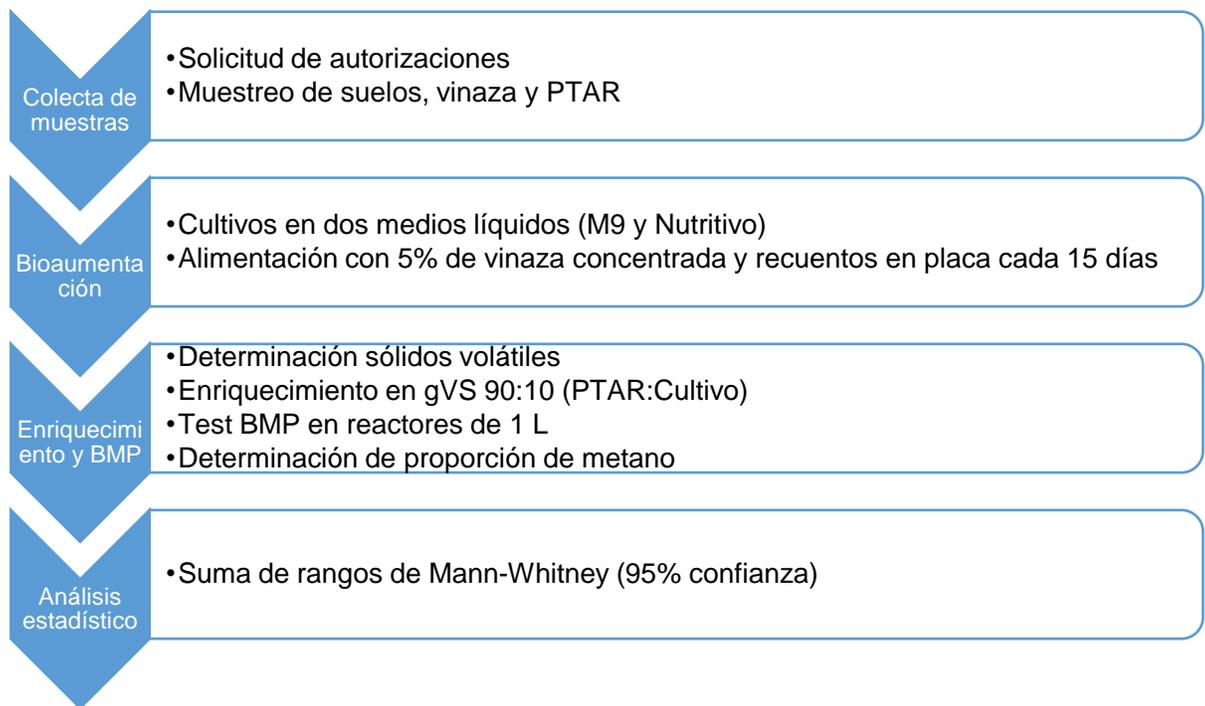
El volumen de gas producido fue determinado por el equipo utilizado, ya que este cuenta con celdas llenas de agua por las que el gas atraviesa, activando un interruptor que mide el flujo que pasa a través de él y lo normaliza según las condiciones ambientales de temperatura y presión. El biogás producido fue colectado en bolsas para muestreo de gases y analizado con el equipo BIOGAS 5000, capaz de cuantificar la proporción de metano en una muestra gaseosa.

#### 2.4.4 Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los resultados se empleó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, ya que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad. Además, se presentó un problema con uno de los biorreactores y por

lo tanto no se pudieron obtener los datos de la réplica de los tratamientos. Con ayuda de la prueba de Mann-Whitney para comparar las medias de dos grupos, se establecieron los enriquecimientos con mayor producción de biogás, se tomaron los valores del rendimiento de biogás de la vinaza como valores de referencia. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con ayuda del programa SigmaPlot para Windows (SigmaPlot 13, Systat Software, Inc.) y se consideraron los valores  $P < 0.05$  como significativos.

En el siguiente diagrama se muestra un resumen de los métodos usados para la realización del proyecto.



