



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla
Gutiérrez

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO BIOQUIMICO

QUE PRESENTA:

JORGE ALBERTO SANCHEZ BALDERAS

CON EL TEMA:

**“DETERMINACIÓN DE LAS BACTERIAS
PARTICIPANTES EN LA DEGRADACIÓN BIOLÓGICA
ANAEROBIA DE LA BIOMASA EN CONDICIONES
MESOFÍLICAS Y TERMOFÍLICAS”**

MEDIANTE:

**OPCION X
(MEMORIA DE RESIDENCIA PROFESIONAL)**

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

OCTUBRE 2015

ÍNDICE

Contenido

Página

Capítulo I Introducción	2
Capítulo II Justificación	5
Capítulo III Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Capítulo IV Caracterización del área de participación.....	9
Capítulo V Problemas a resolver.....	13
Capítulo VI Alcances y limitaciones.....	15
Capítulo VII Marco teórico.....	17
1.1 Biomasa residual	17
1.2 Codigestión	19
1.2.1 Etapas de la descomposición anaerobia	20
1.2.2 Nutrientes	23
1.2.3 Tóxicos e inhibidores	23
1.2.4 Co-digestión de biorresiduos.....	26
1.3 Biodigestor	27
1.4 Instrumentación.....	28
1.5 Mecanismo bacteriano	29
1.6 Bacterias que intervienen en el proceso de biodigestión	31
1.6.1 Bacterias aerobias.....	31
1.6.2 Bacterias anaerobias.....	38
Capítulo II Materiales y métodos	46
2.1 Instalación e instrumentación del equipo	46
2.2 Pruebas de funcionamiento	48
2.3 Determinación de las proporciones de los desechos biológicos empleados	49
2.4 Condiciones de operación	51
2.5 Determinación de bacterias	55
2.5.1 Coliformes.....	55
2.5.2 Salmonella.....	56
2.5.3 Vibrio cholerae.....	57
2.5.4 Desulfovibrio.....	58
2.6 Determinación de DQO.....	59
2.7 Determinación de nitrógeno	59
Capítulo IX Resultados y discusiones	61
3.1 Instrumentación y control.....	61
3.2 Coliformes.....	63
3.3 Salmonella.....	65
3.4 Vibrio cholerae.....	66
3.5 Desulfovibrio	68
3.6 Bacterias anaerobias y aerobias.....	69
3.7 Demanda química del oxígeno	70
3.8 Nitrógeno amoniacal	71
3.9 Producción de biogás	72
Conclusiones	76
Bibliografía	78
ANEXOS	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Clasificación de los residuales de la biomasa	18
Cuadro 2.1 Proporciones de desechos orgánicos obtenidos por el modelo de simplex latice para 35°C	50
Cuadro 2.2 Proporciones de contenido de desechos y agua en los biorreactores	51
Cuadro 2.3 Tiempos de residencia y temperaturas de operación	51
Cuadro 2.5 Preparación de inóculo con caldo lauril sulfato de sodio	55
Cuadro 3.1 Numero más probable para la identificación de coliformes totales	64
Cuadro 3.2 Presencia de <i>Salmonella</i> spp.....	66
Cuadro 3.4 Pruebas bioquímicas para <i>Vibrio cholerae</i>	67
Cuadro 3.5 Presencia de <i>Desulfovibrio</i>	68
Cuadro 3.6 Prueba del tioglicolato	69
Cuadro 3.7 Disminución de DQO en los 5 biorreactores	71
Cuadro 3.8 Producción de nitrógeno amoniacal en cada biorreactor.....	72
Cuadro 3.9 Biogas acumulado a lo largo de todo el proceso para cada biorreactor	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Fases de la digestión anaerobia.....	23
Figura 1.2 Morfología microscópica de <i>Salmonella</i> spp.....	33
Figura 1.3 Morfología microscópica de <i>Vibrio cholerae</i>	36
Figura 1.4 Morfología microscópica de <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	39
Figura 2.1 Biorreactor de mezcla completa.....	46
Figura 2.2 Caja de control de los biorreactores de mezcla completa	47
Figura 2.3 Reóstatos para control de flujo eléctrico.....	48
Figura 2.4 Diagrama general de los procedimientos realizados	54
Figura 3.1 Partes de cada uno de los biorreactores construidos	61
Figura 3.2 Diagrama eléctrico usado para la conexión de los sensores.....	62
Figura 3.3 Resultados de coliformes totales para los 3 biorreactores.....	65
Figura 3.4 Resultados de colonias contadas en placa de <i>Vibrio cholerae</i>	67
Figura 3.5 Concentración de DQO en los biorreactores.....	70
Figura 3.6 Concentración de N-NH ₃ en los biorreactores	71
Figura 3.7 Producción de biogás en cada biorreactor.....	73

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Capítulo I Introducción

La descomposición biológica, es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos, las bacterias son organismos unicelulares procariontes, esto quiere decir que están formados por una sola célula carente de núcleo. Su ácido desoxirribonucleico se encuentra libre en el citoplasma y no tienen organeros, como las mitocondrias, cloroplastos o aparato de Golgi. A pesar de su sencilla organización celular, cuentan con una pared celular que envuelve la célula proporcionándole rigidez y protección. En principio, todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto biológicamente. Sin embargo, muchos compuestos biológicos son difícilmente degradados por los microorganismos debido a sus características químicas.

La biodegradación es un proceso natural, ventajoso no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos. La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno o en su ausencia. La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía. (Volkheimer, 2003)

La digestión anaeróbica consiste en la descomposición de material biodegradable en ausencia de oxígeno para dar como resultado dos productos principales: biogás (compuesto mayoritariamente por metano) y el lodo estabilizado, conocido como digerido. Esta tecnología utiliza reactores (digestores) cerrados donde se controlan los parámetros para favorecer el proceso de fermentación anaeróbica, un proceso muy conocido ya que también se produce de un modo natural y espontáneo en diversos ámbitos, como por ejemplo en pantanos, en yacimientos subterráneos o incluso en el estómago de los animales.

La digestión anaerobia es un proceso muy complejo tanto por el número de reacciones bioquímicas que tienen lugar, como por la cantidad de grupo de bacterias involucradas en ellas. De hecho, muchas de estas reacciones ocurren de forma simultánea. El proceso de degradación de la materia orgánica se divide en cuatro etapas: Hidrólisis, etapa fermentativa, etapa acetogénica, etapa metanogénica; este proceso se lleva a cabo en biodigestores, un biodigestor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo en el

que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancia bioquímicamente activas derivadas de dicho organismos, se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células, libres o inmovilizadas. (Moreno, 2011)

Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos milímetros hasta metros cúbicos son usualmente fabricados en acero oxidable. El biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propias (pH, temperatura, concentración de oxígeno), en un proceso de biodigestión anaeróbica se suelen tener condiciones mesofílicas y termofílicas para la proliferación de los microorganismos.

El término mesófilo, usado sobre todo en el campo de la microbiología, se refiere a un organismo cuya temperatura de crecimiento óptima está entre los 15 y los 35 °C. El hábitat de los organismos mesófilos incluye el suelo, el cuerpo de un animal, etc. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en los 37 °C, el término termófilo se aplica a organismos vivos que pueden soportar condiciones extremas de temperatura relativamente altas, por encima de los 45°C. Estos organismos tienen una tasa de crecimiento rápido pero de corta duración.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Capítulo II Justificación

La producción de residuos sólidos municipales según cifras del Instituto Nacional de Ecología aumenta considerablemente cada año (INECC, 2000), actualmente, la mejor solución para la disposición final de estos son los rellenos sanitarios, la presencia de un gran número de microorganismos presentes en los desechos orgánicos son un foco de infección para la comunidad, con la identificación de dichos microorganismos pueden ser propuestos diversos métodos para la inhibición de estos, es por eso de suma importancia estudiar las diversas alternativas para el aprovechamiento de dichos residuos y de esta manera obtener provecho e inhibir los focos infecciosos al mismo tiempo, algunos autores tales como Catells (2012), consideran el uso de estos desechos para la generación de fuentes de energía, sin embargo a pesar de ser conocidos los métodos para su tratamiento no hay estudios sobre las determinación de las bacterias participantes en el proceso de biodigestión.

C APÍTULO III

OBJETIVOS

Capítulo III Objetivos

Objetivo general

Determinar el comportamiento microbiano del proceso de codigestión llevado a cabo en biorreactores de tanque agitado bajo diferentes condiciones de operación.

Objetivos específicos

- Identificar el grupo coliformes, así como las bacterias *Salmonella spp* y *Vibrio cholerae* como control de toxicidad de los biodigestores al inicio, mitad y final del proceso
- Determinación de las bacterias presentes en condiciones mesofílicas y termofílicas
- Determinar la DQO y producción de nitrógeno amoniacal a lo largo de 30 días de fermentación.
- Cuantificar la producción de biogás en cada biorreactor durante los 30 días de fermentación.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE PARTICIPACIÓN

Capítulo IV Caracterización del área de participación

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Misión

La Universidad Veracruzana ha de asumirse como la principal institución pública autónoma de Veracruz y de la región, cuyas funciones de docencia, investigación, creación y difusión de la cultura y extensión de los servicios universitarios, deben cumplirse con calidad, pertinencia, equidad, compromiso ético, vocación democrática, y en vinculación con los diferentes sectores sociales, en permanente generación y distribución de conocimientos para el desarrollo equitativo y sostenible de su entorno; en la figura 1.1 se pueden apreciar las instalaciones de la universidad veracruzana campus Coatzacoalcos.



Figura 1.1 instalaciones de la universidad veracruzana

Visión a 2025

La Universidad Veracruzana es una institución pública de educación superior cuyas políticas académicas autónomas y transparentes articulan la docencia, investigación, difusión y creación de la cultura y vinculación, a través de una organización académica y administrativa moderna y descentralizada, la cual se sustenta en académicos de alto nivel y en programas educativos de excelencia, acordes a las necesidades locales y de cada región, para la formación integral de estudiantes que, como profesionales, sean competentes en el mercado de trabajo y socialmente responsables.

La Universidad Veracruzana inició su existencia formal el 11 de septiembre de 1944. Su creación recoge los antecedentes de la educación superior en el estado de Veracruz al hacerse cargo de las escuelas oficiales artísticas, profesionales, especiales y de estudios superiores existentes en ese entonces dentro de la entidad.

A sus 68 años de creación se ha convertido en la principal institución de educación superior en el estado de Veracruz. Lo que nació como un pequeño grupo de escuelas y facultades es ahora una universidad grande y compleja, con presencia en cinco regiones universitarias y en 28 municipios a lo largo del territorio veracruzano.

La Universidad Veracruzana ha experimentado importantes cambios a lo largo de su evolución. Cambios que se manifiestan principalmente en una diversificación de los campos abordados, en el número de áreas de formación y carreras que ofrece, en la cantidad y calidad de sus programas relacionados con las actividades de investigación, extensión universitaria y difusión cultural. Actualmente nuestra Institución atiende una matrícula de 62,129 estudiantes en 304 programas de educación formal: 172 de licenciatura, 122 de posgrado, 10 de TSU. Otros 12,675 estudiantes son atendidos en programas de educación no formal, a través de los Talleres Libres de Arte, Centros de Idiomas, de Autoacceso, de Iniciación Musical Infantil, Departamento de Lenguas Extranjeras, Escuela para Estudiantes Extranjeros y, Educación Continua, por lo que la matrícula total atendida es de 74,804 estudiantes.

La Universidad Veracruzana ha realizado serios esfuerzos en el terreno de la creación y desarrollo del conocimiento científico y tecnológico. En los últimos 25 años ha comenzado a establecer las bases académicas y de infraestructura necesarias para potencializar sus actividades de investigación científica y tecnológica.

La planta administrativa está constituida por un total de 5,236 personas entre funcionarios, personal de confianza y personal administrativo técnico y manual. Este personal desempeña diversos tipos de actividades de carácter administrativo y de apoyo a las labores de docencia, investigación y extensión y difusión cultural de la Universidad.

El personal académico de la Universidad Veracruzana está constituido por maestros, investigadores, ejecutantes, instructores del deporte y técnicos académicos, que tienen a su cargo desempeñar actividades de docencia, los programas de investigación, las actividades deportivas, de creación e interpretación artística y

difusión y extensión universitaria, rigiéndose por los principios de libertad de cátedra, de investigación y de creación e interpretación en el arte.

El proyecto se realizó en dos laboratorios, el de operaciones unitarias donde se mantuvieron los biodigestores trabajando a cargo del M. SCs Florentino Sánchez Portilla y el laboratorio de investigación para el análisis microbiológico que está a cargo del Dr. Oswaldo Guzmán López.

CAPÍTULO V

PROBLEMAS A RESOLVER

Capítulo V Problemas a resolver

Este proyecto surge para dar solución a los problemas de la comunidad y del sector biotecnológico entre los cuales encontramos:

- Generar estrategias de tratamiento de los desechos sólidos
- Disminución de los niveles contaminación ambiental a través del aprovechamiento de todos los residuos sólidos municipales.
- Obtención del conocimiento sobre los tipos de bacterias que intervienen en los procesos de biodigestión
- La reducción de los agentes infecciosos presentes en los desechos domésticos y bovinos.

CAPÍTULO VI

ALCANCES Y LIMITACIONES

Capítulo VI Alcances y limitaciones

Para este proyecto se establece realizar un seguimiento de la población microbiana en 3 ensayos determinados en el diseño de experimentos por el método “Simplex Lattice” con diferentes condiciones de operación y concentraciones de los componentes de la mezcla.

Todos los objetivos de este proyecto fueron cumplidos, a partir de los análisis microbiológicos realizados se puede comprender un poco mejor las bacterias implicadas en el proceso de biodigestión, así como el proceso bioquímico que se lleva a cabo en un proceso de codigestión.

Limitaciones:

Durante las pruebas y operación de los biorreactores, se tuvieron limitaciones en la operación, debido por un lado a que por la potencia de las resistencias se quemaron los termopozos de un par de biorreactores, lo que ocasionó la reiniciación de los ensayos con 2 nuevos biorreactores; y por otro, el que debido a las condiciones climáticas de la región, se interrumpió el acceso al campus de la Universidad en un par de ocasiones hasta por tres días seguidos cada vez, lo que produjo la necesidad de realizar algunas pruebas de determinación más de una vez. Por otro lado, el proveedor de los reactivos retrasó la entrega de éstos una semana, lo que originó como consecuencia el diferir la realización de las pruebas bacteriológicas.

CAPÍTULO VII

MARCO TEÓRICO

Capítulo VII Marco teórico

1.1 Biomasa residual

De acuerdo con muchos autores, tales como Seoáñez Calvo (2013), indican que el término biomasa se asocia a la materia viva o en su defecto, también la consideran como la materia orgánica originada por un proceso biológico, ya sea espontáneo o provocado, que puede utilizarse como fuente de energía. (Catells, 2012)

Por otro lado, en la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588, se cataloga a la biomasa como todo material de origen biológico con excepción de aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización. Dentro de los cuales se consideran el carbón, el petróleo y el gas natural

También el Comité Europeo de Normalización y la Directiva SER 2001/77/CE en su artículo 2.b, define a la biomasa como la fracción biodegradable de los productos, subproductos y residuos provenientes de la agricultura, incluidas las sustancias animales y vegetales, de la silvicultura y de las industrias de ambas, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y urbanos, sólidos, líquidos y pastosos.

La biomasa residual y en general todo tipo de ella, tiene un gran potencial para uso energético, toda vez que es energía solar almacenada mediante la fotosíntesis, proceso que permite a organismos vivos convertir los compuestos inorgánicos del carbono en compuestos orgánicos utilizando la energía del sol. Lo que significa que dentro de su trato para fines energéticos, ya sea mediante su quema o cualquier otro proceso no altera el balance de carbono, debido que el carbono que se libera ya forma parte de la atmósfera actual.

Debido a las actividades humanas, sus costumbres de consumo y comercio, así como de la naturaleza misma, se generan diariamente grandes cantidades de residuales orgánicos o de biomasa, que pueden clasificarse acorde con el cuadro 1.1

Cuadro 1.1 Clasificación de los residuales de la biomasa (Seoáñez Calvo, 2013)

RESIDUALES DE LA BIOMASA	RESIDUALES GANADEROS	Explotación	Animales muertos, estiércol, orina
		Industrial	Sangre, carne, cueros, huesos, cuernos, pezuñas, pelos, piel, grasa
	RESIDUALES PESQUEROS	Alimentos no consumidos, individuos muertos, heces, lodos, Organismos incrustados	
		Residuos animales	Cabezas ,espinas, piel, colas, vísceras, conchas
	RESIDUALES ORGÁNICOS URBANOS	Sólidos	Domésticos (cocina), restos de jardinería, papel, cartón
		Líquidos y pastosos	Aguas residuales, lodos de fosas sépticas, lodos de depuradoras
	RESIDUALES FORESTALES	Conservación y manejo selvas y bosques	Podas , limpias, claras, corta pies maderables, raíces y tocones
		Industriales	Ramas, cortezas, virutas, serrines, lodos
	RESIDUALES AGROINDUSTRIALES	Vinícolas, alcohol y cerveza (fermentativas)	Vinaza, restos vegetales
		Alimentarios	Bagazos, cáscaras, huesos, frutos, etc.

Los residuales orgánicos o de la biomasa cuando se acumulan y no se les da un tratamiento, pueden llegar a generar graves problemas tanto de salud pública como medioambientales, toda vez que durante su descomposición a cielo abierto, generan cultivos de microorganismos patógenos que mediante los vectores que son atraídos hacia esos residuales, se transmiten hacia la población circundante; o son lixiviados junto con los metales pesados hacia los mantos freáticos que necesariamente surten de agua a poblaciones. Todo ello provoca severos problemas en la salud de las diversas poblaciones. Además de lo anterior, su descomposición genera

gases de efecto invernadero. Lo que significa, que al acumularse esos residuales en el suelo sin tratamiento, generan contaminación tanto en suelo como en agua y aire.

