

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
Ciencias Biológicas y de la Salud

**EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN LA DIGESTION
ANAEROBIA SECA DEL LIRIO ACUATICO (*Eichhornia crassipes*).**

T E S I S

Para obtener el grado de

MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Presenta

BEATRIZ SOFIA SCHETTINO BERMUDEZ.

Julio de 1996

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

A Francisco y Anita, quienes son la motivación de mi vida

A la memoria de mi madre

A mis hermanas Rosa Ma. y Elisa

A mi padre y hermanos.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutor:

M en C. Oscar Monroy Hermosillo, por su apoyo, enseñanza y dirección de este trabajo.

A mis asesores:

Al Dr. Jorge Gómez H y a la Dra. Isabel Guerrero L., por su apoyo y asesoría.

A la Coordinadora de la Maestría:

Dra. Concepción Gutiérrez.

A mis compañeros y amigos:

M en B. Florina Ramírez, por su amistad y compañerismo.

A Carmen Fajardo, Mónica Meraz, Margarita Salazar, Agustín Torres, Teresa Cruz, Araceli Tomasini, por su amistad, apoyo y motivación.

A la alumna:

Carolina Luna por su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), según convenio PEPX/66/92 por considerársele nivel de excelencia.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios a través de la beca con el número de registro 59285

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de
Microbiología Ambiental del Departamento de
Biotecnología de la **UAM-Iztapalapa**

INDICE

	Página
RESUMEN	1
OBJETIVOS	4
METAS	4
1. INTRODUCCION	7
1.1 Antecedentes	8
1.1.1. Lirioacuático (<i>Eichhornia crassipes</i>)	8
1.1.2. Digestión anaerobia	8
1.1.3.1. Primera etapa: Hidrólisis y acidogénesis.	9
1.1.3.2. Segunda etapa: Acetogénesis.	11
1.1.3.3. Tercera etapa: Metanogénesis.	14
1.1.4. Un ambiente natural de la digestión anaerobia: rumen.	17
1.1.5. Producción de biogas a partir del lirio acuático.	18
1.1.6. Actividad de agua (a_w).	24
1.1.6.1. Influencia de la actividad de agua microbiana.	25
1.1.6.2. Solutos para bajar la actividad de agua y sus efectos.	26
1.1.6.3. Métodos para determinar la actividad de agua (a_w), adicionando solutos.	28
1.1.6.3.1. Ley de Raoult.	29
1.1.6.3.2. Ecuación de Norrish.	29
1.1.6.3.3. Ecuación de Ross.	29
1.1.6.4. Isotermas de sorción.	30
2. MATERIALES Y METODOS	34
2.1 Materiales	36
2.1.1. Reactor con agitación, control de temperatura y pH.	36
2.1.2. Inóculos	36
2.1.3. Preparación del sustrato para la digestión anaerobia en medio sólido	37
2.1.3.1. Medio de cultivo para la fermentación en medio sólido	37
2.1.2.1. Medio de cultivo para la fermentación en medio líquido.	38
2.2 Métodos.	38
2.2.1. Experimentales	39
2.2.1.1. Técnicas analíticas	39
2.2.1.2. Toma de muestras	41
2.2.1.3. Inoculación.	41