*Fig. 2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.*

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1 Bioaugmentación de cultivos

La bioaugmentación de los cultivos generados a partir de las muestras de suelos fue monitoreada durante 120 días. Los cultivos iniciales fueron alimentados hasta que los microorganismos no crecieron considerablemente entre un conteo y el anterior y en este punto se procedió a aumentar el volumen del cultivo hasta llegar a 1 L. Se siguió monitoreando hasta que el crecimiento volvió a estabilizarse. Los datos obtenidos del comportamiento del crecimiento microbiano se muestran en el Gráfico 1.

La dinámica de crecimiento observada en los dos medios de cultivo difiere bastante, ya que los recuentos de los microorganismos cultivados en el medio nutritivo caen considerablemente al final de la estabilización. Esto puede deberse a que en el medio nutritivo existe la proliferación de un mayor número de grupos de microorganismos, los cuales compiten al inicio con los microorganismos que consumen vinaza, reduciendo los títulos finales de los microorganismos cultivables. Como los cultivos fueron incubados sin agitación para generar un ambiente microaerófilo, los títulos tardan en aumentar, ya que la tasa de división celular de los microorganismos anaerobios es menor a la de los aerobios (Bertrand et al., 2015). Después del día 60 de incubación los títulos decrecen debido a que en este día el volumen del medio fue llevado hasta un litro alcanzando el volumen necesario para el posterior enriquecimiento.

Es interesante ver que los microorganismos que se cultivaron en medio M9 alcanzaron concentraciones más altas que las de los cultivados en el medio nutritivo, ya que se esperaba que estos últimos alcanzaran mayores títulos gracias a que el medio nutritivo posee más componentes que pueden ayudar al crecimiento bacteriano. Una posible explicación a este fenómeno es que el medio nutritivo permite crecer gran variedad de microorganismos, los cuales consumen más fácilmente los nutrientes y componentes de este medio, dejando a la vinaza como material biodisponible que no se consume al inicio.

Se debería evaluar si en el medio nutritivo aumentó la diversidad de microorganismos, que luego pudo direccionarse a la selección de pocos grupos mediante una presión selectiva ejercida por la vinaza, pues después de consumida la fuente de carbono aportada por el medio nutritivo esta era la única disponible.

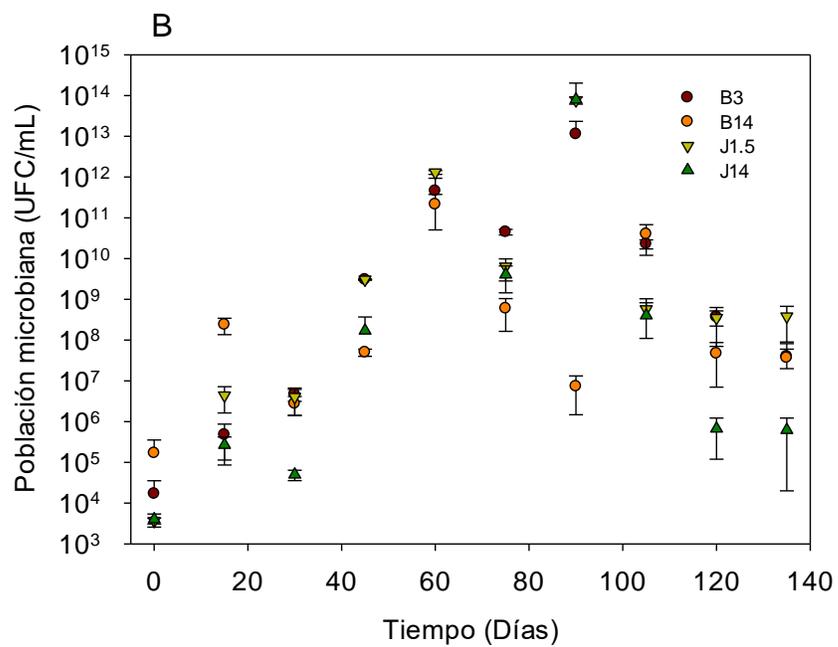
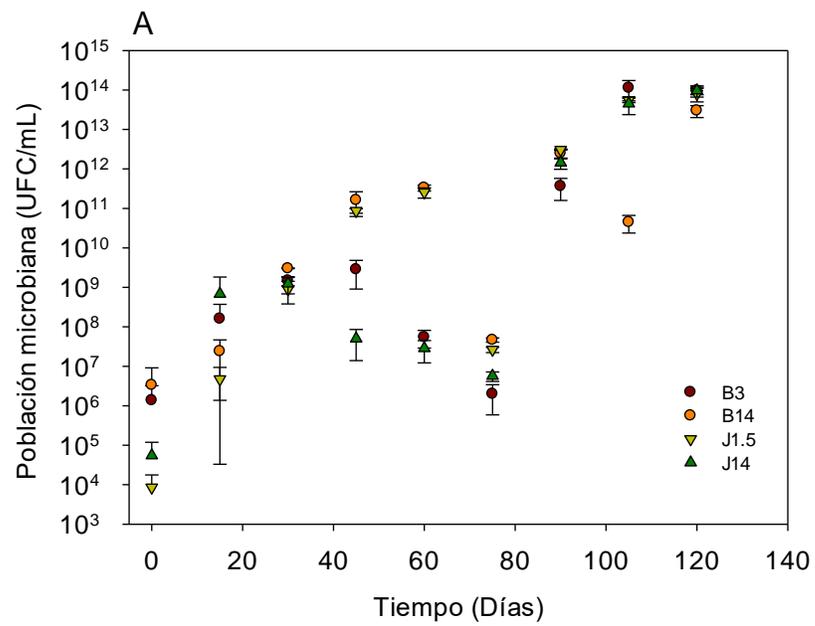