1.2 Codigestión

El desarrollo de la tecnología de descomposición anaerobia tiene lugar a principios del siglo XIX vinculándose a la escasez de combustibles. En Europa florece después de la Segunda Guerra Mundial, siendo los tratamientos biológicos y los tratamientos terciarios los principales potenciadores de los incipientes procesos de tratamiento de residuos. A causa de la crisis energética de los setenta, el proceso de descomposición anaerobia creció significativamente, orientada hacia la producción de biogás como alternativa al petróleo. En la actualidad China e India son los mayores consumidores de biogás del mundo, alcanzando gran auge en las comunidades rurales, donde se producen grandes cantidades de combustible y fertilizante a partir de residuos agroindustriales y domésticos (Industria Turismo y Comercio, 2010).

A pesar de que se trata de un proceso complejo, que exige un proyecto y una explotación adecuada y profesional, su uso para el tratamiento de los residuos orgánicos y la estabilización de biorresiduos se ha incrementado notablemente (Hansen K. , 1999). Actualmente, el interés de estas tecnologías está motivado, además de por el elevado precio de los combustibles fósiles, por el empobrecimiento de los suelos agrícolas en materia orgánica, por el encarecimiento de los fertilizantes minerales, y por la creciente sensibilización social hacia los problemas del medio ambiente.

Hay diferentes configuraciones de los procesos de digestión. La primera en ser estudiada fue la digestión en una fase o sencilla, es decir, aquella en la que todas las etapas de la digestión tienen lugar dentro del mismo medio común. Posteriormente comenzó el desarrollo de la digestión en dos fases, dividiéndose las etapas del proceso en dos compartimentos independientes. Por otro lado atendiendo al contenido en humedad del sustrato a degradar se consideran dos grandes grupos: procesos húmedos o de baja concentración de sólidos y procesos secos o de alta concentración de sólidos.

En los procesos anaeróbicos de baja concentración de sólidos o húmedos, la concentración de sólidos suele estar en el intervalo alrededor del 4 al 15% de sólidos totales (ST). Es un proceso muy empleado para tratar la fracción orgánica de los residuos urbanos, residuos animales y residuos agrícolas. Esta alternativa es interesante

cuando se dispone de fangos de depuración de aguas residuales que se quieren estabilizar. Los sistemas en húmedo y una sola fase han estado en uso durante décadas para la estabilización anaerobia de los biosólidos producidos en las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (Cuetos, 2007).

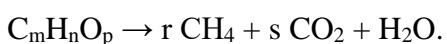
En los procesos anaeróbicos de alta concentración de sólidos o secos, la concentración de sólidos suele estar en el intervalo 20 – 40% de ST, así que sólo los substratos muy secos (>50% ST) necesitan ser diluidos con agua del proceso. Esta mayor concentración de sólidos está ligada a una menor necesidad de agua. Por otra parte, la producción de gas por unidad de volumen de reactor es mayor. Esta tecnología partió de la empleada para la digestión de estiércol, demostrándose que la producción de biogás en sistemas donde los residuos eran mantenidos en su estado sólido original era similar a aquellos diluidos con agua (Cuetos, 2007).

1.2.1 Etapas de la descomposición anaerobia

La degradación anaerobia es un proceso complejo en el que intervienen diferentes grupos microbianos, de manera coordinada y secuencial, para descomponer la materia orgánica en condiciones anóxicas. El principal producto obtenido es el biogás, cuya riqueza en metano va a depender del residuo degradado y del propio proceso (Coombs, 1990). Además, el producto líquido o sólido remanente (denominado digerido o digestato) contiene los componentes orgánicos difíciles de degradar junto con el nitrógeno, fósforo y otros elementos minerales presentes inicialmente en la biomasa (Mata-Álvarez, 2002).

La interacción cooperativa de varios grupos fisiológicos de procariotas permite la formación de metano a partir de sustancias de elevado peso molecular, tales como polisacáridos, proteínas y grasas. Los precursores inmediatos del metano son el hidrógeno, el dióxido de carbono (metanogénesis hidrogenotrófica) y el ácido acético (metanogénesis acetoclástica), los cuales se generan por las actividades de los fermentadores anaerobios (Cuetos, 2007).

El proceso bioquímico de la descomposición anaerobia se puede representar mediante la siguiente reacción:



Esta simple expresión de degradación de la materia orgánica, refleja en realidad un conjunto de etapas, en serie o serie/paralelo, en las que están implicadas un número considerable de especies bacterianas (Baraza, 2003).

Tradicionalmente, la degradación anaerobia ha sido considerada como un proceso en dos etapas, en primer lugar se produce la hidrólisis y fermentación de la materia orgánica compleja, fraccionándose en ácidos orgánicos simples e hidrógeno. A continuación tiene lugar la conversión de ácidos orgánicos en metano (metanogénesis). En base a esto se determina la existencia de dos grandes grupos bacterianos, las bacterias formadoras de ácidos o acidogénicas y las bacterias formadoras de metano o metanogénicas (McCarty, 1981).

Sin embargo, una descripción más detallada del proceso obliga a considerar hasta cuatro etapas sucesivas (Romero, 2002):

- La hidrólisis

Las bacterias celulolíticas, bacterias hidrolíticas y bacterias acidógenas excretan exoenzimas, que provocan la ruptura de los polímeros orgánicos hasta subunidades más pequeñas, fácilmente transportadas al interior celular. De este modo, las proteínas son hidrolizadas por proteasas a péptidos y aminoácidos; las grasas son hidrolizadas por lipasas, a ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y moléculas de glicerol; y los polisacáridos son hidrolizados por amilasas, sacarasas, glucosidasas a azúcares y alcoholes. Después las bacterias fermentativas convierten a estos intermediarios en ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno y dióxido de carbono (Salminen, 2002). La hidrólisis es una etapa indispensable, dado que los microorganismos de las etapas posteriores sólo son capaces de actuar sobre la materia orgánica disuelta, pudiendo considerarse que la velocidad de producción de biogás es proporcional a la velocidad de solubilización de materia orgánica (Fernández, 2000); por lo que esta etapa, es generalmente el paso limitante de todos los procesos de digestión anaerobia si el sustrato está en forma sólida (Vavilin, 2001) o con altas concentraciones de materia orgánica particulada. Por otra parte, los residuos lignocelulósicos se caracterizan por ser un material refractario a la hidrólisis, ya que contienen complejas matrices de celulosa, hemicelulosa y lignina, que tienen efecto limitante en la actividad de los microorganismos o sus enzimas para degradar rápidamente estos materiales, en especial la lignina (Jiménez, 1990). Los polímeros de cadena larga de la celulosa y hemicelulosa se hidrolizan a mono o disacáridos por enzimas holocelulóticas extracelulares (Tong, 1990).

- La fase ácida o fermentación acidogénica

Las bacterias acidificantes transforman la materia orgánica disuelta, originando una gran variedad de productos de fermentación. Los productos finales son principalmente AGV (acetato, propionato, butirato, succinato), así como pequeñas cantidades de ácido láctico y etanol, dióxido de carbono e hidrógeno. La cinética del proceso es relativamente rápida y el pH óptimo bajo. Estos procesos son la base energética de las poblaciones no metanogénicas (Cuetos, 2007).

- La acetogénesis

Los componentes más reducidos de la fermentación acidogénica son oxidados, bajo condiciones anaerobias, a ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, que sirven de sustrato a bacterias metanogénicas. Así los AGV (con tres o más carbonos) y los AGCL son oxidados a acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Esta conversión es sólo posible si la presión parcial de hidrógeno se mantiene en valores bajos, con presiones parciales menores de 10^{-3} atm (Zinder, 1984). Esta oxidación es llevada a cabo por bacterias facultativas que viven en estrecha colaboración con las bacterias metanogénicas. Son bacterias sintróficas denominadas “acetógenas” u “organismos protón-reductores obligados” (McCarty, 1981). Se produce también la respiración acetogénica de bicarbonato por bacterias homoacetogénicas. Estas bacterias catabolizan mezclas de dióxido de carbono e hidrógeno a compuestos de carbonos múltiples. Pueden producir ácido acético, pero las bacterias metanogénicas compiten con ellas por el hidrógeno.

- La fase metanogénica

El dióxido de carbono e hidrógeno se combinan para producir metano y agua mediante un tipo de microorganismos, mientras que otros convierten el acetato en metano y dióxido de carbono. Los microorganismos responsables de la primera etapa suelen denominarse utilizadores de hidrógeno o hidrogenotróficos, mientras que los responsables de la segunda transformación se denominan acetoclásticos (Massé, 2000).

En la figura 1.2 se muestra el esquema de las cuatro fases presentes en la descomposición anaerobia

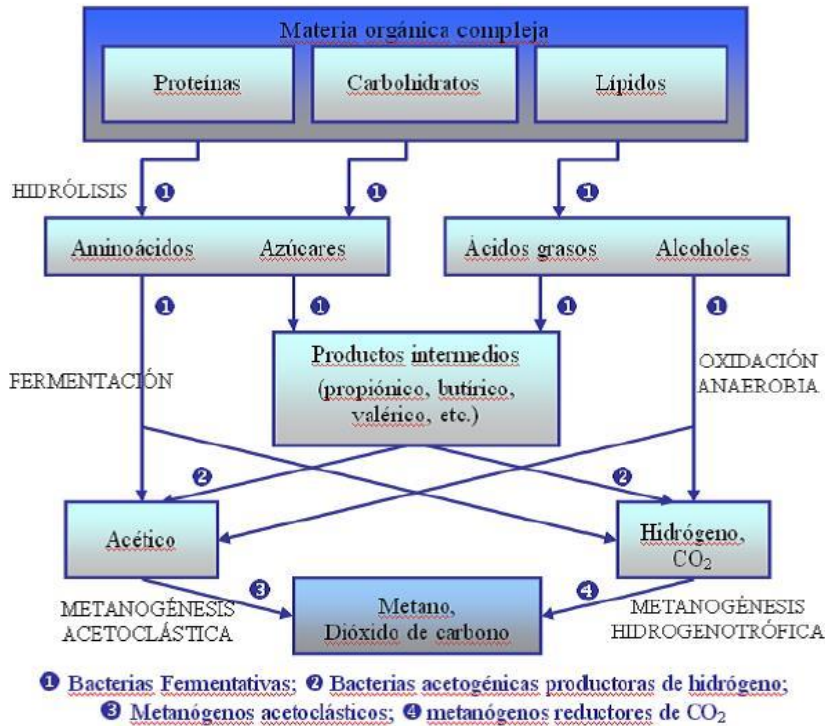


Figura 1.2 Fases de la digestión anaerobia (Massé, 2000)

1.2.2 Nutrientes

El proceso anaerobio se caracteriza por los bajos requerimientos de nutrientes, a diferencia del aerobio, debido básicamente a los bajos índices de producción de biomasa que presenta. A pesar de ello, la biomasa requiere para su desarrollo del suministro de una serie de nutrientes minerales, además de una fuente de carbono y energía. Entre los nutrientes minerales del sistema anaerobio destacan nitrógeno, azufre, fósforo, hierro, cobalto, níquel, molibdeno, selenio, riboflavina y vitamina B12. Estos nutrientes deben estar en forma directamente asimilable por los microorganismos. Los principales nutrientes son nitrógeno y fósforo (Fernández-Polanco F. G., 2000), considerándose que la relación C/N debe oscilar entre 15-35/1.

1.2.3 Tóxicos e inhibidores

La magnitud de la toxicidad es función de diversos factores, destacando concentración, antagonismos y sinergismos, formación de complejos y aclimatación, por lo que una misma sustancia puede considerarse

tóxico o substrato. Frecuentemente la concentración es el único factor que usualmente se considera, lo que lleva a afirmaciones absolutistas, en ocasiones erróneas (Campos, 2001).

Los compuestos que más comúnmente presentan problemas de inhibición en la digestión de los residuos utilizados son:

- Hidrógeno

Muchos autores consideran que el seguimiento de la concentración de H₂ en el sistema permite predecir desequilibrios en las poblaciones microbianas. Sin embargo, (Voolapalli, 2001) afirma que se ha dado demasiado énfasis a la importancia del H₂ como parámetro de control. La acumulación de hidrógeno inhibe la β-oxidación, ya que ésta sólo ocurre si la presión parcial de hidrógeno es baja. Se cree que una concentración de hidrógeno de más de 40·10⁻⁹M es crucial en la regulación del flujo de carbono durante la mineralización de la materia orgánica. Concentraciones de hidrógeno mayores dirigirán el flujo de electrones de la producción de metano a la producción de butirato, propionato, lactato o el etanol (Schink, 1997).

- Lípidos

La acumulación de lípidos en el medio de degradación puede convertirse en un obstáculo para el proceso de digestión, siendo frecuentemente los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y los ácidos grasos volátiles AGV el origen del colapso. El efecto inhibitorio de los lípidos puede ser contrarrestado por la adaptación de los microorganismos oxidadores de los AGCL y AGV, los cuales degradan dichos compuestos a medida que se van produciendo.

Durante el proceso de hidrólisis, las lipasas extracelulares liberadas por bacterias acidogénicas comienzan la degradación de los lípidos, pudiéndose generar altas concentraciones transitorias de AGCL. Una acumulación de estas moléculas puede causar la inhibición del proceso de digestión por su toxicidad para acetógenos y metanógenos, precisamente los dos grupos principales en la oxidación de los AGCL a AGV (Salminen, 2002). Por otro lado, la acumulación de AGCL también puede inhibir la digestión como consecuencia de la adsorción de estos compuestos alrededor de las partículas de biomasa, afectando a los procesos de transporte por flotabilidad de la biomasa en el reactor e incluso formación de espumas y estratificación del reactor.

Los AGV constituyen una herramienta importante en la monitorización y control de reactores anaerobios, mostrando rápidas respuestas ante variaciones en el sistema, como sobrecargas orgánicas o introducción de

tóxicos (Ahring B. S., 1995). El aumento de su concentración está relacionado con la disminución en la producción de biogás (Hill, 1987). Y es que diversas citas bibliográficas relacionan la acumulación de ácidos grasos volátiles con la inhibición de varios puntos del proceso de metanogénesis.

La acumulación de propiónico y de acético en el reactor puede provocar inhibición en la acetogénesis. A su vez, (Barredo, 1991) vincula la acumulación de propiónico con inhibición de la metanogénesis acetoclástica, mientras que (Ahring B. W., 1988), relaciona la acumulación de acético con inhibición de la acetogénesis a partir de butírico. Sin embargo son necesarias concentraciones de acético superiores a $4000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para afectar la producción de metano.

- Nitrógeno

La inhibición de la descomposición anaerobia de residuos de alta carga orgánica suele ser también causada por altas concentraciones de amonio, producido en la degradación proteica de residuos ricos en nitrógeno (Wang, 2003). La dificultad para degradar residuos con gran contenido en nitrógeno se atribuye a su alto contenido de amoníaco total ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), que aunque es un nutriente necesario para las bacterias que intervienen en el proceso de digestión, cuando su concentración excede de un cierto límite puede inhibir la metanogénesis. La concentración de amoníaco libre (NH_3) se ha propuesto como un componente activo causante de la inhibición por amonio. El nivel de la concentración total de amonio recogido en la literatura depende de diferentes condiciones como el inóculo, el sustrato, el periodo de operación, el pH y la temperatura. A su vez, la relación entre amoníaco libre y total depende del pH y la temperatura, de acuerdo con la expresión del equilibrio químico de la disolución (Calli, 2005).

Se ha demostrado que poblaciones adaptadas permiten tolerancias de amoníaco de $4.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Angelidaki, 1993), (Tchobanoglous, 1995) y (Siegrist, 2005) señalan que concentraciones de amonio de hasta $5.0 - 8.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ pueden ser toleradas por los microorganismos si el pH es suficientemente bajo.

(Sawayama, 2004), encontró que la producción de metano decrece a concentraciones de amonio de $6.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en el seno del digestor, confirmando una mayor toxicidad para los metanógenos frente al resto de poblaciones bacterianas. Hashimoto (1986), sitúa el umbral de toxicidad en $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de amoníaco total en poblaciones no adaptadas. Por otra parte (Hansen K. A., 1998) y (Angelidaki, 1993), confirman que la metanogénesis es inhibida a concentraciones iniciales de amoníaco libre del rango de 0.1 a $1.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que (Braun, 1981) situó como umbral de toxicidad por amoníaco libre $0.15 - 0.20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Dos mecanismos diferentes se atribuyen a la inhibición de los metanógenos por amonio. En primer lugar, el mecanismo de las enzimas sintetizadoras de metano está directamente inhibido por amoniaco libre, y en segundo lugar, el amoniaco libre difunde pasivamente al medio intracelular convirtiéndose en amonio dadas las condiciones de pH (Calli, 2005). Para evitar posibles inhibiciones o colapsos por amonio, los residuos orgánicos generalmente se diluyen con agua, lo que se traduce en un aumento en el tamaño y costes del reactor (Cuetos, 2007). Asimismo, para mejorar la eficiencia del proceso conviene evitar el aporte de materia con alto contenido de nitrógeno al lecho de digestión.

1.2.4 Co-digestión de biorresiduos

La descompensación de los factores que afectan al proceso de digestión puede provocar su colapso. Frecuentemente la problemática reside en un inadecuado balance de nutrientes en el medio de biodegradación. Para solucionar este problema, muchos autores han propuesto la codigestión de distintos substratos para obtener mejores balances de nutrientes en la mezcla resultante.

Los beneficios de la codigestión incluyen (Sosnowski, 2003):

- 1) Dilución del potencial tóxico de algunos compuestos.
- 2) Mejora del balance de nutrientes.
- 3) Efectos sinérgicos entre los microorganismos.
- 4) Posibilidad de modulación de la carga orgánica biodegradable.
- 5) Mejora del rendimiento de producción de biogás.