3. RESULTADOS Y DISCUSION	42
3.1. Isoterma de adsorción	44
3.1.1. Isoterma de adsorción de agua de la fibra de lirio	44
3.1.2. Isoterma del sistema etilenglicol-agua	45
3.1.3. Curva de adsorción-desorción de la fibra de lirio acuático	47
3.2. Fermentación en medio líquido.	48
3.2.1. Determinación de las constantes cinéticas a diferentes a_w	53
3.2.2. Tipo de inhibición en la fermentación a diferentes a_w	55
3.3. Fermentación en medio sólido	58
3.3.1. Fermentación en medio sólido con líquido ruminal como inóculo	58
3.3.2. Fermentación en medio sólido con líquido ruminal y lodos anaerobios como inóculo	65
3.3.3. Determinación de la constante de velocidad de primer orden de consumo de sustrato	71
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
4.1. Conclusiones	76
4.2. Recomendaciones.	77
5. APENDICES	78
5.1. Solución de vitaminas y oligoelementos	80
5.1.1. Solución de vitaminas	80
5.1.2. Solución de oligoelementos	80
5.2. Curvas estándar.	81
5.2.1. Curva estándar de acetato	81
5.2.2. Curva estándar de propionato	81
5.2.3. Curva estándar de butirato	82
5.2.4. Curva estándar de metano	82
5.2.5. Curva estándar de CO_2	83
5.3. Cálculo de las constantes cinéticas K_s y μ_{max}	84
5.4. Cálculo de hidrólisis del lirio acuático (FDN y FDA)	86
5.5. Cálculo del coeficiente de consumo de sustrato	87
5. REFERENCIAS.	90

RESUMEN

Los residuos orgánicos con alto contenido de sólidos han sido utilizados para producir ácidos grasos volátiles (AGV), biogas (metano-CO₂) en cultivo en medio sólido. En estos cultivos la actividad de agua (a_w) está estrechamente relacionada con la cantidad de agua disponible, que sirve de medio de transporte de los sustratos para los microorganismos y además se vincula con las reacciones bioquímicas que integran el metabolismo.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la a_w en la fermentación en medio líquido y sólido. Se utilizó el sistema de cultivo por lotes y dos consorcios microbianos como inóculos. Como modificador de la a_w se empleó etilenglicol en ambos cultivos. La actividad de agua se determinó en un equipo, que utiliza una técnica basada en la medición indirecta, por condensación del vapor de agua que se genera al tratar de alcanzar el equilibrio de fases. La medición de AGV, metano y CO₂ se realizó por cromatografía de gases (ionización de flama y conductividad térmica).

Se evaluó el efecto de la a_w en las fermentaciones en medio líquido utilizando glucosa y líquido ruminal como inóculo. En el control a a_w de 0.996, la glucosa se consumió en 15 horas y la producción de los ácidos grasos volátiles, se disoció del consumo de sustrato, siendo el propionato el producto principal. Se observó que el etilenglicol no tuvo un efecto bactericida para la mayoría de la población microbiana. Al disminuir los valores de a_w de 0.996 a 0.941, las tasas globales de consumo de sustrato descendieron, llegando incluso a anularse a un valor de a_w de 0.92. A un valor de a_w de 0.941 el sustrato todavía alcanzó a consumirse totalmente, sin embargo, ya no se observó producción de AGV ni variación global de la actividad de agua en la fermentación.

Con la ecuación de Monod se calcularon las constantes cinéticas K_s (constante de afinidad o saturación del sustrato) y μ_{max} (velocidad máxima de crecimiento) encontrándose que ambos parámetros cinéticos se alteraron al disminuir la a_w . Los valores calculados de K_s y μ_{max} en el control a a_w de 0.996 fueron de 1.033 milimoles/l y de 0.062 h⁻¹ respectivamente. El tipo de inhibición que se presentó al disminuir la a_w en el medio líquido fue no competitiva.

La digestión anaerobia de lirio acuático en medio sólido con líquido ruminal como inóculo, para evaluar el efecto sobre el consumo del sustrato, producción de ácidos grasos volátiles, metano y CO₂. El control se realizó a a_w de 0.982, el producto principal fue acetato y su tasa de producción de 0.5345 milimoles/100 g peso seco. A 0.971 la tasa de producción de acetato fue todavía muy similar al control, disminuyendo al variar la a_w y a 0.94 no hubo producción. El coeficiente del consumo del sustrato (k) en el control fue de 0.04826 d⁻¹ y disminuyó en forma exponencial a 0.0101 d⁻¹ al disminuir la a_w a un valor de 0.963.