Gráfico 1. Dinámica de crecimiento microbiano durante la adaptación a vinaza con medio de cultivo (A) selectivo M9 y (B) medio nutritivo. Se alcanza una estabilización del crecimiento después de 120 días.

El cultivo en medio nutritivo se realizó con el fin de tener un respaldo de microorganismos, ya que se pensaba al inicio del experimento que en el medio M9 no iban a crecer tan fácilmente los microorganismos, pues la vinaza es un compuesto altamente recalcitrante e inhibitorio. Entonces, con los resultados anteriores se puede decir que la selección y bioaumentación de los microorganismos que pre-adaptados la vinaza es mejor cuando se emplean medios altamente selectivos, pues la competencia con otros grupos generalistas puede ser menor.

## 2.5.2 Enriquecimiento y BMP

Siguiendo con lo descrito en la metodología se procedió a realizar la medición de sólidos volátiles (**VS**). En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la medición de VS de las muestras e inóculo:

*Tabla 6. Porcentaje de humedad y sólidos volátiles de las diferentes muestras, tomando como referencia el peso de la materia fresca.*

<b>Muestra</b>	<b>Humedad (% w/w)</b>	<b>VS (% w/w)</b>
PTAR	$97.09 \pm 2.0 \cdot 10^{-4}$	$1.35 \pm 4.5 \cdot 10^{-4}$
Vinaza	$66.96 \pm 1.5 \cdot 10^{-4}$	$25.76 \pm 4.3 \cdot 10^{-4}$
B3	$93.09 \pm 2.0 \cdot 10^{-4}$	$3.83 \pm 2.3 \cdot 10^{-4}$
B14	$93.86 \pm 2.1 \cdot 10^{-4}$	$3.09 \pm 3.0 \cdot 10^{-4}$
J1.5	$93.72 \pm 3.6 \cdot 10^{-3}$	$3.52 \pm 3.4 \cdot 10^{-4}$
J14	$94.16 \pm 5.2 \cdot 10^{-4}$	$2.92 \pm 7.0 \cdot 10^{-4}$

Para llevar a cabo el experimento en batch se utilizó vinaza como fuente de carbono, microorganismos colectados de suelos fertilizados con vinaza y el inóculo PTAR. Se dejó correr el experimento durante 20 días, tiempo que tardó la curva en estabilizarse y alcanzar su máximo BMP. El resultado principal de las pruebas de BMP son las curvas cumulativas de biogás producido.

Las curvas obtenidas a partir de los datos generados muestran una tendencia hacia una asíntota horizontal describiendo una función logarítmica, la cual representa la producción máxima de biogás por gVS del sustrato. Ya que la vinaza es un residuo

compuesto con una alta DBO, posee una fácil biodegradación, la cual está limitada por la concentración de compuestos inhibitorios que posea. Cuando las curvas acumulativas de biogás muestran tasas bajas puede haber presencia de inhibidores, que conllevan a una producción de gas baja y que puede alcanzar su asíntota antes de que toda la materia orgánica se degrade (Esposito, 2012).