La codigestión presenta un gran interés desde el punto de vista técnico, ya que permitiendo el uso de las instalaciones existentes, incrementa enormemente la producción de biogás, lo que se traduce en una mayor cantidad de energía producida en las unidades de cogeneración (Sosnowski, 2003).

1.3 Biodigestor

Un biodigestor está constituido principalmente por: un contenedor cilíndrico principal dentro del cual se depositan los desechos orgánicos, los cuales pueden ser de origen animal o vegetal. También posee tuberías por las cuales se conduce el gas y, salen el efluente y los lodos; válvulas para toma de muestra y, de seguridad para el gas; además un depósito de gas.

El proceso de producción de biogás se inicia llenando el contenedor principal con los desechos orgánicos mezclados con agua generalmente en una proporción 2:1 (2 de agua por 1 de material orgánico) y llenando el contenedor hasta el 75% de su capacidad, de tal forma que el espacio vacío sirva como reservorio de gas. Una vez se ha llenado el biodigestor, inicia un proceso de descomposición química y bacteriana, el cual se ve reflejado en la producción de burbujas, las cuales contienen el gas, este gas se va acumulando a medida que pasa el tiempo hasta llegar a un punto máximo de producción que depende de la cantidad de alimento bacteriano presente en la biomasa. Este proceso requiere de varias semanas o meses, dependiendo de las condiciones de operación que hayan presentes en el medio.

Al aumentar la temperatura se logra disminuir el tiempo de retención y por lo tanto se obtiene una producción de biogás en menor tiempo. La actividad biológica y por lo tanto la producción de gas aumenta con la temperatura. Al mismo tiempo se deberá tener en cuenta que al no generar calor el proceso la temperatura deberá ser lograda y mantenida mediante energía exterior. El cuidado en el mantenimiento también debe extremarse a medida que se aumenta la temperatura, dada la mayor sensibilidad que presentan las bacterias termofílicas a las pequeñas variaciones térmicas. Por tal razón los biodigestores que trabajan a altas temperaturas con fuentes de energía externas, requieren sistemas de control de temperatura. Los biodigestores artesanales no requieren este tipo de controles ya que ellos trabajan a la temperatura ambiente y por lo tanto las bacterias que predominan no son tan sensibles a la temperatura.

La optimización del proceso realizado en el biodigestor es importante para lograr una adecuada eficiencia en la generación del gas metano, por tal razón se realiza la instrumentación necesaria para estimar y controlar las magnitudes de la temperatura y estimar la del pH en el biodigestor. Se han seleccionado estas variables ya que la rapidez en la generación del biogás depende de la temperatura y el pH es un indicador del adecuado funcionamiento del proceso biológico, para garantizar la vida de las bacterias.

La Universidad Nacional del Nordeste en Argentina realizó una investigación enfocada en la obtención de un modelo matemático que describiera el proceso de la obtención de gas metano en biodigestores con diferentes tipos de excretas animales y residuos agrícolas y fue realizada en el Instituto de Tecnología e Ingeniería en Biosistemas-Alemania. Como resultado obtuvieron una expresión matemática exponencial del comportamiento del volumen de metano con respecto al tiempo la cual presenta un error no mayor al 10% en comparación con los resultados experimentales (Sogari, 2003).

Otra investigación realizada en la ciudad de Abasolo, Gto. en México presenta la implementación de un biodigestor para la generación de energía eléctrica a partir de lodos activados, producto del sistema de tratamiento de aguas residuales. En esta investigación se analiza el comportamiento de la producción de biogás a diferentes temperaturas y en ella comprueban que al aumentar las temperaturas a un rango entre 30 °C y 36 °C se puede disminuir el tiempo de retención de la biomasa hasta en 22 días aumentando así la eficiencia en la generación del biogás. También establecieron que el inicio de producción del gas está entre el tercero y quinto día de iniciarse el proceso en el biodigestor (Ramos, 2007).

En México también, la Universidad de Guanajuato, utilizó el estiércol de cabra y realizó el análisis de comportamiento de la producción de metano a una temperatura de 36 °C, en ella establece que la producción de biogás inicia desde el primer día de digestión anaerobia y que inicialmente se presentó un nivel de pH igual a 6,4 y después se mantuvo en un valor de 7 (Magaña, 2006).

1.4 Instrumentación (Bermúdez, 2010)

La instrumentación del biodigestor permite analizar la dinámica de su comportamiento con relación a la temperatura del proceso, con el propósito de observar la proporción de producción de gas dentro del biodigestor. El comportamiento de la producción de gas se puede observar debido a que el biodigestor utilizado es de flujo discontinuo y se tiene un objeto receptor expandible (cámara de llanta). Otro parámetro importante, que se requiere analizar es el nivel de pH de los desechos orgánicos durante todo su proceso de biodigestión. Estas mediciones se realizan manteniendo la temperatura constante.

Sensores: Para monitorizar las variables del proceso, se utilizan dos sensores: Sensor de temperatura de marca West modelo XMTG-808 y sensor de pH de marca HANNA instruments modelo H198103

Sensor de temperatura. La temperatura del proceso es la variable que impacta más en el biodigestor, ya que su valor incide en el tiempo de producción de biogás. Existen varios tipos de sensores de temperatura, por tal razón se debe realizar una correcta selección dependiendo de los requerimientos de la aplicación. Las características a tener en cuenta para realizar su selección son: la exactitud, la linealidad, el precio y la precisión.

Finalmente después de analizar las ventajas y desventajas de los diferentes tipos de sensores de temperatura, se selecciona el sensor adecuado que para el rango de temperatura resulta ser el termopar tipo J y un testigo del tipo físico de toma directa utilizando un termómetro bimetálico.

Sin embargo, además de medir la temperatura, esta debe controlarse mediante un controlado de temperatura, en conjunto con un contactor y un reóstato para cada digestor. Se utilizan controladores digitales.

Sensor del nivel de pH. El nivel de pH del sustrato es otra variable importante en el proceso de biodigestión, ya que un comportamiento anormal en los valores de pH es una advertencia de que el proceso biológico presenta alguna alteración a nivel bacteriano. Se ha demostrado en la mayoría de investigaciones que el valor de esta variable es de alrededor de 7 lo que significa que el sustrato tiene una concentración neutra, que en su fase inicial (ácida) puede tener niveles de pH de 6 o menores y a medida que se aumenta la producción de gas metano va elevando el nivel de pH hasta un nivel en el rango de 7 y 8. Si el nivel de pH se mantiene dentro de estos valores, indica que el biodigestor está funcionando adecuadamente; en caso contrario, si el pH se torna ácido, la acción de las bacterias metanogénicas se inhibe y aumenta la proporción de gas carbónico en el biogás.

1.5 Mecanismo bacteriano (Mussati, 1999)

La degradación anaeróbica del material orgánico se lleva a cabo por una población mixta de microorganismos. En el proceso de degradación de la glucosa están involucrados cuatro grupos de bacterias, a saber: bacterias formadoras de ácidos o *acidogénicas*, de crecimiento muy rápido (tiempo de duplicación mínimo de 30

minutos) que utilizan la glucosa para producir una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico. La reacción preferida por estas bacterias es la que conduce a ácido acético.

Las otras reacciones son las respuestas de las bacterias a la acumulación de hidrógeno durante las perturbaciones de carga al sistema.

Las bacterias *acetogénicas* convierten ácido propiónico y butírico en ácido acético. Tienen crecimiento relativamente lento (tiempo de duplicación mínimo de 1.5 a 4 días) (Lawrence, 1969). Las reacciones que producen se interrumpen fácilmente por acumulación de gas hidrógeno disuelto en el medio (Heyes, 1981).

Dentro de las bacterias metanogénicas, las denominadas *acetoclásticas* convierten ácido acético en dióxido de carbono y metano. Se desarrollan muy lentamente (tiempo de duplicación mínimo de 2-3 días) e influyen apreciablemente en el pH del sistema por eliminación de ácido acético y formación de dióxido de carbono. Son responsables de la mayoría del metano producido.

Las bacterias *metanogénicas que utilizan hidrógeno* son el "basurero" del hidrógeno. Se desarrollan rápidamente (tiempo de duplicación mínimo de 6 horas).

Controlan el potencial redox del proceso. Las trazas de hidrógeno que quedan en el medio regulan la velocidad total de producción de ácidos por las bacterias acidogénicas, y la composición de la mezcla formada. El hidrógeno también controla la velocidad a la cual los ácidos propiónico y butírico son convertidos a ácido acético; en definitiva, regulan la formación de ácidos volátiles.

Existen sitios de regulación en los que intervienen las formas reducida y oxidada de la molécula transportadora nicotinamida-adeninucleótido (NAD), la relación entre ambas formas determinará la velocidad de toma del "intermediario" en cada sitio de regulación. El hidrógeno juega un papel importante en tal regulación.

Cabe acotar que el esquema no deja de ser un modelo que pretende representar aproximadamente los mecanismos reales de la degradación anaeróbica.

1.6 Bacterias que intervienen en el proceso de biodigestión

1.6.1 Bacterias aerobias

Coliformes

El grupo coliforme constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra, es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, su capacidad de sobrevivencia y multiplicación fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; encontrándose que mientras mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente.

Para su estudio, se dividen en dos grupos, a saber:

El grupo de bacterias coliformes totales, el cual comprende a todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*.

El grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h de incubación a $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli*. La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales.

Escherichia coli es un bacilo corto Gram negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas se clasifican con base en las características que presentan sus factores de virulencia únicos, cada grupo provoca enfermedad mediante un mecanismo diferente. Se sabe que sus propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos

grosso y delgado son codificadas por genes situados en plásmidos. De manera similar las toxinas son mediadas por plásmidos o fagos.

Este grupo de bacterias se encuentra constituido por las siguientes cepas: *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), *E. coli enteroinvasiva* (EIEC), *E. coli enteroagregativa* (EAEC) y *E. coli enteroadherente* difusa (DAEC). Existen otras cepas que no han sido perfectamente caracterizadas; de las cepas anteriores, las 4 primeras están implicadas en intoxicaciones causadas por el consumo de agua y alimentos contaminados.

Coliformes totales según la CCAYAC-M-004. Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable. 2006 (CCAYAC-M-004, 2006)

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número Más Probable, se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h, utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante.

La determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h.

Finalmente, la búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales (Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas.

Salmonella Spp. (Caffer, 2008)

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5 μm , anaerobios facultativos, no esporulados, no fermentadores de lactosa, son móviles por medio de flagelos peritricos, con la excepción de *Salmonella Pullorum* y *Salmonella Gallinarum*, fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *Salmonella Typhi*). También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, Dmanosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita. Son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativo y producen H_2S , en la figura 1.3 se muestra la morfología microscópica de *Salmonella spp.*

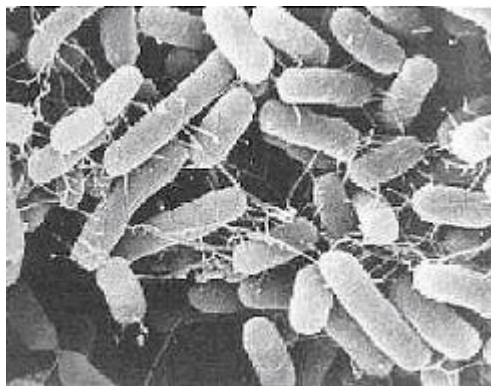


Figura 1.3 Morfología microscópica de *Salmonella spp.*

El género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Sin embargo, todavía siguen vigentes las ideas desarrolladas por P.R. Edwards y H.W. Ewing, en la década del 40 en el siglo pasado, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Estudios del DNA mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella entérica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella entérica* subespecie *entérica*, *Salmonella entérica* subespecie *salamae*, *Salmonella entérica* subespecie *arizonae*, *Salmonella entérica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella entérica* subespecie *houtenae* y *Salmonella entérica* subespecie *indica*.

A su vez las subespecies de *Salmonella entérica* y la especie *Salmonella bongori* se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos “O” y flagelares “H”.

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie entérica (subespecie I) y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez.

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales.

Los miembros del género se pueden clasificar en tres grupos:

- a) Los que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.
- b) Los que infectan sólo al hombre: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella paratyphi C*
- c) Los que están adaptados a un huésped animal: *Salmonella abortusovis*, a los ovinos; *Salmonella abortusequi*, a los equinos y *Salmonella gallinarum*, a las aves.

Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60 - 80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos, restaurantes.

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y en niños de corta edad. Es una enfermedad fundamentalmente de origen alimentario, la fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados, incluido el agua. También puede ocurrir la transmisión de persona a persona.

A pesar de todos los controles que se han puesto en práctica, las infecciones por *Salmonella* debidas al consumo de alimentos contaminados continúa siendo un problema serio con millones de casos que ocurren anualmente en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas. En el 2003, se estimó que solamente en los Estados Unidos, el costo de las salmonelosis producidas por alimentos contaminados llegaba a la cifra de 3.000.000.000 dólares.

La vigilancia de *Salmonella spp* en todas las etapas de la cadena de procesamiento de los alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis transmitida por alimentos y en el desarrollo e implementación de estrategias eficientes de control de la misma.

Salmonella según la NORMA Oficial Mexicana. NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. 1995 (NOM-114-SSA1-1994)

La presente técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

- 1) Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.
- 2) Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.
- 3) Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
- 4) Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- 5) Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

Vibrio cholerae (Malbrán, 2010)

El cólera es una de las enfermedades infecciosas que se conocen de más larga data, existiendo reportes de esta patología desde 1817 (RR., 1996). El agente etiológico del cólera es *Vibrio cholerae*. Este bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y móvil, fue descrito por primera vez en 1854 por Pacini en Italia y en 1883 por

Robert Koch, en la figura 1.4 se muestra la morfología microscópica de *Vibrio cholerae*. El cólera se ha manifestado como una enfermedad epidémica desde la antigüedad y las manifestaciones clínicas de la infección varían desde una infección asintomática hasta una diarrea severa. La patología en su forma más severa se caracteriza por una profusa diarrea acuosa (deposiciones como “agua de arroz”), vómitos y deshidratación con gran pérdida de sales y agua; si no es adecuadamente tratada podría desencadenarse un shock hipovolémico, acidosis metabólica, falla renal y la muerte. Estas manifestaciones clínicas fueron atribuidas a la presencia de la toxina de cólera (CT) en *Vibrio cholerae*, que fue demostrada en 1959 por científicos de la India. En 1987 se identificó un factor de virulencia adicional, implicado en la adherencia de *Vibrio cholerae* a células intestinales que se denominó “toxin coregulated pilus” (TCP) (Taylor R.K., 1987).

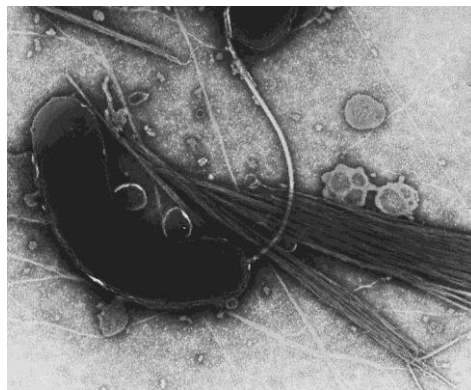


Figura 1.4 Morfología microscópica de *Vibrio cholerae*

En base a diferencias en el antígeno somático “O”, *Vibrio cholerae* ha sido clasificado en numerosos serogrupos, siendo reconocidos al menos 200 hasta el año 1997. De estos serogrupos, sólo el O1 y, más recientemente, el O139 han causado epidemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a serogrupos O1 y O139, han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde diarrea leve hasta deshidratación severa semejante a cólera. Por otra parte, *Vibrio cholerae* O1 puede causar infecciones tales como: apendicitis aguda, colecistitis aguda, otitis media, celulitis, neumonía, meningoencefalitis y septicemia. Estas lesiones indicarían que estas cepas podrían tener propiedades invasivas en adición a su enterotoxicidad.

– Ecología de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, tanto en ríos, como en estuarios y en ambientes marinos. Tanto en áreas endémicas como epidémicas, los brotes de cólera siguen un patrón estacional, apareciendo de forma explosiva en varios focos simultáneamente, indicando un posible rol de

factores ambientales en la aparición de las epidemias. El medio acuático ha sido reconocido como reservorio y vehículo para la transmisión de *Vibrio cholerae* en numerosos estudios.

Durante el curso de un brote, es posible aislar *Vibrio cholerae* O1 de pacientes y de muestras ambientales. Así, se ha determinado la presencia del microorganismo en aguas superficiales, de río, estanque y pozo. Sin embargo, en los períodos inter-epidémicos no es posible recuperar *Vibrio cholerae* O1 empleando los métodos de cultivo tradicionales. Rita Colwell y col han demostrado la existencia de la forma “durmiente” viable pero no cultivable (VNC) a la cual “entra” *Vibrio cholerae* en respuesta a condiciones desfavorables de nutrientes y ambientales: baja concentración de nutrientes, temperatura, pH o salinidad distintos a los óptimos. Se postula que las formas VNC explicarían la manera en que *Vibrio cholerae* se mantiene en el ambiente durante los períodos inter-epidémicos. La asociación con el fito y zooplancton, en particular con copépodos, a través de la actividad quitinasa de *Vibrio cholerae*, facilitaría la sobrevivencia del microorganismo en el ambiente acuático, asegurando su persistencia por largo tiempo en condiciones adversas. El florecimiento de las distintas especies de plancton, relacionado a su vez con cambios climáticos, explicaría la estacionalidad de los brotes de cólera. En condiciones adecuadas, las formas VNC pueden revertir al estado cultivable, manifestando plenamente su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad.