Para evitar la acumulación de los AGV se utilizaron lodos anaerobios y líquido ruminal como inóculos y se observó en el control a a_w de 0.99 que la velocidad de producción de metano fue de 0.515 milimoles/100 g peso seco y la de acetato de 0.8540 milimoles/100 g peso seco. Al disminuir la a_w a 0.976 la velocidad de producción de metano disminuyó a 0.068 milimoles/100 g peso seco, llegando incluso a anularse a a_w de 0.968. El coeficiente del consumo del sustrato (k) en el control fue de 0.04536 d⁻¹ y disminuyó en forma exponencial a 0.00696 d⁻¹ al disminuir la a_w a un valor de 0.955.

OBJETIVOS Y METAS

RESUMEN

Los residuos orgánicos con alto contenido de sólidos han sido utilizados para producir ácidos grasos volátiles (AGV), biogas (metano-CO₂) en cultivo en medio sólido. En estos cultivos la actividad de agua (a_w) está estrechamente relacionada con la cantidad de agua disponible, que sirve de medio de transporte de los sustratos para los microorganismos y además se vincula con las reacciones bioquímicas que integran el metabolismo.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la a_w en la fermentación en medio líquido y sólido. Se utilizó el sistema de cultivo por lotes y dos consorcios microbianos como inóculos. Como modificador de la a_w se empleó etilenglicol en ambos cultivos. La actividad de agua se determinó en un equipo, que utiliza una técnica basada en la medición indirecta, por condensación del vapor de agua que se genera al tratar de alcanzar el equilibrio de fases. La medición de AGV, metano y CO₂ se realizó por cromatografía de gases (ionización de flama y conductividad térmica).

Se evaluó el efecto de la a_w en las fermentaciones en medio líquido utilizando glucosa y líquido ruminal como inóculo. En el control a a_w de 0.996, la glucosa se consumió en 15 horas y la producción de los ácidos grasos volátiles, se disoció del consumo de sustrato, siendo el propionato el producto principal. Se observó que el etilenglicol no tuvo un efecto bactericida para la mayoría de la población microbiana. Al disminuir los valores de a_w de 0.996 a 0.941, las tasas globales de consumo de sustrato descendieron, llegando incluso a anularse a un valor de a_w de 0.92. A un valor de a_w de 0.941 el sustrato todavía alcanzó a consumirse totalmente, sin embargo, ya no se observó producción de AGV ni variación global de la actividad de agua en la fermentación.

Con la ecuación de Monod se calcularon las constantes cinéticas K_s (constante de afinidad o saturación del sustrato) y μ_{max} (velocidad máxima de crecimiento) encontrándose que ambos parámetros cinéticos se alteraron al disminuir la a_w . Los valores calculados de K_s y μ_{max} en el control a a_w de 0.996 fueron de 1.033 milimoles/l y de 0.062 h⁻¹ respectivamente. El tipo de inhibición que se presentó al disminuir la a_w en el medio líquido fue no competitiva.

La digestión anaerobia de lirio acuático en medio sólido con líquido ruminal como inóculo, para evaluar el efecto sobre el consumo del sustrato, producción de ácidos grasos volátiles, metano y CO₂. El control se realizó a a_w de 0.982, el producto principal fue acetato y su tasa de producción de 0.5345 milimoles/100 g peso seco. A 0.971 la tasa de producción de acetato fue todavía muy similar al control, disminuyendo al variar la a_w , y a 0.94 no hubo producción. El coeficiente del consumo del sustrato (k) en el control fue de 0.04826 d⁻¹ y disminuyó en forma exponencial a 0.0101 d⁻¹ al disminuir la a_w a un valor de 0.963.