Al utilizar el mismo sustrato en todos los tratamientos es posible comparar cuál de todos es el más eficiente a la hora de degradar la vinaza. En los gráficos 2 y 3 se muestran las curvas de rendimiento de biogás obtenidas en el experimento en batch de BMP realizado, se comparan los rendimientos de cada enriquecimiento contra el rendimiento del inóculo base, empleando en todos los casos vinaza concentrada como sustrato.

Como se observa en la gráfica 2, el rendimiento de biogás para el cultivo B3 es mayor al rendimiento del inóculo PTAR sin enriquecimiento. Se hallaron diferencias significativas entre el rendimiento de biogás del cultivo y los controles vinaza y autoclavado ( $P < 0,001$ ), lo que indica que el aumento en la producción de biogás se debe a la actividad de los microorganismos y no al aumento de materia orgánica. Por lo contrario, el cultivo B14 presentó un comportamiento inhibitorio, pues su curva de rendimiento de biogás fue negativa, indicando que la producción de biogás residual por parte del inóculo PTAR sin sustrato es mayor a la producción de biogás del tratamiento.

Aunque los dos suelos fueron obtenidos de la misma finca, el comportamiento que presentan es diferente, ya que uno aumentó el rendimiento de biogás mientras que el otro inhibió el proceso. Lo anterior podría deberse a la diferencia en el tiempo después de la fertilización con vinaza, pues el suelo B3 estaba recién fertilizado y el cultivo B14 tenía más de un año sin ser fertilizado, lo que pudo ocasionar que la diversidad de los microorganismos adaptados a la vinaza disminuyese.

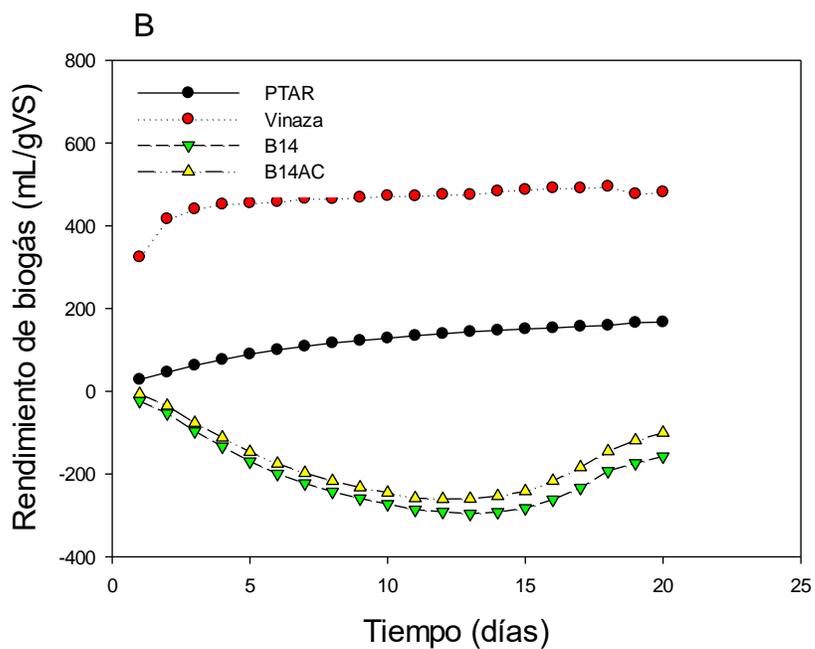
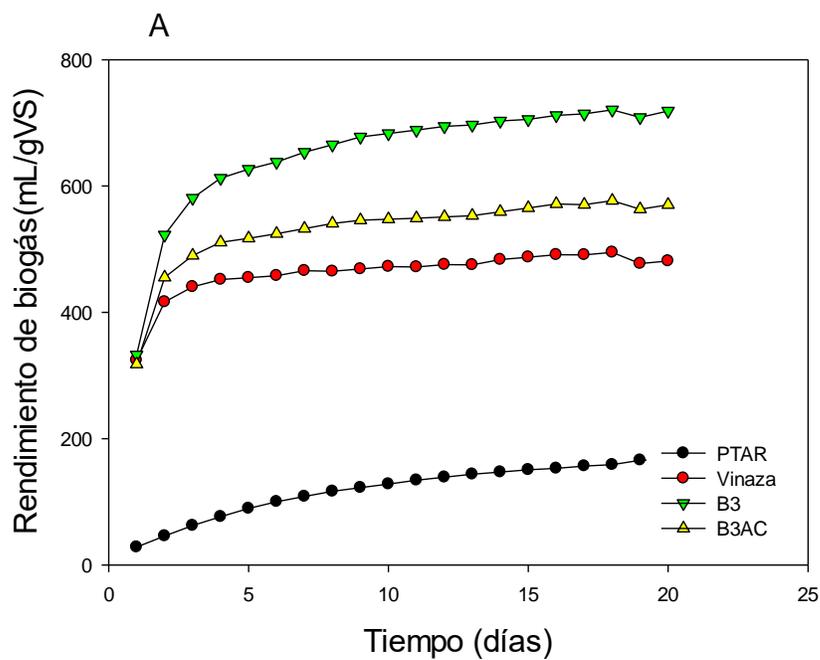