Vibrio cholerae según Joy Wells, MS. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. 2003 (Wells, 2003)

Aunque las cepas de *Vibrio cholerae* crecen en varios medios de agar utilizados comúnmente, el aislamiento de muestras fecales se realiza con mayor facilidad si se utilizan medios especializados. El agua de peptona alcalina se recomienda como caldo de enriquecimiento y el agar tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS) es el medio de agar selectivo de elección.

El enriquecimiento en agua de peptona alcalina puede potenciar el aislamiento de *Vibrio cholerae* cuando solo hay unos pocos microorganismos, como en el caso de muestras de pacientes convalecientes o de portadores asintomáticos. Los aislamientos de *Vibrio spp.* crecen muy rápidamente en agua de peptona alcalina y en un plazo de 6 a 8 horas se presentarán en un número mayor que sobrepasará a los microorganismos de otros géneros.

El agar TCBS es un medio altamente diferencial y selectivo, que se encuentra disponible comercialmente, es fácil de preparar y no requiere llevarlo a la autoclave.

1.6.2 Bacterias anaerobias

Bacterias reductoras de sulfatos (*Gariboglio, 1993*)

Constituyen un grupo taxonómicamente muy diversificado aunque con estrechas relaciones fisiológicas y ecológicas.

Las primeras descripciones fueron hechas por el microbiólogo holandés N.M. Beijerinck en 1895; los primeros estudios sobre cultivos de estas bacterias fueron realizados por A.Van Delden en 1903 quien las denominó *Spirillum desulfuricans*, llamadas después *Desulfovibrio*.

En 1930, E.K.Baars publica un estudio más detallado sobre diferentes cultivos de bacterias reductoras de sulfatos, más recientemente, en la década del 40 del siglo pasado, comienzan los fecundos trabajos de J.R.Postgate en la Universidad de Sussex, Inglaterra.

A mediados de los años 70 también del siglo pasado nuevos géneros y especies de bacterias reductoras de sulfatos son descritos por F.Widdel y N.P.Pfennig en la Universidad de Konstanz, en Alemania, describiendo el uso de nuevas fuentes de carbono, con posibilidad de ser utilizadas por estas bacterias.

También hay que recordar los primeros trabajos en este rubro de R.L.Starkey de la Universidad de Rutgers en USA, además, los realizados por D.D.Mara y D.J.Williams de la Universidad de Dundee en Escocia, referidos a los diferentes medios de cultivo usados para aislamiento y enumeración.

Por otro lado, muchos microorganismos, especialmente bacterias, están involucrados en los fenómenos de corrosión asistida biológicamente, las bacterias reductoras de sulfatos aparecen como las principales responsables y pueden encontrarse presentes por lo menos en el 50% de los casos descritos en la bibliografía.

Debido a la amplia distribución que tienen las bacterias reductoras de sulfatos en los ambientes acuáticos y terrestres, es fácil deducir que actúan sobre una gran variedad de ambientes naturales y otros creados por el hombre. Así, a modo de estrecha síntesis, se puede citar su participación en el deterioro de metales empleados en equipos y estructuras en la industria petrolera, en sistemas de aguas de enfriamiento, en sistemas de captación y distribución de aguas subterráneas, en cañerías de concreto utilizadas para evacuación de líquidos cloacales, en cañerías enterradas usadas para transportar petróleo, gas o agua, en fábricas de papel, etc.

Las pérdidas económicas globales debidas a su actividad son importantes y cobran real dimensión cuando se evalúan sus efectos con respecto a la interferencia en procesos de transferencia de calor, consumo de combustible y fallas en equipos y cañerías por corrosión.

- Características morfológicas y fisiológicas

Observadas al microscopio, las bacterias reductoras de sulfatos presentan distintas formas: curvadas (en forma de medialuna) o sigmoideas, bastones rectos, ovals (forma de "limón"), esféricas, filamentosas, etc.

Su tamaño celular oscila en 0,5-2 micrones de diámetro y su longitud de 1 a 5 micrones; en géneros como *Desulfonema* se alcanzan dimensiones celulares mayores, en la figura 1.5 se muestra la morfología microscópica de *Desulfovibrio vulgaris*.

Muchas bacterias reductoras de sulfatos son actualmente móviles debido a que poseen flagelos. No obstante, existen cepas inmóviles y otras que muestran un movimiento deslizante. Respecto a la coloración de Gram, la mayoría son Gram negativas, excepto algunas especies de *Desulfonema* y cultivos muy jóvenes de *Desulfotomaculum* que a veces presentan una porción de células Gram positivas.

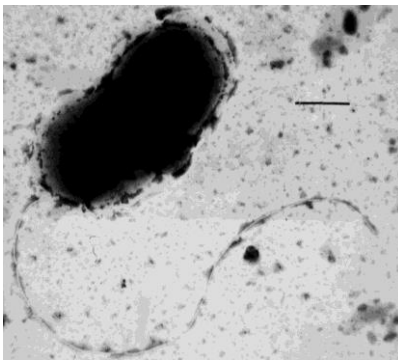


Figura 1.5 Morfología microscópica de *Desulfovibrio vulgaris*

Varios tipos de bacterias reductoras de sulfatos tienden a crecer agrupadas o en agregados celulares que se adhieren a superficies. Su distribución en la naturaleza puede ser en cualquier lugar donde se encuentre materia orgánica descomponible, disponibilidad de sulfatos y ausencia de oxígeno.

Los hábitat típicos son los sedimentos acuáticos en los cuales, las partículas orgánicas sedimentan y se acumulan; la existencia de bacterias reductoras de sulfatos ha sido descubierta en ambientes de aguas dulces y en aguas de elevada salinidad. No obstante, la presencia de organismos en ambientes naturales de alta salinidad, no implica un crecimiento óptimo bajo estas condiciones; de acuerdo a Zo Bell (1950) aún no se han encontrado bacterias reductoras de sulfatos con crecimiento óptimo a salinidades del 15-30%.

Sólo *Desulfovibrio salexigenes* y *Desulfovibrio desulfuricans* var. *aestuarii* son absolutamente dependientes de la presencia de cloruro de sodio en el medio de cultivo.

Las especies de agua dulce pueden ser inhibidas con más de 20-30g/L de NaCl. En contraste muchas especies marinas son moderadamente halofílicas y no desarrollan en aguas dulces porque requieren entre 10-30g/L NaCl.

Las bacterias reductoras de sulfatos halotolerantes pueden crecer tanto en aguas dulces como en aguas de mar; en términos generales se puede decir que la actividad de las bacterias reductoras de sulfatos declina abruptamente si la concentración de NaCl excede los 50-100 g/L.

Una característica común a las bacterias reductoras de sulfatos es que son anaerobias obligadas, pero a pesar del efecto inhibitorio del oxígeno estas bacterias están a veces activas en sedimentos acuáticos aerobios pues pueden prosperar en micronichos anaeróbicos existentes en estos sedimentos.

La formación y existencia de estos micronichos pueden explicarse porque los procesos respiratorios de la microflora aerobia consumen la totalidad del oxígeno disponible y porque el H₂S producido por las bacterias reductoras de sulfatos es un agente reductor que reacciona con el oxígeno a temperatura normal. De esta manera, una vez establecidas, las colonias de bacterias reductoras de sulfatos pueden protegerse del oxígeno por sí mismas; no obstante, en un ambiente homogéneamente aireado las bacterias reductoras de sulfatos se tornan inactivas pero pueden sobrevivir en aguas que contengan 5 mg/L de oxígeno disuelto, muchas horas y

aún días, aunque no multiplicarse. Cuando encuentran nuevamente condiciones anaeróbicas, estas células recuperan su actividad.

Las bacterias reductoras de sulfatos del género *Desulfotomaculum* forman esporas semejantes a las especies de *Clostridium*, también anaeróbicos. Estas esporas son resistentes no sólo al oxígeno, sino también al calor (80°C) y a la desecación, por lo que pueden encontrarse aún en suelos secos.

Cuando se restablecen las condiciones favorables para su crecimiento y multiplicación estas esporas derivan en las formas vegetativas de las que provienen.

Con respecto al pH, las bacterias reductoras de sulfatos prefieren valores cercanos a la neutralidad; en el laboratorio puede observarse que son activas en un rango de pH de 5,5 a 8,5. En ambientes con pH fuera de estos valores, las bacterias reductoras de sulfatos probablemente ocupen micronichos en los cuales las condiciones se acercan a la neutralidad.

Otra característica común de este grupo es reducir los sulfatos a sulfuro de hidrógeno como producto metabólico final.

Estos productos metabólicos constituyen sistemas buffers ($\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}$ y $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$) que pueden proteger las células de valores de pH extremos.

La mayoría de las bacterias reductoras de sulfatos son mesófilas, por lo que la temperatura óptima es de 20 a 40°C pero algunas han sido descritas como termófilas, tales como *Desulfotomaculum nigrificans* que puede crecer a temperaturas de 65 a 70°C y *Desulfovibrio termophilus* que puede hacerlo de 80 a 85°C.

- Características nutricionales

La descomposición de la materia orgánica en la naturaleza se realiza a través de la cadena alimentaria por medio de organismos aerobios como animales, hongos y bacterias.

Bioquímicamente la respiración es el transporte del poder reductor de nutrientes orgánicos que van a ser oxidados al oxígeno que va a ser reducido.

Estas oxidaciones biológicas liberan la energía que ha sido almacenada en la materia orgánica mediante la acción fotosintética de los vegetales y las algas azul-verdosas.

La energía liberada de los nutrientes es utilizada por los organismos para mantenimiento de sus estructuras y para síntesis de sus propios materiales celulares que le permiten multiplicarse; de esta manera cada sustrato orgánico utilizado por un organismo respiratorio es parcialmente descompuesto para obtener de esta forma energía y convertirlo en nuevo material celular por el otro.

Estas reacciones de los organismos vivientes que son funcionalmente distintas, son reconocidas como catabolismo o desasimilación (metabolismo energético) y anabolismo o asimilación (síntesis celular). La biomasa inicialmente sintetizada por los organismos fotosintéticos es degradada más y más conforme a su paso por las distintas etapas de la cadena alimentaria y las oxidaciones biológicas a las que va siendo sujeta.

El resultado final es la mineralización de la materia orgánica (una reoxidación) que conduce a la formación de CO_2 , H_2O y otros minerales; estos productos finales son nuevamente usados por los organismos fotosintéticos para producir y sintetizar nueva materia orgánica, iniciándose así el ciclo de la materia en la naturaleza.

Esta reoxidación total de la materia orgánica sólo es posible en presencia de oxígeno; en ausencia de éste la descomposición biológica puede llevarse a cabo por bacterias fermentativas que son designadas generalmente como bacterias anaerobias. La mayoría de las bacterias fermentativas son anaeróbicas estrictas y se inactivan en presencia de oxígeno.

Debido a que el oxígeno no es utilizado por las bacterias fermentativas como aceptor final de electrones (oxidante), la materia orgánica usada por estas bacterias anaeróbicas es convertida, en parte, a CO_2 ; otra porción es necesariamente transformada en productos reducidos como ácidos grasos, H_2 y alcoholes. En muchos ambientes naturales anaeróbicos, los productos de fermentación más habituales que se pueden encontrar junto al CO_2 son H_2 , acetato, propionato y butirato.

Si bajo estas condiciones anaeróbicas, los sulfatos están presentes, estos productos finales de los procesos fermentativos son usados por las bacterias reductoras de sulfatos; éstas utilizan como aceptor de electrones al sulfato (en vez del oxígeno) razón por la cual el compuesto reducido aparte de la degradación de la sustancia orgánica, es el H_2S .

Al igual que la mayoría de las bacterias fermentativas las bacterias reductoras de sulfatos son anaerobias obligadas y se inactivan con O_2 , pero están más restringidas en sus posibilidades de utilizar compuestos orgánicos. Por ejemplo, las bacterias fermentativas pueden usar polímeros como la celulosa o directamente proteínas; en cambio las bacterias reductoras de sulfatos sólo utilizan como sustratos orgánicos, compuestos de bajo peso molecular como son los productos de fermentación señalados anteriormente.

Por lo tanto, en la naturaleza, las bacterias reductoras de sulfatos dependen de las bacterias que rompen y degradan fermentativamente las moléculas orgánicas complejas (celulosa, almidón, proteínas, etc.) para transformarlas en compuestos de bajo peso molecular, que sí son utilizados por las bacterias reductoras de sulfatos.

Nutricionalmente, las bacterias reductoras de sulfatos pueden dividirse en dos grupos principales:

- Las que llevan a cabo una oxidación incompleta de los sustratos orgánicos con formación de acetato como producto final.
- Las que oxidan completamente los sustratos orgánicos, incluyendo el acetato, con O_2 como producto final.

La mayoría de las del primer grupo en condiciones óptimas pueden prosperar duplicando su población en tiempos de generación cercano a las tres horas. Las mejor estudiadas son las pertenecientes al género *Desulfovibrio* que pueden aislarse con relativa facilidad de la mayoría de los ambientes acuáticos; la mayoría de ellas utilizan como sustrato al lactato al que oxida a acetato y CO_2 . Muchas especies de *Desulfovibrio* pueden utilizar también el H_2 como aceptor de electrones y con sulfato como fuente de energía.

Algunas especies de *Desulfobulbus* oxidan propionato a acetato; la mayoría del género *Desulfotomaculum*, formadoras de esporas, son nutricionalmente semejantes a las especies más comunes de *Desulfovibrio*.

El otro grupo, las bacterias reductoras de sulfatos que oxidan completamente los sustratos orgánicos, crecen más lentamente, con tiempos de generación de alrededor de 15 horas. Para algunas especies de *Desulfobacter*, por ejemplo, el sustrato preferido es el acetato, otros como *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* son

nutricionalmente más versátiles y pueden oxidar propionato, ácidos grasos superiores, ácidos dicarboxílicos, lactatos, alcoholes, etc.

En la naturaleza, las bacterias reductoras de sulfatos que oxidan completamente los sustratos orgánicos, sobre todo las especies de *Desulfobacter*, pueden cooperar con las bacterias reductoras de sulfatos que oxidan incompletamente usando el acetato producido por estas últimas.

Establecer el sustrato adecuado tiene una significativa aplicación práctica ya que la mayoría de los medios de cultivo empleados actualmente para recuperar las bacterias reductoras de sulfatos de los diferentes ambientes en donde viven, están basados en lactato como fuente de carbono y esto puede conducir a resultados negativos erróneos.

Sulfato Reductoras

Este método se basa en el cultivo de bacterias sulfato reductoras presentes en muestras, en un medio de cultivo anaerobio utilizando lactato de sodio como fuente de carbono, utilizando como indicador positivo de la sulfato reducción la formación de un precipitado negro de sulfuro de fierro resultado de la reacción de sulfuro de hidrógeno producido por la reducción biológica de sulfatos, con el sulfato ferroso de amonio $6\text{H}_2\text{O}$ presente en el medio de cultivo.

La Familia *Spirillaceae* comprende numerosos géneros, de entre los cuales algunas especies presentan la posibilidad de reducir los sulfatos mediante la producción de ácido sulfhídrico o bien, de reducir el gas carbónico por formación de metano.

De esta familia se considerará el género *Desulfovibrio*, que tiene el poder de reducir los sulfatos y que desempeña un papel principal de la corrosión biológica.

CAPÍTULO VIII

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo II Materiales y métodos

2.1 Instalación e instrumentación del equipo

Durante el desarrollo del experimento se emplearon 8 biorreactores de mezcla completa, de forma cilíndrica con bridas ciegas en la parte superior e inferior, como el que se muestra en la figura 2.1, los cilindros son de acrílico transparente de 14.5 cm de diámetro y 49 cm de alto, cuyo volumen total es de 8.09 litros y un volumen de proceso de 7.76 litros. En su parte interior para agitación, se encuentra una flecha con 3 a 4 paletas (impelentes) de acero inoxidable, movidas por un motor de corriente alterna a 127 Volts de 6 rpm que se encuentra anclado en la brida ciega superior.



Figura 2.1 Biorreactor de mezcla completa

Por la brida ciega superior, además de la flecha del agitador, se introducen los sensores – medidores de pH y la válvula de salida del gas que se obtiene.

En la brida ciega inferior se encuentra colocado el soporte para el agitador e introducida una válvula para drenado de los lodos.

En el cuerpo cilíndrico se encuentran introducidos 2 sensores de temperatura (termopares) tipo “J” uno en la parte superior y otro en la parte inferior, un termómetro analógico para visualizar la temperatura en campo, una resistencia de 1 Watt que sirve como calefactor para obtener la temperatura de proceso, y una válvula para toma de muestra del efluente.

Para el control de los procesos, se utilizó una caja de control como la que se muestra en la figura 2.2, en la que se encuentran instalados 16 interruptores del tipo cola de rata que permiten controlar el flujo eléctrico 8 hacia los motores de agitación y 8 hacia los calefactores de cada uno de los biorreactores, 8 controladores de temperatura 5 de los cuales son analógicos, 1 analógico – digital y 1 digital.

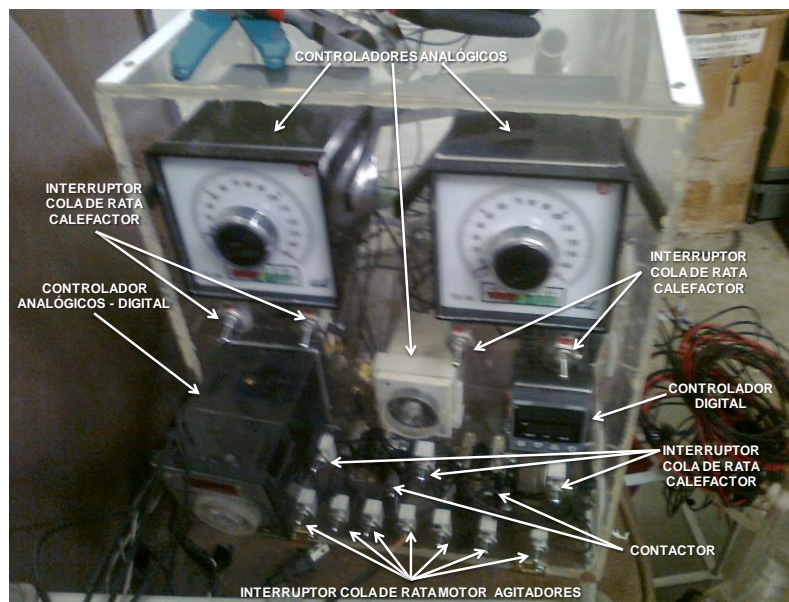


Figura 2.2 Caja de control de los biorreactores de mezcla completa

Para el envío del flujo eléctrico hacia los calefactores, cada controlador tiene integrado un contactor que le permite controlar más de un calefactor.