Gráfico 2. Rendimiento de biogás de inóculo PTAR enriquecido con microorganismos de suelo de la finca Balsora A. Fertilizado hace 3 meses (B3), B. Fertilizado hace 14 meses (B14). Se realizaron mezclas de inóculo PTAR y los cultivos autoclavados (AC) como control. La curva negativa indica que se produjo

poco biogás en el proceso. No se tienen barras de error debido a que solo se obtuvieron datos de una réplica.

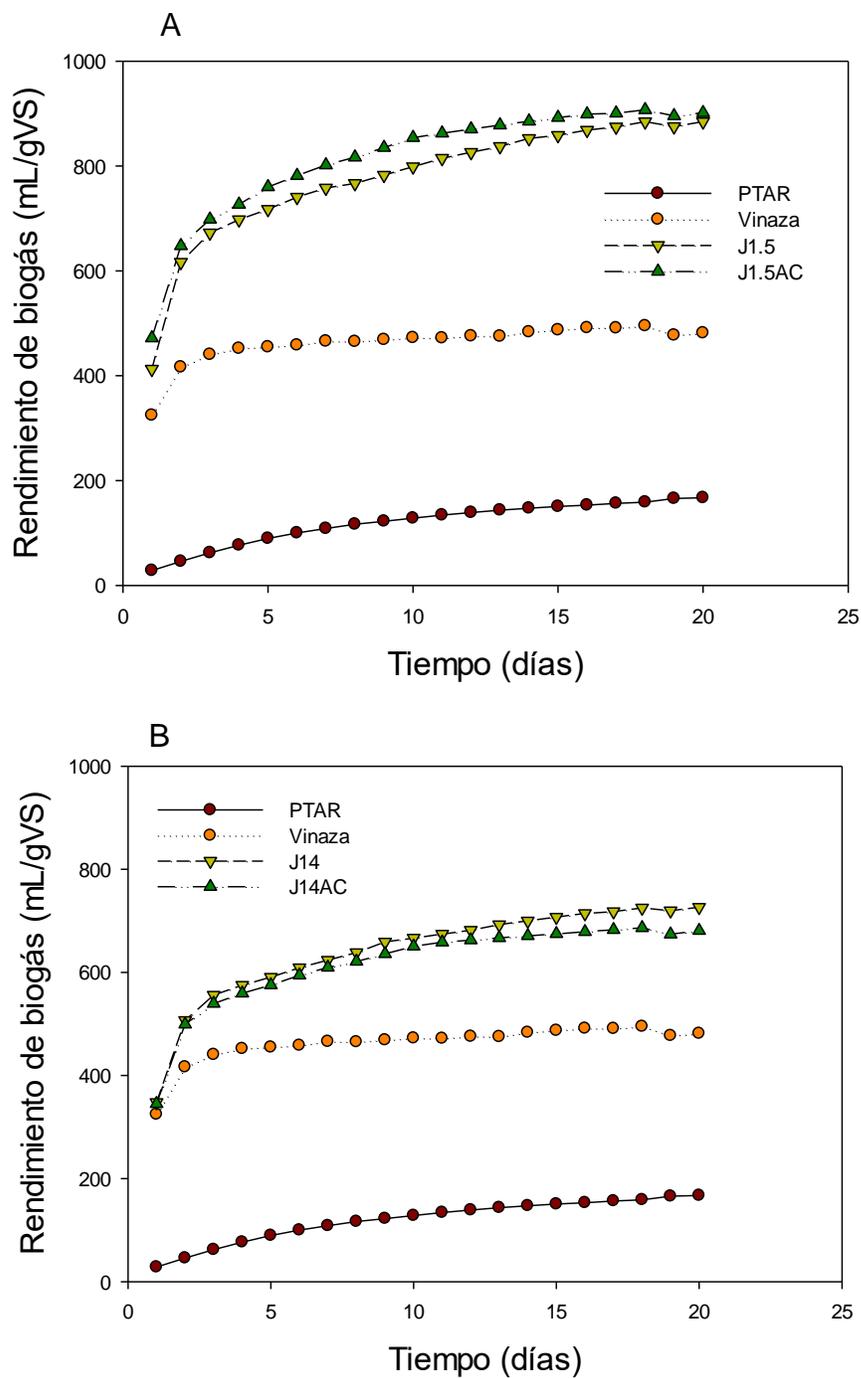


Gráfico 3. Rendimiento de biogás de inóculo PTAR enriquecido con microorganismos de suelo de la finca La Judea A. fertilizado hace un mes y medio (J1.5), B. Fertilizado hace 14 meses (J14). Se utilizaron los cultivos autoclavados

(AC) como control. No se tienen barras de error debido a que solo se obtuvieron datos de una réplica.

En el caso del suelo J1.5 se presentan diferencias significativas entre el cultivo y el control de vinaza ( $P < 0.001$ ), pero no entre el cultivo y el control autoclavado ( $P = 0.091$ ), lo que indica que el incremento en el rendimiento de biogás se debe a la materia orgánica agregada y no a los microorganismos. El inóculo enriquecido con J14 presenta el mismo comportamiento, diferencias significativas entre su rendimiento y el rendimiento del control con vinaza ( $p < 0.001$ ), pero no con el control autoclavado ( $P = 0.148$ ).

### 2.5.3 Composición de biogás

El porcentaje de metano fue cuantificado empleando el medidor portátil Biogás 5000 (Geotech, UK), el cual requería que la muestra tuviera un volumen mínimo de 500 mL para llevar a cabo el análisis. No se pudo realizar análisis estadístico para comparar si hay diferencias entre las muestras, porque el tamaño de muestra fue muy pequeño ( $n = 2$  mediciones).

Con base en los resultados de rendimiento de biogás mostrados en los gráficos 2 y 3 se evaluó la composición de biogás en las muestras que presentaron diferencias significativas entre el tratamiento y los controles, con el fin de evaluar si hubo un efecto en la composición de este. En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos para el porcentaje de metano producido en la muestra de biogás.

*Tabla 7. Promedio de porcentaje de metano en cada una de las muestras. Se muestra la composición de biogás del tratamiento que mostró un mayor rendimiento en la producción de biogás con respecto a la producción del control vinaza.*

<b>Muestra</b>	<b>Metano (%)</b>	<b>Desviación</b>
Vinaza	62.89	7.94
B3	65.90	6.78
B3AC	63.62	10.57

Como se puede ver en los datos mostrados en la tabla 8, no hay diferencia entre el porcentaje de metano producido por el control de vinaza y el tratamiento B3, pues el valor promedio se encuentra dentro del margen de error del porcentaje producido

por el control. Aunque el enriquecimiento del inóculo PTAR con microorganismos de suelo B3 aumentó el rendimiento de biogás a partir de la vinaza concentrada, no aumentó la proporción de metano producida, pues, según Angelidaki & Batstone, (2010) la proporción de metano producido en un proceso de digestión anaerobia depende en mayor medida del sustrato y no tanto del inóculo que se use, por lo contrario, el rendimiento de biogás es más dependiente del inóculo empleado.

## 2.6 Conclusiones

Se logró bioaumentar la concentración de los microorganismos de suelos pre-adaptados a las vinazas concentradas, utilizando un medio de cultivo altamente selectivo.