Para el control del fluido eléctrico hacia los calefactores de cada uno de los biorreactores, se tiene una caja que se muestra en la figura 2.3, con 8 reóstatos que controlan la intensidad del fluido eléctrico de cada calefactor, para evitar variaciones bruscas de temperatura que dañen el proceso.



Figura 2.3 Reóstatos para control de flujo eléctrico

Para la instrumentación de los biodigestores se utilizó la siguiente metodología:

- Con el diagrama descrito en las cajas de los sensores electrónicos se realizó el cableado de los 8 sensores a sus respectivos contactores, reóstatos, resistencias y termopares
- Se realizó el cableado de los 8 agitadores conectados directamente cada uno a un apagador de cola de ratón
- Se realizaron las pruebas de cada uno de los sensores para encontrar posibles fallas
- Una vez comprobado que todos los sensores funcionan correctamente se realizó la separación y acomodo de los cables identificados por resistencia y agitador
- Se procedió a instalar los biorreactores en el área donde se trabajará

2.2 Pruebas de funcionamiento

Las pruebas de funcionamiento de los biorreactores se llevaron a cabo mediante la siguiente metodología:

- Se identificaron fugas en los biorreactores
- Se sellaron áreas de toma de muestra, resistencia y termopar de los biorreactores con pegamento para multipropósitos y silicón
- Se construyeron empaques de neopreno para la tapa el fondo del biorreactor para evitar fugas
- Se realizó una prueba con agua en los biorreactores para evaluar futuros inconvenientes con fugas y se procedió a sellar áreas que tuvieron fugas
- Se realizó una prueba con agua en los biorreactores para evaluar el efecto de la temperatura de la resistencia sobre el termoposo
- Se realizó una prueba con agua en los biorreactores para evaluar el funcionamiento de los agitadores

2.3 Determinación de las proporciones de los desechos biológicos empleados

Para la determinación de las proporciones a emplear se utilizó el método simplex lattice, posteriormente se procedió con la siguiente metodología:

- Se realizó la recolección de los componentes con los que se trabajaron
- Se pesaron los ingredientes en las proporciones determinados previamente tal como se muestran en el cuadro 2.1
- Se licuaron los ingredientes para su posterior mezcla en las proporciones establecidas
- Se determinó el porcentaje de humedad de la muestra en la termobalanza
- Se mezclaron con agua con proporciones que garanticen una relación 90% de humedad
- Se introdujeron a los biorreactores para lograr la hidrólisis y la biotransformación deseable a biogás rico en metano

Componentes (Factores a controlar):

Se requiere analizar una mezcla de tres componentes, con diversas concentraciones. Los componentes son:

Restos de comida, estiércol de ganado vacuno estabulado y lodos de fosa séptica

La composición se considera en fracción peso, acorde con los contenidos de Sólidos Totales contenidos en el componente, o acorde a su % de humedad

Variables de respuesta:

Existen 3 diferentes fases del proceso que son las analizadas para conocer la eficiencia de la bioconversión de la materia, las cuales son:

El gas producido (biogás)

La parte líquida en el reactor – efluente – (agua amoniacal)

La parte sólida dentro del reactor (lodos)

Las mediciones consideradas son:

La cantidad de carbono convertido en biogás y sus proporciones de CH₄ y CO₂

La cantidad de nitrógeno en el efluente como amonio

La cantidad de nitrógeno en los lodos como amonio

La reducción de DQO dentro del sistema metanogénico.

El número de ensayos a desarrollar se muestran en la tabla 2.1, donde X1= Restos de comida X2= Estiércol de ganado vacuno X3= Lodos de fosa séptica

Cuadro 2.1 Proporciones de desechos orgánicos obtenidos por el modelo de simplex lattice para 35°C

No. ensayo – N	X1	X2	X3	y
1	1	0	0	y1
2	0	1	0	y2
3	0	0	1	y3
4	0.33	0.66	0	y122
5	0.66	0.33	0	y112
6	0.66	0	0.33	y113
7	0.33	0	0.66	y133
8	0	0.33	0.66	y233
9	0	0.66	0.66	y223
10*	1/3	1/3	1/3	y123

A partir de lo obtenido por el modelo de simplex lattice se determinó la proporción de cada uno de los componentes para los 5 experimentos a realizar los cuales se muestran en el cuadro 2.2

Cuadro 2.2 Proporciones de contenido de desechos y agua en los biorreactores

Biorreactor 1			Biorreactor 2			Biorreactor 3		
Comida	Estiércol	Lodos	Comida	Estiércol	Lodos	Comida	Estiércol	Lodos
0 g	2702 g	1327 g	0 g	1332 g	2708 g	1335 g	1327 g	1329 g
Agua	4850 ml		Agua	4850 ml		Agua	4850 ml	
Biorreactor 4			Biorreactor 5					
Comida	Estiércol	Lodos	Comida	Estiércol	Lodos			
2708 g	0 g	1326 g	1330 g	2703 g	0 g			
Agua	4850 ml		Agua	4850 ml		Agua	4850 ml	

2.4 Condiciones de operación

Los experimentos se llevaron a cabo mediante procesos por lote de muestras integradas, por cantidades variadas de residuos domiciliarios orgánicos (restos de cocina y alguna poda de plantas), lodos digeridos de la fosa séptica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana, Campus Coatzacoalcos y estiércol vacuno con una dieta pre – establecida (ganado estabulado/pastoreo) de un rancho ubicado en las afueras de la ciudad detrás del aeropuerto establecidos en el cuadro 2.1.

Las condiciones de proceso de las muestras se pueden observar en el cuadro 2.3; que son 27 - 30 °C (baja temperatura) y 37- 40 °C (alta temperatura). Cada muestra se procesó con periodos de 35 días para baja temperatura y 28 días para alta temperatura. Se desarrollaron 5 experimentos 3 bajo condiciones de baja temperatura (biorreactores 2,3 y 4) y 2 bajo condiciones de alta temperatura (biorreactores 1 y 5).

Cuadro 2.3 Tiempos de residencia y temperaturas de operación (Sogari, 2003)

Temperatura de operación °C	Tiempo de residencia hidráulica esperados en los reactores (Días)
27-30	30 – 45
37-40	25 – 35

La temperatura ambiente del laboratorio donde se encuentra el biodigestor es aproximadamente 26 °C y la temperatura a la cual debe mantenerse el sustrato en el biodigestor está en un rango de 27 °C a 40 °C, para obtener una mayor eficiencia de las bacterias mesofílicas, por tal razón es necesario implementar un control de temperatura del proceso.

Para realizar este control, se utiliza un sistema conformado por una resistencia, un contactor para energizar el sistema de calefacción, un termopar conectado a una caja de control con una sensibilidad cuya señal de alarma se configuró de tal forma que cuando la temperatura del proceso esté 0.5 °C por debajo del punto de consigna, se active el contactor que a su vez energiza la resistencia; una vez la temperatura del proceso se encuentre en el valor del punto de consigna, nuevamente se desactiva la alarma y por tanto se des-energiza la resistencia.

Para lograr esta temperatura se debe realizar un incremento lento de la misma, para evitar cambios bruscos en el sustrato que pueden afectar a las bacterias y de esta forma no alterar su comportamiento biológico que como se mencionó anteriormente, afecta la producción de biogás.

Durante el tratamiento de las muestras, se realizó un seguimiento estricto de la temperatura de operación y el pH que mide el equipo para ese efecto, con la finalidad de evitar que se dañe el experimento.

Las consideraciones que se establecen para el proceso son las siguientes:

A. Intervalo de temperatura

TB (Baja temperatura) = 27 - 30°C

TA (Alta temperatura) = 37 - 40°C

B. Relación 90% de humedad

Una vez determinadas las condiciones de operación se procedió a realizar los experimentos utilizando la siguiente metodología:

- Se realizó la determinación de DQO cada 7 días para cada uno de los biorreactores (NMX-AA-030-SCFI, 2001)
- Se realizó la determinación de nitrógeno amoniacal cada 7 días para cada biorreactor. (NMX-AA-026-SCFI-2010)
- Se realizó la medición de biogás generado a lo largo de todo el proceso. (Leon, 2012)
- Se realizó el análisis microbiológico para determinar la presencia de los microorganismos *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Desulfovibrio* y Coliformes totales, como se muestra en la figura 2.4 (NOM-114-SSA1-1994) (Malbrán, 2010) (Gariboglio, 1993) (CCAYAC-M-004, 2006)
- Se realizaron pruebas confirmativas por medios bioquímicos para *Vibrio Cholerae*. (Malbrán, 2010)
- Se realizó un seguimiento analítico diario del pH para garantizar que no se acidifique el reactor (Leon, 2012)
- Se mantuvieron los reactores perfectamente agitados para evitar problemas de difusión y reacción química
- Se mantuvieron los reactores a las temperaturas de estudio, usando una resistencia eléctrica de inmersión, tal como se muestra en la figura 2.1, donde se señala como calefactor
- Dado que las bacterias metanogénicas son extraordinariamente sensibles al valor de pH, éste se controló con un sistema manual midiendo diariamente el pH y adicionando H₂SO₄ 0.1N o KOH 0.1N como sea necesario para mantenerlo a 7±0.5

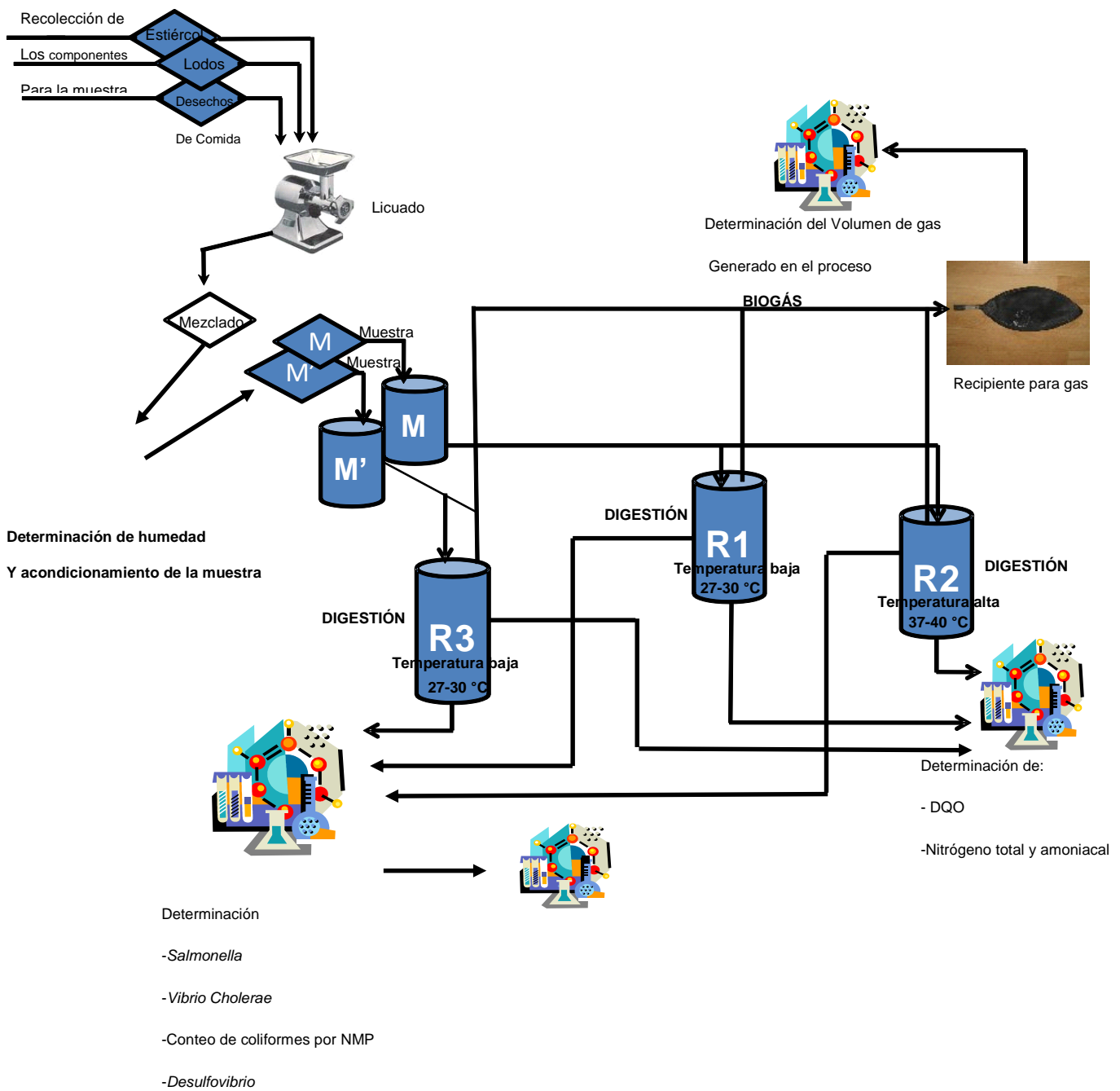


Figura 2.4 Diagrama general de los procedimientos realizados

2.5 Determinación de bacterias

De acuerdo a (NOM-110-SSA1, 1994) la siguiente metodología para la determinación de las bacterias fue la usada en este proyecto, se tomaron 30 mililitros de muestra para realizar todas las determinaciones microbiológicas por duplicado al inicio de proceso, a los 15 días y a los 30 días de empezado el proceso.

2.5.1 Coliformes

A partir de lo descrito en la norma (CCAYAC-M-004, 2006), llevo a cabo la determinación de Coliformes por la técnica del Número Más Probable al inicio del proceso, a los 15 días y a los 30 días en cada uno de los biorreactores siendo realizada por duplicado para cada muestra.

Todos los biorreactores tenían una concentración de 2kg de desechos de comida, siendo las variables los lodos de la fosa séptica y el estiércol de ganado; para el primer biorreactor se usó una proporción de 0.8kg de estiércol de ganado y 1.2 kg de lodos de la fosa séptica, para el segundo biorreactor se usó una proporción de 1.2 kg de estiércol de ganado y 0.8 kg de lodos de la fosa séptica y para el tercer biorreactor se utilizó una proporción de 1 kg de estiércol de ganado y 1kg de lodos de la fosa sépticas.

Metodología:

- Se realizaron 3 tomas de muestra para cada biorreactor y se transfirieron a volúmenes de acuerdo a lo establecido en el cuadro 2.4 (CCAYAC-M-004, 2006) usando un mililitro de muestra en cada tubo para la primera toma de muestra y 10 mililitros para la segunda y tercera toma de muestra, para los tres tubos de la primera dilución.

Cuadro 2.4 Preparación de inóculo con caldo lauril sulfato de sodio

Inóculo (ml)	Cantidad de medio por tubo (ml)	Volumen de medio más inóculo (ml)	Caldo Lauril Triptosa requerido g/l
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2

- Se tomó un mililitro de cada tubo de la primera dilución y se transfirió a tubos con las cantidades de volumen de caldo lauril sulfato de sodio expuestas en el cuadro 2.5 para la segunda dilución.
- Se tomó un mililitro de cada tubo de la segunda dilución y se transfirió a tubos con las cantidades de volumen de caldo lauril sulfato de sodio expuestas en el cuadro 2.5 para la tercera dilución.
- Se incubaron los tubos a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- Se examinaron los tubos a las 24 h y se observó la formación de gas en los tubos.
- Para la prueba confirmativa se transfirió 1 mililitro de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva a tubos que contiene caldo de bilis verde brillante con campana de Durham usando las mismas proporciones de caldo-inoculo del cuadro 2.1
- Se homogeneizaron y se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

Los tubos que presentan turbidez en el medio y producción de gas después del periodo de incubación fueron registrados como positivos.

2.5.2 *Salmonella*

Para la determinación de *Salmonella spp.* se realizaron las técnicas de aislamiento (NOM-114-SSA1-1994) las pruebas fueron realizadas por duplicado.

Todos los biorreactores tenían una concentración de 2 kg de desechos de comida, siendo las variables los lodos de la fosa séptica y el estiércol de ganado; para el primer biorreactor se usó una proporción de 0.8 kg de estiércol de ganado y 1.2 kg de lodos de la fosa séptica, para el segundo biorreactor se usó una proporción de 1.2 kg de estiércol de ganado y 0.8 kg de lodos de la fosa séptica y para el tercer biorreactor se utilizó una proporción de 1 kg de estiércol de ganado y 1 kg de lodos de la fosa sépticas.

- Se realizó la toma de muestra al inicio del proceso en cada uno de los biorreactores
- Se realizó el preenriquecimiento en caldo lactosado con una mezcla de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/caldo.
- Se incubaron los matraces por 24 h a 35°C .
- Se realizó el enriquecimiento selectivo, tomando un mililitro del caldo de preenriquecimiento pasadas las 24 horas y se transfirió al medio Vassiliadis-Rappaport manteniendo una proporción de 1:10.

- Se incubó durante 24 h a 35 °C.
- Se realizó el aislamiento en agar *Salmonella-Shigella* a partir de las muestras en el medio Vassiliadis-Rappaport.
- Se incubó durante 24 h a 36 °C.

2.5.3 *Vibrio cholerae*

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Wells (2003), al inicio del proceso, a los 15 días y a los 30 días del proceso, cada determinación se realizó por duplicado.

Todos los biorreactores tenían una concentración de 2 kg de desechos de comida, siendo las variables los lodos de la fosa séptica y el estiércol de ganado; para el primer biorreactor se usó una proporción de 0.8 kg de estiércol de ganado y 1.2 kg de lodos de la fosa séptica, para el segundo biorreactor se usó una proporción de 1.2 kg de estiércol de ganado y 0.8 kg de lodos de la fosa séptica y para el tercer biorreactor se utilizó una proporción de 1 kg de estiércol de ganado y 1 kg de lodos de la fosa sépticas.

- Se realizaron 3 tomas de muestra en cada uno de los biorreactores.
- Se realizó el preenriquecimiento agua peptonada alcalina con una mezcla de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/caldo.
- Se incubó durante 7 h a 36 °C.
- Se realizó el aislamiento en agar TCBS a partir de las muestras en agua peptonada alcalina.
- Se incubó durante 24 h a 36 °C.
- Se realizaron las pruebas de confirmación bioquímicas en *medio* MIO y *medio* SIM a partir de las colonias crecidas en el agar TCBS que presentaban una morfología típica de *Vibrio cholerae*.
- Se incubaron durante 24 h a 36 °C.
- Se interpretaron los resultados de las pruebas bioquímicas en ambos medios
- Se adicionó el reactivo de Kovac para la determinación de la prueba de indol.

2.5.4 *Desulfovibrio*

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Gariboglio (1993), al inicio del proceso, a los 15 días y a los 30 días del proceso, cada determinación se realizó por duplicado.

Todos los biorreactores tenían una concentración de 2 kg de desechos de comida, siendo las variables los lodos de la fosa séptica y el estiércol de ganado; para el primer biorreactor se usó una proporción de 0.8kg de estiércol de ganado y 1.2 kg de lodos de la fosa séptica, para el segundo biorreactor se usó una proporción de 1.2 kg de estiércol de ganado y 0.8 kg de lodos de la fosa séptica y para el tercer biorreactor se utilizó una proporción de 1 kg de estiércol de ganado y 1kg de lodos de la fosa sépticas.

- Se realizaron 3 tomas de muestra para cada biorreactor.
- Se realizó la identificación de bacterias sulfato reductoras, entre los que se encuentra el género *Desulfovibrio* en un medio con lactato de sodio como fuente de carbono, utilizando como indicador positivo de la sulfato reducción la formación de un precipitado negro de sulfuro de fierro.
- Se prepararon 4 tubos de ensayo con 9 ml de medio de cultivo.
- Se transfirió 1 ml de muestra líquida a 3 tubos con medio y se conservó un tubo como testigo control.
- Se incubó a 41°C por 48 h en anaerobiosis.

Se analizaron los tubos para buscar la presencia o Ausencia de *Desulfovibrio*, los tubos que presentaron precipitado negro de sulfuro de hierro fueron tomados como positivos.

2.5.5 Bacterias anaerobias y aerobias

- Se realizaron tres tomas de muestras semanales para realizar la siembra en el medio de tioglicolato para determinar la presencia de bacterias anaerobias y aerobias en el proceso
- Se transfirió un mililitro de la muestra a tubos con 10 ml de medio de tioglicolato.
- Se incubó a 36°C por 48 h.

- Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura de los tubos para determinar la presencia de las bacterias aerobias y anaerobias.

2.6 Determinación de DQO

Para el análisis de la DQO las muestras fueron homogeneizadas y digeridas en presencia de dicromato a 150°C durante 2 h en un digestor Hanna C9800, empleando la siguiente metodología.

- Se realizó la curva de calibración
- Una vez realizada la curva de calibración se procedió a analizar la muestra
- Se añadieron 2.5 ml de muestra, 1.5 ml de solución de digestión y 3.5 ml de reactivo de ácido sulfúrico en tubos de digestión y se homogeneizaron.
- Se colocaron los tubos en el digestor y fueron sometidos a reflujo cerrado (a 150 °C) durante 2 h.
- Se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

2.7 Determinación de nitrógeno

- Se tomaron muestras de 25 ml para cada biorreactor, fueron diluidas con agua hasta 500 ml, preparando un blanco con 500 ml de agua.
- Se añadió 25 ml de la disolución amortiguadora de boratos, transfiriendo la disolución a un matraz Kjeldahl y se añadieron unas cuentas de vidrio.
- Una vez que se recolectaron 300 ml de destilado se finalizó la destilación.
- Se tituló la solución con ácido sulfúrico 0,01 N.

CAPÍTULO IX

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Capítulo IX Resultados y discusiones

3.1 Instrumentación y control

Se realizó el armado de 8 biorreactores así como su instrumentación, en la figura 3.1 se muestra el biorreactor con cada una de sus partes y en la figura 3.2 se muestra el diagrama eléctrico obtenido para la instrumentación de los biorreactores.



Figura 3.1 Partes de cada uno de los biorreactores construidos

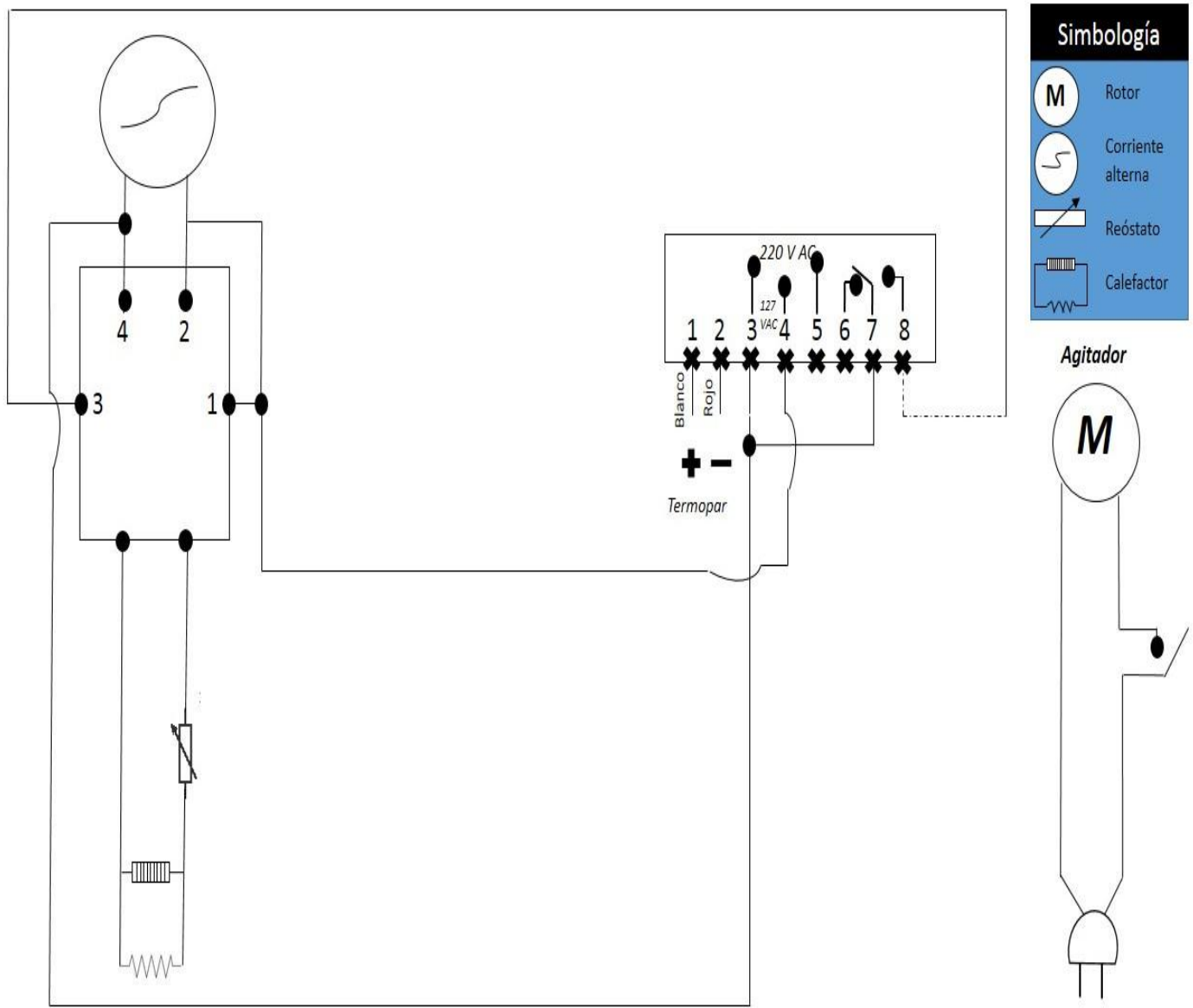


Figura 3.2 Diagrama eléctrico usado para la conexión de los sensores

Los ocho biorreactores fueron correctamente armados e instrumentados, los sensores utilizados para medir la temperatura y el pH fueron los adecuados para el proceso, puesto que la temperatura se mantuvo estable a lo largo de los experimentos por la alta sensibilidad y rápida reacción de los sensores de temperatura usados y la alta sensibilidad del sensor de pH ayudó a que la variación de pH no fue mayor de ± 0.5 gracias a la adición de H_2SO_4 0.1 N o KOH 0.1 N conforme fue requerido.

3.2 Coliformes

Se realizaron tres muestreos de cada biorreactor con las relaciones de contenido de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3, para cada biorreactor los experimentos se realizaron por duplicado, usando el cuadro 3.1 basada en la Norma oficial mexicana NOM-112-SSA-1994. Para 3 tubos por dilución se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.3.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y una vez obtenidos los resultados tomando como base el cuadro 3.1 se realizó un promedio de los resultados de cada experimento para obtener el comportamiento del grupo bacteriano a lo largo del proceso que son expuestos en la figura 3.3.

Cuadro 3.1 Numero más probable para la identificación de coliformes totales

Número de tubos positivos			NMP por 100 ml
0	0	0	0.3
0	0	1	0.3
0	1	0	0.3
1	0	0	0.4
1	0	1	0.7
1	1	0	1.1
1	1	1	1.1
1	2	0	0.9
2	0	0	1.4
2	0	1	1.5
2	1	0	2
2	1	1	2.1
2	2	0	2.8
2	2	1	3.9
3	0	0	6.4
3	0	1	4.3
3	0	2	7.5
3	1	0	4.3
3	1	1	7.5
3	1	2	12
3	2	0	9.3
3	2	1	15
3	2	2	21
3	3	0	24
3	3	1	45
3	3	2	110
3	3	3	>110

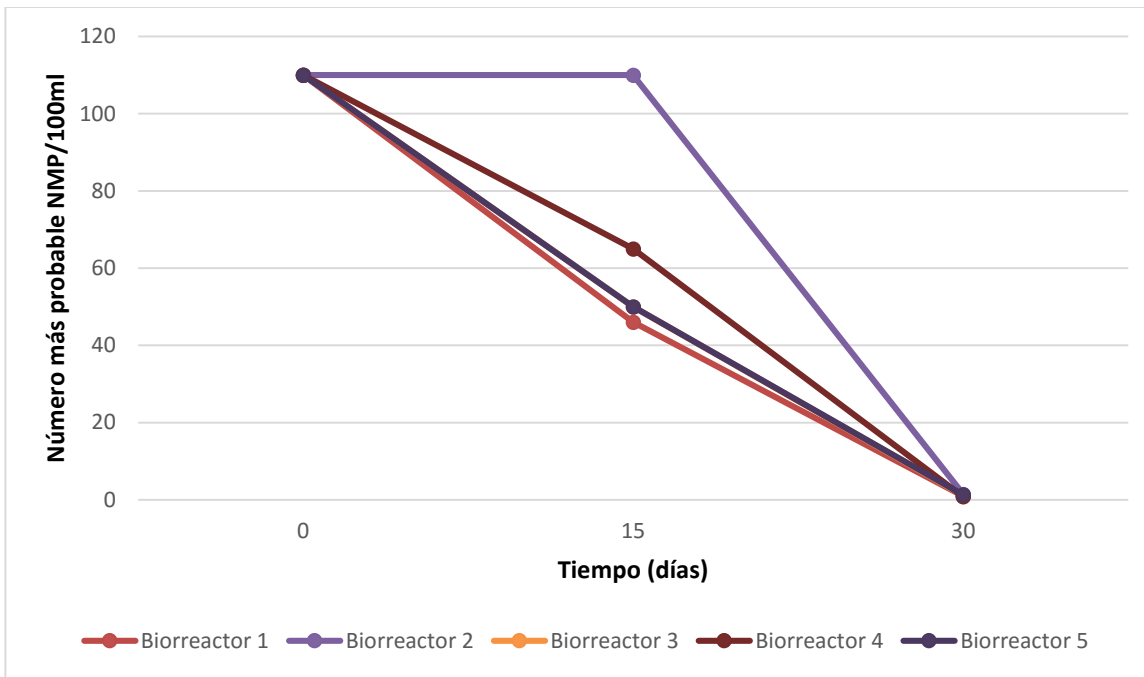


Figura 3.3 Concentración de coliformes totales durante la fermentación

Como se puede observar en la figura 3.3 el biorreactor dos es el que muestra mayor presencia del grupo coliformes por un mayor tiempo a lo largo del proceso, es evidente que al tener una mayor concentración de lodos de las fosas sépticas que los cuatro biorreactores restantes favorecen el crecimiento de este grupo microbiano. De igual manera las condiciones de operación del biorreactor beneficiaron el crecimiento de este grupo microbiano ya que la temperatura y el pH usado fueron los más cercanos a los ideales por este grupo microbiano.

A pesar de que el proceso se llevó a cabo en condiciones anaerobias se esperaba presencia de este grupo a lo largo del proceso ya que es un grupo bacteriano muy común en los desechos orgánicos usados, de igual manera el decaimiento de la presencia del grupo se esperaba a lo largo del proceso conforme las condiciones anaerobias avanzan.

3.3 *Salmonella*

Se realizaron los procedimientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994 para cada uno de los biorreactores que contienen las relaciones de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3 al inicio del

proceso y no se obtuvo crecimiento de *Salmonella spp* en ninguno de los biorreactores como se muestra en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2 Presencia de *Salmonella spp*.

Biorreactor 1			Biorreactor 2			Biorreactor 3		
Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra	Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra	Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra
Negativo	-----	-----	Negativo	-----	-----	Negativo	-----	-----
Biorreactor 4				Biorreactor 5				
Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra	Primera muestra	Segunda muestra	Tercera muestra			
Negativo	-----	-----	Negativo	-----	-----			

En el cuadro 3.3 se observa la ausencia de *Salmonella spp*. en los cinco biorreactores, se esperaba presencia de este género a lo largo del proceso ya que es un género muy común en los desechos de restos de comida usados, su presencia pudo ser inhibida debido a la competencia de los diversos microorganismos para obtención de nutrientes para su proliferación.

3.4 *Vibrio cholerae*

Se tomaron tres muestras de cada uno de los 5 biorreactores que contienen las relaciones de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3 realizándose los experimentos por duplicado y usando las técnicas expuestas en el Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo, se realizó un conteo de las colonias que mostraban la siguiente morfología: colonias amarillas, brillantes de borde traslúcido y con halo amarillo; los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.4.

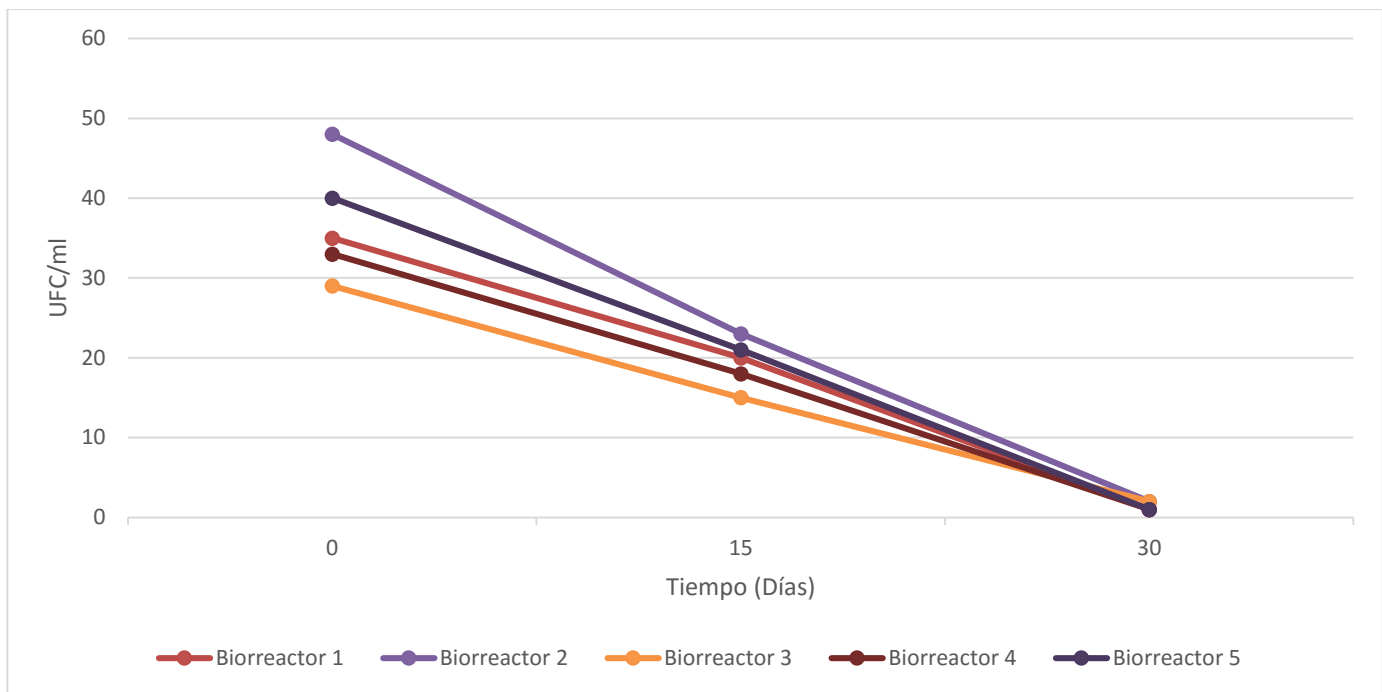


Figura 3.4 Colonias de *Vibrio cholerae* presentes durante la fermentación

Se realizó la confirmación con pruebas bioquímicas obteniendo los resultados expuestos en el cuadro 3.4.