El enriquecimiento con microorganismos de suelo de la finca Balsora, fertilizado con vinaza hace 3 meses ayudó a incrementar el rendimiento de biogás en el proceso, ya que fue el que presentó un rendimiento mayor a la vinaza y el control autoclavado.

Los rendimientos de los enriquecimientos con microorganismos de suelos la finca Judea no muestran diferencias significativas con respecto a sus controles autoclavados, lo que indica que el incremento en la producción de biogás se debe al aumento de la materia orgánica disponible para el inóculo base proveniente de la PTAR.

La proporción de metano en el biogás producido por el enriquecimiento del inóculo base con microorganismos de suelo de la finca Balsora fertilizado hace 3 meses no presentó diferencias con el porcentaje de metano producido por el control con vinaza, indicando que la producción de metano depende de los sustratos que se empleen en el proceso.

## 2.7 Recomendaciones

Es necesario repetir el experimento ya que por inconvenientes con uno de los biorreactores se perdieron los duplicados.

Evaluar otras fuentes de microorganismos pre-adaptados a la vinaza, como los provenientes de plantas de compostaje en ingenios azucareros.

Se recomienda hacer una evaluación metagenómica de los microorganismos de suelo de la finca Balsora fertilizado hace 3 meses, con el fin de identificar los grupos que participan en el proceso.

Hacer análisis de transcriptómica del cultivo de microorganismos de suelo de la finca Balsora fertilizado hace 3 meses, para determinar las enzimas que participan en los procesos de hidrólisis de la vinaza.

Se recomienda utilizar otra técnica para cuantificar la proporción de biogás en la muestra producida, pues el equipo Biogás 5000 requiere cantidades de biogás que no alcanzan a ser producidas por los tratamientos.

Es recomendable realizar evaluaciones posteriores a la digestión anaerobia, para identificar posibles usos del material digerido.

## 2.8 Referencias

- Angelidaki, I., & Batstone, D. J. (2010). Anaerobic Digestion: Process. In T. H. Christensen (Ed.), *Solid Waste Technology & Management* (Vol. 2, pp. 583–600). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470666883.ch37>
- Asocaña. (2016). Balance azucarero colombiano Asocaña 2000 - 2015. Retrieved August 12, 2017, from <http://www.asocana.org/modules/documentos/5528.aspx>
- Asocaña. (2017). Informe Anual 2016-2017, 92.
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., & Sime- Ngando, T. (Eds.). (2015). *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2>
- Cabrera-Díaz, A., Pereda-Reyes, I., Oliva-Merencio, D., Lebrero, R., & Zaiat, M. (2017). Anaerobic Digestion of Sugarcane Vinasse Through a Methanogenic UASB Reactor Followed by a Packed Bed Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2488-2>
- Carballa, M., Rigueiro, L., & Lema, J. M. (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.008>

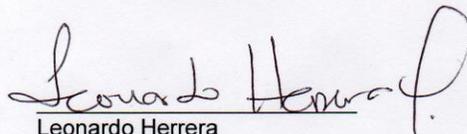
- Čater, M., Faneli, L., Malovrh, Š., & Marinšek Logar, R. (2015). Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 186, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.029>
- Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- Collins, G., Woods, A., Mchugh, S., Carton, M. W., & Flaherty, V. O. ' (2003). Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00217-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00217-4)
- Cortez, L., Magalhaes, P., & Happi, J. (1992). Principais subprodutos da agroindústria canvieira e sua valorização. *Sociedade Brasileira de Planejamento Energético Revista Brasileira de Energia*, 2(2), 1–17.
- Doelsch, E., Masion, A., Cazevieuille, P., & Condom, N. (2009). Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. *Waste Management*, 29(6), 1929–1935. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2008.12.009>
- España-Gamboa, E. I., Mijangos-Cortés, J. O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J. A. D., & Alzate-Gaviria, L. M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-82>
- España-Gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Dominguez-Maldonado, J., Canto-Canché, B., & Alzate-Gaviria, L. (2017). Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *Journal of Biological Engineering*, 11, 6. <https://doi.org/10.1186/s13036-016-0042-3>
- Esposito, G. (2012). Bio-Methane Potential Tests To Measure The Biogas Production From The Digestion and Co-Digestion of Complex Organic Substrates. *The Open Environmental Engineering Journal*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.2174/1874829501205010001>
- Fotidis, I. A., Wang, H., Fiedel, N. R., Luo, G., Karakashev, D. B., & Angelidaki, I. (2014). Bioaugmentation as a solution to increase methane production from an ammonia-rich substrate. *Environmental Science and Technology*, 48(13), 7669–7676. <https://doi.org/10.1021/es5017075>
- Gentry, T. J., Rensing, C., & Pepper, I. L. (2004, September). New approaches for