Cuadro 3.4 Pruebas bioquímicas para *Vibrio cholerae*

Prueba	Biorreactor 1	Biorreactor 2	Biorreactor 3	Biorreactor 4	Biorreactor 5
Indol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ortina descarboxilasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Motilidad	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Producción de sulfuro de hidrógeno	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Como se puede observar en la figura 3.4 el biorreactor dos es el que muestra mayor presencia de *Vibrio cholerae* a lo largo del proceso, es evidente que las condiciones de operación del biorreactor beneficiaron el crecimiento de este grupo bacteriano ya que la temperatura y el pH usado fueron los más cercanos a los ideales por este grupo bacteriano y por lo tanto a pesar de tener un menor contenido de lodos de las fosas sépticas se notó una mayor presencia de esta bacteria.

A pesar de que el proceso se llevó a cabo en condiciones anaerobias se esperaba presencia de *Vibrio cholerae* a lo largo del proceso ya que es muy común en los lodos de las fosas sépticas, de igual manera el decaimiento de la presencia del grupo se esperaba a lo largo del proceso conforme las condiciones anaerobias avanzan.

Como se observa en el cuadro 3.5 las pruebas bioquímicas de confirmación de *Vibrio cholerae* fueron los esperados de acuerdo a lo expuesto en el anexo 2, es evidente que se confirma la presencia de *Vibrio cholerae* en el proceso.

3.5 *Desulfovibrio*

Se tomaron tres muestras de cada uno de los 3 biorreactores que contienen las relaciones de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3 y se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro 3.5.

Cuadro 3.5 Presencia de *Desulfovibrio*

Muestra		Biorreactor 1	Biorreactor 2	Biorreactor 3	Biorreactor 4	Biorreactor 5
Primera	Turbidez en el medio	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Precipitado negro de sulfuro de hierro	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Segunda	Turbidez en el medio	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Precipitado negro de sulfuro de hierro	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Tercera	Turbidez en el medio	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Precipitado negro de sulfuro de hierro	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Como se puede observar en el cuadro 3.5, hay presencia de *Desulfovibrio* en los tres biorreactores desde el inicio del proceso, es evidente que *Desulfovibrio* se encuentra presente en los componentes utilizados para el proceso y que las condiciones de operación de los biorreactores fueron las adecuadas para su crecimiento.

Al ser un proceso que se realiza en condiciones anaerobias y ya que los sustratos usados contenían compuestos de azufre, eran los indicados para su crecimiento; por lo tanto, su presencia era esperada, así como una mayor presencia conforme el proceso avanzaba.

3.6 Bacterias anaerobias y aerobias

Se realizaron 12 tomas de muestra a lo largo del proceso para cada uno de los 3 biorreactores que contienen las relaciones de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3 y se obtuvieron los siguientes resultados para cada una de las tomas de muestras mostrados en el cuadro 3.6.

Cuadro 3.6 Prueba del tioglicolato

Muestra	Biorreactor 1		Biorreactor 2		Biorreactor 3		Biorreactor 4		Biorreactor 5	
	Bacterias anaerobias	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Bacterias aerobias
Primera	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++
Segunda	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++
Tercera	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++
Cuarta	+++	+++++	+++	+++++	+++	+++++	+++	+++++	+++	+++++
Quinta	+++	+++++	+++	+++++	+++	+++++	+++	+++++	+++	+++++
Sexta	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Séptima	++++	++	++++	++	++++	++	++++	++	++++	++
Octava	++++	++	++++	++	++++	++	++++	++	++++	++
Novena	+++++	++	+++++	++	+++++	++	+++++	++	+++++	++
Decima	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+
Onceava	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+
Doceava	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+	+++++	+

En el cuadro 3.6 se muestran los resultados obtenidos como mayor o menor concentración expresados en un mayor o menor número de cruces representando cada cruz un 20% hasta llegar a 5 cruces para el 100% que indica la mayor concentración obtenida.

Como se puede observar en el cuadro 3.6 en cada una de las condiciones de operación de los biorreactores el crecimiento de las bacterias anaerobias tiene un comportamiento parecido, así mismo el decaimiento de la concentración de bacterias aerobias en el proceso presenta un comportamiento similar para cada uno de los tres

biorreactores, es evidente que las condiciones de operación no afectan en gran medida a la flora bacteriana en general a pesar de mantener diferentes proporciones de desechos orgánicos y condiciones de operación, por ello, puesto que el proceso se realizó bajo condiciones anaerobias se esperaba un comportamiento de este tipo conforme el proceso avanzaba.

3.7 Demanda química del oxígeno

Se realizaron cinco muestreos de cada biorreactor con las relaciones de contenido de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3, para cada biorreactor los experimentos se realizaron por duplicado, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.5.

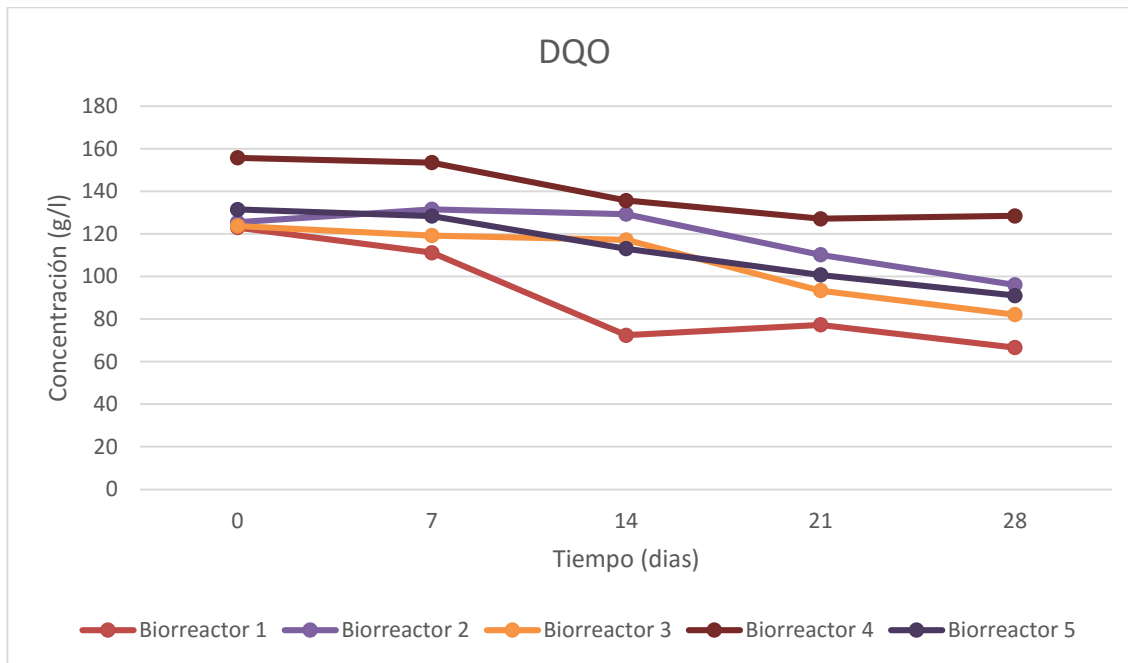


Figura 3.5 Concentración de DQO en los biorreactores

Para conocer la disminución de DQO en cada biorreactor se utilizó la siguiente ecuación:

$$DQO_i - DQO_f = \text{Disminucion DQO}$$

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 3.7.

Cuadro 3.7 Disminución de DQO en los 5 biorreactores

Biorreactor 1	56.39 g/l
Biorreactor 2	29.42 g/l
Biorreactor 3	41.66 g/l
Biorreactor 4	27.32 g/l
Biorreactor 5	40.44 g/l

En el biorreactor 1 se observó una mayor disminución de DQO, debido al proceso de biotransformación de nutrientes a lo largo del proceso la concentración de compuestos disponibles para su oxidación disminuye en consiguiente se observa una disminución de la DQO; la disminución de la DQO es deseable en procesos anaerobios puesto que nos indica que el sustrato está siendo consumido por los microorganismos.

3.8 Nitrógeno amoniacal

Se realizaron cinco muestreos de cada biorreactor con las relaciones de contenido de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3, para cada biorreactor los experimentos se realizaron por duplicado, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.6.

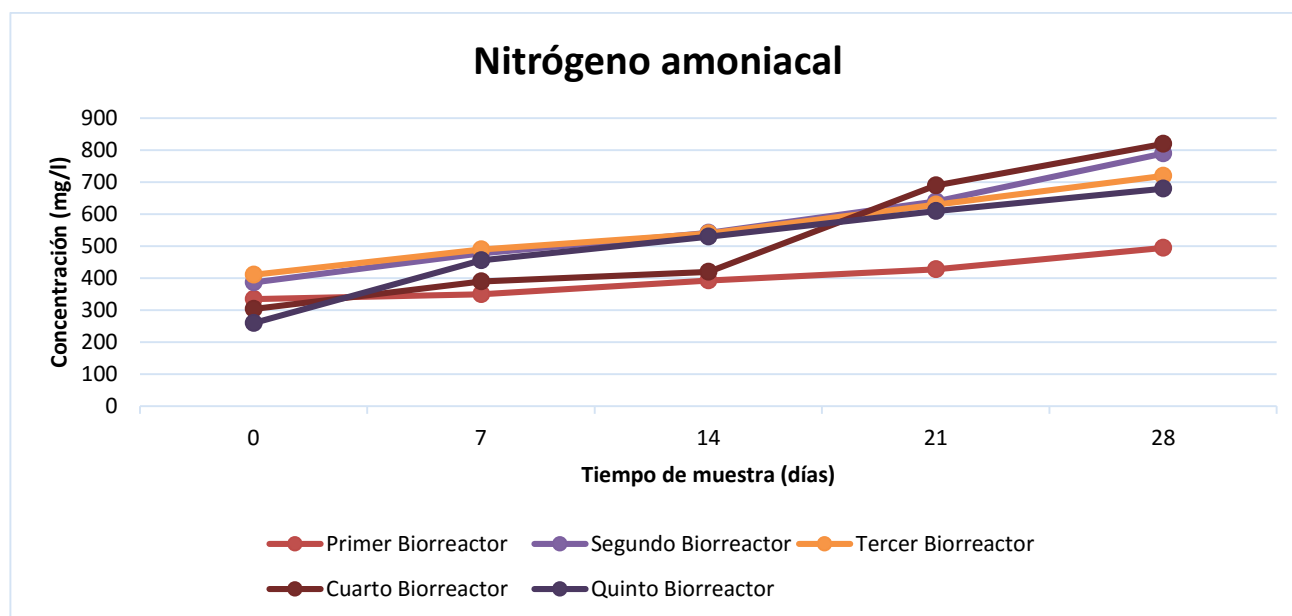


Figura 3.6 Concentración de N-NH3 en los biorreactores

Para conocer la producción de nitrógeno amoniacal en cada biorreactor se utilizó la siguiente ecuación:

$$[N-NH_3] f - [N-NH_3] i = [N-NH_3] \text{ producido}$$

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 3.8.

Cuadro 3.8 Producción de nitrógeno amoniacal en cada biorreactor

Biorreactor 1	160 mg/l
Biorreactor 2	403 mg/l
Biorreactor 3	309 mg/l
Biorreactor 4	516 mg/l
Biorreactor 5	420 mg/l

El biorreactor 4 fue en el cual se observó una mayor producción de nitrógeno amoniacal, a lo largo del proceso anaeróbico gran parte de la materia orgánica es transformada en metano, en consecuencia el contenido de materia orgánica disminuye ya que gran parte de esta ha sido mineralizada por lo que el contenido de nitrógeno amoniacal aumenta conforme el proceso avanza, esto nos sirve como un indicador de que parte de los compuestos que pueden inhibir el metabolismo de los microorganismos necesarios para el proceso han sido hidrolizados.

3.9 Producción de biogás

Como el nombre lo indica, el biogás se produce en un proceso biológico; el proceso bioquímico para la obtención de biogás se divide en cuatro etapas. La hidrólisis es la primera etapa, en la cual los compuestos complejos del sustrato. Las bacterias hidrolíticas que participan en esta etapa liberan enzimas que descomponen el material por medios bioquímicos. La acidogénesis es la segunda etapa, en la cual los productos formados en la hidrólisis son convertidos en compuestos más simples por medio de bacterias fermentadoras, que forman ácidos grasos más bajos junto con dióxido de carbono e hidrógeno. Además, también se forma pequeñas cantidades de ácido láctico y de alcoholes. La acetogénesis es la tercera etapa, en la cual estos ácidos grasos se convierten por medio de bacterias acetogénicas en precursores de biogás (ácido acético, hidrógeno y dióxido

de carbono). La metanogénesis es la etapa final, en la cual el ácido acético, el hidrógeno y el dióxido de carbono se convierten en metano por medio de organismos metanogénicos estrictamente anaerobios.

Se realizó la medición de producción de biogás de cada biorreactor a lo largo de todo el proceso con las relaciones de contenido de desechos orgánicos establecidos en el cuadro 2.3 se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.7 y el cuadro 3.9.

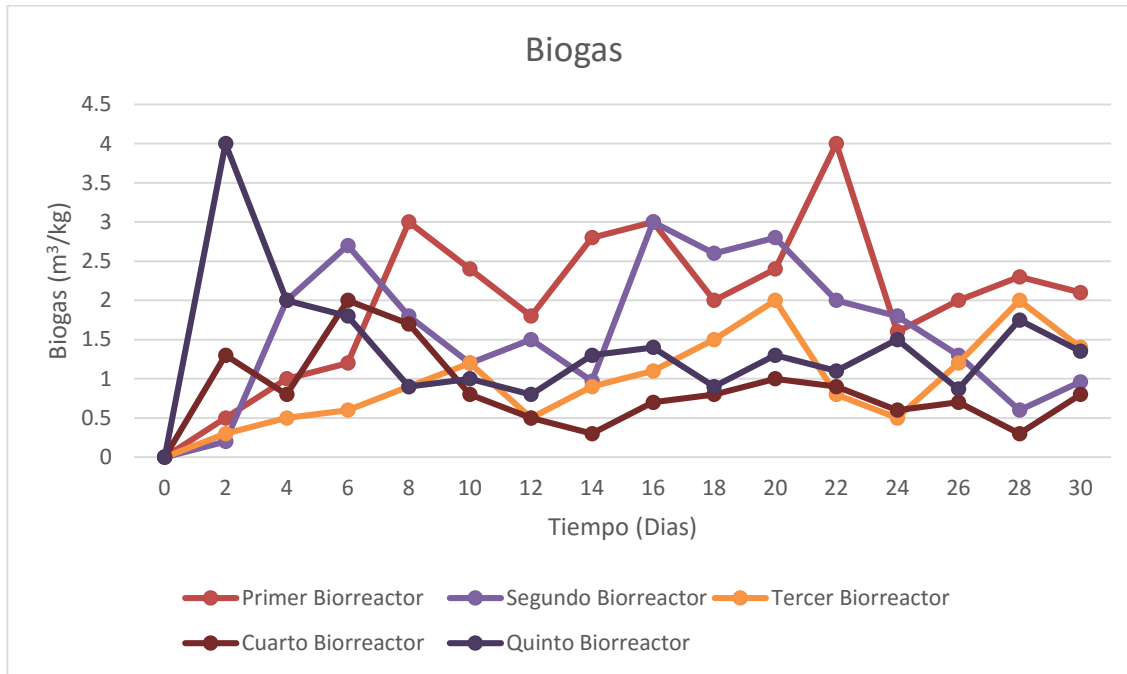


Figura 3.7 Producción de biogás en cada biorreactor

Con la finalidad de comparar la producción total de biogás se cuantificó la producción en cada fermentador a lo largo de los 30 días de operación.

Como se puede observar en el cuadro 3.9 la producción total de biogás en cada uno de los biodigestores es diferente, pero es evidente que los biodigestores uno, tres y cinco son los que presentaron una mejor producción de biogás a lo largo de todo el proceso, por lo tanto el biodigestor con concentraciones balanceadas de lodos de las fosas sépticas y estiércol de ganado es el más indicado para la obtención de biogás.

Cuadro 3.9 Biogás acumulado a lo largo de todo el proceso para cada biorreactor

Biorreactor 1	Biorreactor 2	Biorreactor 3	Biorreactor 4	Biorreactor 5
21,97 m ³ /kg	13,2 m ³ /kg	32,1 m ³ /kg	15,4 m ³ /kg	25,43 m ³ /kg

El biorreactor 3 fue el que obtuvo una mejor producción total de biogás, en dicho biorreactor se trabajó bajo condiciones mesofílicas y con porcentajes de proporciones de desechos orgánicos de 33% por cada variable utilizada; se observa que mantener porcentajes semejantes para cada una de las variables utilizadas para el sustrato mejora el rendimiento puesto que existe un mayor cantidad de compuestos orgánicos utilizables para su biotransformación.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- La instrumentación y control de los biodigestores facilitaron el funcionamiento de los biodigestores para llevar a cabo el proceso de biodigestión.
- Las proporciones empleadas de desechos biológicos, así como las condiciones de temperatura son determinantes para un mejor proceso de biodigestión y una mayor producción de biogás.
- Bajo condiciones mesofílicas anaerobias, las bacterias sulfato reductoras fueron las únicas presentes en el proceso.
- Bajo condiciones termofílicas anaerobias las bacterias sulfato reductoras fueron las únicas presentes en el proceso.
- Bajo proporciones semejantes de sustrato las condiciones termofílicas tuvieron un mayor rendimiento de producción de biogás.
- Las proporciones establecidas en para el biorreactor 3 fueron las que tuvieron un mejor rendimiento de producción total de biogás.
- El biorreactor 1 presento la mejor disminución de DQO.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

Bibliografía

- Ahring, B. S. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiological and Biotechnology* 43, 559 - 565.
- Ahring, B. W. (1988). Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2393 - 2397.
- Angelidaki, I. A. (1993). Anaerobic thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 560 -564.
- Baraza, J. (2003). Contribución al estudio del tratamiento integrado de residuos municipales en un vertedero. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Barredo, M. E. (1991). Effect of propionate toxicity of methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatei* at different pH values. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1764 - 1769.
- Bermúdez, C. D. (2010). Instrumentación de un biodigestor de estiércol animal para analizar su comportamiento dinámico. Universidad Industrial de Santander.
- Braun, R. H. (1981). Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biothechnology Letters* 3, 159 - 164.
- Caffer, I. T. (2008). *Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de Salmonella spp.*
- Calli, B. M. (2005). Effect of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. pp 1285-1292. 40.
- Campos, A. (2001). Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Universidad de Lleida.
- Catells, E. X. (2012). *Energía, Agua, Medioambiente, Territorialidad y Sostenibilidad*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- CCAYAC-M-004. (2006). Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable.
- Coombs, J. (1990). The present and future of anaerobic digestion. pp 93-138. 31.
- Cuetos, M. 2. (2007). Digestión y co-digestión anaerobia de residuos de matadero avícola: control del proceso y evaluación del grado de estabilización. León, Guanajuato: Universidad de León.
- Faddin, J. F. (1993). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. pp 61-64. Medica Panamericana S.A. de C.V.
- Faddin, J. F. (1993). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. pp 104-105. Medica Panamericana S.A. de C.V.

- Faddin, J. F. (1993). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. pp 112-115. Medica Panamericana, S.A. de C.V.
- Faddin, J. F. (1993). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. pp 138. Medica Panamericana, S.A. de C.V.
- Fernández-Polanco, F. G. (2000). Procesos biológicos anaerobios. Jornadas sobre tratamientos biológicos de residuos orgánicos. Valladolid.
- Gariboglio, M. y. (1993). *Corrosion e incrustacion microbiológica en sistemas de captación y conducción de agua*. Capítulo 3.
- Hansen, K. (1999). Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *33*, 1085-1810. *Water Reasearch*.
- Hansen, K. A. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research* *32*, 5 - 12.
- Hashimoto, A. (1986). Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes* *17*, 241 - 261.
- Heyes, R. a. (1981). *Biotechnology Letters*. 431 - 436.
- Hill, D. C. (1987). Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digestion failure. *Transaction of the ASAE* *30*, 496 - 501.
- Industria Turismo y Comercio, M. d. (2010). *Plan de Acción Nacional de Energías Renovables*. Madrid.
- INECC. (2000). <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/109/cap8.html>.
- Jiménez, S. C. (1990). Influence of lignin on the methanization of lignocellulosic wastes. pp 43-45. *21*.
- Lawrence, A. L. (1969). *Water Polution Control Federation* . R1 - R7.
- Leon, Á. L. (2012). ESTUDIO DE LA CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA DE RESIDUOS GANADEROS CON OTROS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIALES.
- Magaña, L. e. (2006). Producción de biogás a nivel laboratorio utilizando estiércol de cabra. *16*(002 pp 27 -37).
- Malbrán, C. (2010). *Manual de Procedimientos: Aislamiento, identificación, caracterización y pruebas de sensibilidad a antimicrobianos de Vibrio cholerae*.
- Massé, D. D. (2000). Comprehesive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing bathc reactor. *Water Research* *34*, 3087 - 3106.
- Mata-Álvarez, J. (2002). Chapter 1: Fundamentals of the anaerobic digestion process. In *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*. IWA.
- McCarty, P. Y. (1981). Microbial Energy Conversion. In Göttingen, *Heat treatment for increasing yields from organic materials*. (pp. 179 - 199). H.G. Schleger and J. Barnene.
- Moreno, M. T. (2011). <http://www.fao.org/docrep/019/as400s/as400s.pdf>.

- Mussati, M. (1999). Modelado del proceso de digestión anaeróbica en reactores simples. In J. S. Nicolás, *Modelado, Simulación y Optimización de Procesos Químicos* (pp. 697 - 739).
- NMX-AA-026-SCFI-2010. (n.d.). ANÁLISIS DE AGUA - MEDICIÓN DE NITRÓGENO TOTAL .
- NMX-AA-030-SCFI. (2001). ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA.
- NOM-110-SSA1, N. O. (1994). BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.
- NOM-114-SSA1-1994. (n.d.). Norma Oficial Mexicana Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
- Ramos, J. A. (2007). Implementación de un biodigestor anaeróbico para la generación de energía eléctrica a partir de lodos activados. *11*(46 pp 25 - 31).
- Romero, L. d. (2002). Digestión anaeróbica termofílica de lodos de EDAR. pp 8-22. *90*.
- RR., C. (1996). Global Climate and infectious disease: The Cholera Paradigm. pp 2025-2031. *274*. Science.
- Salminen, E. E. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste. pp 13-26 . *83*.
- Sawayama, S. T. (2004). Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* *97*, 65 - 70.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. pp 262-280. *51*.
- SEMARNAT. (2008). http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen/08_residuos/cap8.html.
- Seoáñez Calvo, M. (2013). *Tratado de la Biomasa*. Madrid: McGraw - Hill/Interamericana de España, S.L.
- Siegrist, H. H. (2005). Anaerobic digestion of slaughterhouse waste with UF-membrane separation and recycling of permeate after free ammonia stripping. *Water Science Technology* *52*, 531 - 536.
- Sogari, N. (2003). *Cálculo de la producción de metano generado por distintos restos orgánicos*. Branschweig -Germany.
- Sosnowski, P. W. (2003). Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. pp 609-616. *7*.
- Taylor R.K., M. V. (1987). *Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor co-ordinately regulated with cholera toxin*.
- Tchobanoglous, G. B. (1995). Diseño de instalaciones para el tratamiento y vertido del fango. In *Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales* (pp. 865 - 880). Interamericana de España, S.A.
- Tong, X. S. (1990). Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, 239-255.
- Vavilin, V. R. (2001). Simplified hydrolysis models for the optimal desing of two-stage anaerobic digestion. *Water Research*, 4247-4251.

Volkheimer, W. (2003). Retrieved from <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Biodegrada.htm>.

Volkheimer, W. (n.d.). <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Biodegrada.htm>.

Voolapalli, R. S. (2001). Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads - influence of formate production and H₂ kinetics. *Water Research* 35, 1831 - 1841.

Wang, Z. B. (2003). Evaluation of a two stage anaerobic digester for the treatment of mixed abattoir wastes. pp 1267-1273. 38.

Wells, M. (2003). Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo.

Zinder, S. (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *ASM News*, 294 - 298.

A NEXOS

ANEXOS

Anexo 1 Pruebas Bioquímicas

Descarboxilasas (Faddin, *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. pp 61-64, 1993)

La prueba de las descarboxilasas (lisina-ornitina-arginina) sirve para medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico.

Las enzimas descarboxilasas son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado. En un laboratorio de bacteriología clínica, las tres descarboxilasas importantes utilizadas para la identificación bacteriana son la lisina, la ornitina y la arginina. Estas descarboxilasas son enzimas adaptativas o inducidas; son formadas por un organismo solamente cultivadas en un medio ácido en presencia de un sustrato específico, y los productos de la descarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad. La descarboxilación está limitada a aquellos aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo que no sea una amina (-NH₂) o un grupo carboxilo (-COOH), y la descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo, y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal. El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (una diamina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima específica Lisina-descarboxilasa.

El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina-descarboxilasa para dar la diamina putrescina y anhídrido carbónico.

Tanto la cadaverina como la putrescina son estables cuando son producidas en condiciones anaeróbicas. Se cultiva la bacteria estudiada en anaerobiosis recubriendo la superficie del medio con parafina o vaselina. Con el sellado de los tubos, todo el oxígeno no combinado es consumido por el organismo presente durante la fase de crecimiento inicial y durante la descarboxilación el pH del medio aumenta (hacia la alcalinidad) a medida que se produce anhídrido carbónico.

Como el pH puede ser controlado, es posible incorporar un indicador del pH, ya sea púrpura de bromocresol y/o rojo de cresol, en el medio que contiene el aminoácido.

El aminoácido L-arginina es catabolizado a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultánea o separadamente. Estos dos caminos son el sistema de la arginina-deshidrolasa y el sistema de la arginina-descarboxilasa. En el sistema de la descarboxilasa, la L-arginina sufre la descarboxilación para dar agmatina, una molécula más grande que la putrescina, que no puede ser considerada el producto final en el catabolismo de la arginina por las bacterias vivas. Una nueva descomposición de la agmatina se produce por una de dos vías. La acción catalítica de la enzima agmatinasa desdobra la agmatina en dos compuestos, putrescina y urea. Si se encuentra la enzima ureasa, la urea es también catabolizada para dar dos moléculas de amoníaco (NH_3) y anhídrido carbónico (CO_2). Móller halló que la putrescina no sufre una nueva descomposición de grado demostrable.

Este mismo autor comprobó también que todas las cepas de las *Enterobacteriaceae* producen la enzima agmatinasa y por lo tanto muestran un enérgico catabolismo de la agmatina, dando putrescina y urea, o putrescina y 2NH_3 Y CO_2 si también se encuentra presente la enzima ureasa.

La agmatina es catabolizada por la enzima agmatina-deshidrolasa en putrescina, CO_2 y NH_3 por medio de un compuesto intermediario, monocarbamil putrescina, que se encuentra en los organismos *Streptococcus faecalis*.

En el sistema deshidrolasa, la descomposición de la L-arginina, según lo han demostrado Knivett, Slade y Slamp y Oginsky y Gehring se produce en un proceso de dos etapas: primero una descomposición de la L-arginina en L-citrulina, seguido por un sistema de desdoblamiento de la citrulina. La reacción general produce la formación de L-ornitina, CO_2 y NH_3 del sustrato L-arginina.

El primer paso comprende la extracción hidrolítica del NH_2 de la arginina por acción de una arginina-deshidrolasa, arginina-desimidasa (o L-arginina iminohidrolasa) para dar citrulina, amoníaco y fosfato inorgánico. El segundo paso comprende un sistema de desdoblamiento de la citrulina por el cual ésta pasa por la descomposición fosforolítica en presencia del H_3PO_4 y una enzima citrulina ureidasa (u ornitina carbamiltransferasa) para dar ornitina y carbamilfosfato.

El carbamilo fosfato, por la acción catalítica de la carbamatoquinasa y el adenosindifosfato (ADP) da NH_3 , CO_2 y adenosintrifosfato (ATP). La descomposición de la L-arginina en L-citrulina proporciona la principal fuente de ATP para un organismo.

Si un organismo es capaz de descomponer la L-arginina en L-ornitina por el sistema deshidrolasa, por la acción catalítica de la ornitina-descarboxilasa, la L-ornitina es nuevamente degradada en putrescina y anhídrido carbónico. Sin embargo, para determinar la presencia de una ornitina-descarboxilasa debe llevarse a cabo una prueba separada, utilizando solamente el sustrato aminoácido L-ornitina.

Agar Hierro de Kligler (*Faddin, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. pp 112-115, 1993*)

La prueba con el agar hierro de Kligler sirve para determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico H_2S .

El agar hierro de Kligler (AHK) y el agar hierro triplemente azucarado (AHTA) son medios diferenciales en tubo que sirven a un doble fin:

- 1) Determinación de las fermentaciones de los hidratos de carbono.
- 2) Determinación de la producción de ácido sulfhídrico.

Un organismo puede utilizar diversos sustratos incorporados en el medio; los diferentes. Sustratos metabolizados son utilizados para la diferenciación entre varios grupos, géneros o especies, sobre todo entre las *Enterobacteriaceae*.

El medio AHK contiene dos hidratos de carbono: lactosa, con concentración del 1 %, y glucosa, en concentración del 0.1 %.

En el medio AHK, algunos organismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono; otros fermentan solamente la glucosa; y otros, aún, no son capaces de fermentar ni la lactosa ni la glucosa. La fermentación del hidrato de carbono puede producirse con producción o no de gases ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$).

La fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de flauta) y anaeróbicamente (en la capa inferior del cultivo). En el pico de flauta, el monosacárido glucosa es catabolizado inicialmente por medio del ciclo aeróbico de Embden-Meyerhof, utilizado tanto por los aerobios como por los anaerobios para dar el intermediario clave, ácido pirúvico. A su vez, este ácido es degradado por medio del ciclo de Krebs, por los aerobios o anaerobios facultativos, para dar CO_2 , H_2O y energía, ambos ciclos, el de Embden-Meyerhof y el de Krebs, comprenden etapas en serie que producen muchos intermediarios; en cada etapa intervienen enzimas específicas.

En la capa profunda del cultivo en AHK, existen condiciones anaeróbicas por las cuales es metabolizada la glucosa a través del ciclo de Embden-Meyerhof, en ATP y el intermediario clave, ácido pirúvico, que después es convertido en diversos productos finales estables; ácido láctico y/u otros ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes, CO_2 , H_2 y energía.

Las reacciones en AHK se utilizan primariamente para la identificación de miembros de las *Enterobacteriaceae* (entéricos) que son, por definición, bacilos Gram negativos catalasa positivos, todos los cuales fermentan el hidrato de carbono glucosa en ácido. Asimismo; existen muchos bacilos intestinales Gram negativos no entéricos a cuya identificación o separación de las *Enterobacteriaceae* ayudan las reacciones en AHK.

Se han observado tres formas básicas de fermentación en el medio AHK:

- **Fermentación de la glucosa solamente (alcalina/ácida)**

La primera forma de fermentación en AHK después de 18 a 24 h de incubación es un pico de flauta alcalino y una capa profunda ácida (alcalina/ácida). Esta reacción se observa en los organismos capaces de fermentar solamente la glucosa; son no fermentadores de la lactosa.

- **Fermentación de la lactosa y la glucosa (ácida/ácida)**

Algunos organismos tienen la facultad de fermentar tanto la lactosa como la glucosa en busca de elementos nutritivos, dando una reacción en el medio AHK de un pico de flauta ácido y una capa profunda ácida (ácida/ácida), después de 18 a 24 h de incubación.

- **No fermentación de la lactosa ni de la glucosa (alcalina/alcalina; alcalina/sin cambio)**

Algunas bacterias, sobre todo los bacilos no entéricos gramnegativos, son incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa. Estas bacterias se encuentran en el tracto intestinal junto con miembros de las *Enterobacteriaceae* y es necesario identificarlas definitivamente como no entéricas. Como ellas son incapaces de obtener sus nutrientes de los hidratos de carbono, acuden a la peptona que contiene el medio. Estos no entéricos pueden utilizar la peptona aeróbica o anaeróbicamente dando dos posibles reacciones en AHK. Un organismo que da un pico de flauta alcalino y una capa profunda alcalina (alcalina/alcalina) en un medio AHK, degrada la peptona tanto aeróbica como anaeróbicamente.

Una reacción de pico de flauta alcalino y sin cambio en la capa profunda (alcalina/sin cambio) es el resultado de un organismo que solamente puede catabolizar la peptona en condiciones aeróbicas; de allí que solamente el pico de flauta muestra el cambio de color (rojo). Cuando las peptonas son degradadas se produce un pH alcalino por la liberación de amoníaco (NH_3), que imparte al medio un color rojo intenso.

Prueba de motilidad (*Faddin, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. pp 138, 1993*)

Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil.

Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos (bacterias en forma de bastoncillo); sin embargo, algunas formas de cocos son móviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo.

A veces, las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se reversionan en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos.

Prueba de indol (Faddin, *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. pp 104-105, 1993)

La prueba de indol sirve para determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano.

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metilindol) e indolacético (IAA-indolacetato).

Diversas enzimas intracelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre colectivo de triptofanasa, lo que indica un sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol.

El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico, del cual puede formarse indol por desaminación, y escatol por descarboxilación del ácido indolacético.

- **Principales metabolitos indólicos producidos**

La enzima triptofanasa cataliza la reacción de desaminación, atacando la molécula triptófano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de indol.

La desaminación y la hidrólisis tienen lugar con el agregado de una molécula de agua en presencia de la enzima triptofanasa y el piridoxal fosfato como coenzima. En la desaminación es extraída la porción amina (NH_2) del aminoácido con la liberación de una molécula de amoníaco.

Existen dos tipos de desaminación: oxidativa y reductiva. La desaminación oxidativa extrae el grupo NH_2 de un aminoácido y se agrega un doble enlace, al producto desaminado (un compuesto no saturado) junto con la formación de NH_3 y energía.

La desaminación por el triptófano es del tipo reductor, por lo cual es extraído el NH_2 y liberado como NH_3 y energía, que es utilizada por la bacteria.

La degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico, o entrar en el ciclo de Krebs para liberar CO_2 , H_2O y una gran producción de energía. El NH_3 puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica. El indol, desdoblado de la molécula triptófano, puede ser detectado por un reactivo que posea una combinación química que produzca un color definido. La presencia o ausencia de formación de indol se emplea para la identificación bacteriana.

Anexo 2 Diagrama de los procesos realizados para la determinación de bacterias