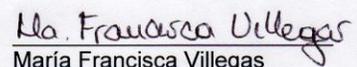
- bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1080/10643380490452362>
- Goldman, E., & Green, L. H. (2009). *Practical Handbook of Microbiology: Second Edition. Journal of Chemical Information and Modeling* (Second, Vol. 53). CRC Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- López González, L. M., Pereda Reyes, I., & Romero Romero, O. (2017). Anaerobic co-digestion of sugarcane press mud with vinasse on methane yield. *Waste Management*, 68, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.016>
- Menezes, E. G. T., Alves, J. G. L. F., Valeriano, C., & Guimarães, I. C. (2013). Physico-chemical and sensorial evaluation of sugarcane spirits produced using distillation residue. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 121–126. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100016>
- Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 888–903. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>
- Navarro, A. R., Sepúlveda, M. del C., & Rubio, M. C. (2000). Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*, 20(7), 581–585. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(00\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(00)00026-X)
- Ozbayram, E. G., Akyol, Ince, B., Karakoç, C., & Ince, O. (2018). Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 491–502. <https://doi.org/10.1111/jam.13668>
- Ozbayram, E. G., Kleinstuber, S., Nikolausz, M., Ince, B., & Ince, O. (2017). Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. *Anaerobe*, 46, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.013>
- Paez, A. F., Maldonado, Y. M., & Castro, A. O. (2017). Future Scenarios and Trends of Energy Demand in Colombia using Long-range Energy Alternative Planning. *International Journal of Energy Economics and Policy*, 7(5), 178–190.
- 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*, 14(1), 1–18. Retrieved from <http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd14/1/Pedr141.htm>

- Quintero, J. A., Montoya, M. I., Giraldo, O. H., Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2006). Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, 33(2008), 385–399. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V2S-4R4DFV0-1/2/1312ab8e1b4392819807a796dae4ba70>
- Seiffert, M., Kaltschmitt, M., & Miranda, J. A. (2009). The biomethane potential in Chile. *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 564–572. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2008.09.005>
- Stolp, H. (1988). Isolation, cultivation and identification. In *Microbial ecology: organisms, habitats, activities* (First, pp. 50–58). Cambridge University Press.
- Tan, K. H. (Kim H. (2005). Principles of soil sampling. In *Soil sampling, preparation, and analysis* (Second, pp. 7–20). Taylor & Francis.
- Vitória, E. L. da, Rodrigues, J. P., Vitória, E. L. da, & Rodrigues, J. P. (2016). Energy efficiency analysis of sugarcane as a raw material for ethanol production. *REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA*, 47(4), 616–623. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160074>
- Weiland, P., Verstraete, W., & Van Haandel, A. (2009). Biomass Digestion to Methane in Agriculture: A Successful Pathway for the Energy Production and Waste Treatment Worldwide. In *Biofuels* (pp. 171–195). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470754108.ch10>
- Werner, J. J., Knights, D., Garcia, M. L., Scalfone, N. B., Smith, S., Yarasheski, K., ... Angenent, L. T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4158–4163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015676108>
- Zhang, J., Guo, R. B., Qiu, Y. L., Qiao, J. T., Yuan, X. Z., Shi, X. S., & Wang, C. S. (2015). Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 179, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.022>
- Zúñiga, V., & Gandini, M. (2013). Caracterización Ambiental De Las Vinazas De Residuos De Caña De Azúcar Resultantes De La Producción De Etanol. *Dyna*, 177(177), 124–131. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v80n177/v80n177a15.pdf>



APROBADO POR:

  
Leonardo Herrera  
Evaluador

  
María Francisca Villegas  
Tutor del Proyecto.