Para evitar la acumulación de los AGV se utilizaron lodos anaerobios y líquido ruminal como inóculos y se observó en el control a a_w de 0.99 que la velocidad de producción de metano fue de 0.515 milimoles/100 g peso seco y la de acetato de 0.8540 milimoles/100 g peso seco. Al disminuir la a_w a 0.976 la velocidad de producción de metano disminuyó a 0.068 milimoles/100 g peso seco, llegando incluso a anularse a a_w de 0.968. El coeficiente del consumo del sustrato (k) en el control fue de 0.04536 d⁻¹ y disminuyó en forma exponencial a 0.00696 d⁻¹ al disminuir la a_w a un valor de 0.955.

Los coeficientes de consumo de sustrato para ambos inóculos descendieron exponencialmente al disminuir los valores de a_w , sin embargo, en el intervalo de 0.981 a 0.965 los valores de los coeficientes fueron mayores cuando se utilizó únicamente líquido ruminal, por debajo de este valor no se observaron diferencias apreciables.

OBJETIVOS Y METAS

Objetivos generales.

1. Evaluar y establecer las condiciones de cultivo para digerir anaeróbicamente el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en condiciones de temperatura, pH y medio de cultivo definidos.
2. Bajo condiciones de cultivo definidas, estudiar, medir y evaluar el efecto de la a_w a diferentes concentraciones de etilenglicol sobre la digestión anaerobia en medio sólido del lirio acuático.

Objetivos particulares.

1. Estudiar y estimar el efecto de la a_w en cultivos por lotes en medio líquido con glucosa y líquido ruminal.
2. Evaluar y analizar las constantes cinéticas K_s y μ_{max} en la fermentación líquida al variar la a_w .
3. Estudiar, medir y entender el efecto de la a_w en la producción de los ácidos grasos volátiles (AGV) y biogas (metano- CO_2) en la digestión anaerobia del lirio acuático, utilizando como inóculo: a) líquido ruminal y b) lodos anaerobios y líquido ruminal.
4. Estudiar, calcular y explicar el comportamiento del coeficiente de consumo de sustrato al variar la a_w en la fermentación en medio sólido con ambos inóculos.

Metas.

1. Estimar las constantes cinéticas K_s y μ_{max} en el intervalo de a_w de 0.996 a 0.92 en la fermentación líquida, utilizando la ecuación de Monod y determinar el tipo de inhibición que se presenta al variar la a_w .

2. Estudiar el efecto de la a_w en el intervalo de 0.982 a 0.94 en la fermentación en medio sólido utilizando como inóculo líquido ruminal para la producción de AGV, y de 0.99 a 0.955 utilizando lodos anaerobios y líquido ruminal para la producción de AGV, metano y CO₂ y calcular los coeficientes de consumo de sustrato.
3. Definir y enumerar los efectos de la a_w en los dos tipos de medios de cultivos y de los consorcios microbianos.

1. INTRODUCCION.

1.1 Antecedentes

1.1.1. Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

En años recientes se han hecho esfuerzos para el desarrollo de fuentes alternativas de energía, por lo que se ha incrementado la importancia sobre procesos de producción de combustibles a partir de desechos orgánicos, como la digestión anaerobia, en la que intervienen poblaciones bacterianas complejas que transforman la materia orgánica en acetato, CO₂, hidrógeno y finalmente metano.

Entre los desechos orgánicos vegetales que pueden ser usados para la producción de biogas se encuentra el lirio acuático, que es una planta vascular acuática flotante que crece rápidamente. Se pueden producir 106 toneladas de materia seca por hectárea por año (Reddy y DeBurk, 1984), además su extenso sistema radicular le permite absorber gran cantidad de nutrientes disueltos, que toma directamente del agua, reduciendo así la carga orgánica de éstas y eliminando los metales pesados (Brij, 1984; Jamil y col, 1984). Por esta capacidad de absorber sustancias disueltas se ha utilizado en sistemas de tratamiento terciario de aguas residuales, en estos tratamientos los efluentes pasan primeramente a una planta de lodos activados, posteriormente se hace circular en lagunas de estabilización y el lirio comprende el tratamiento final. Sin embargo, para que este sistema sea efectivo, es necesario cosechar la planta para evitar que al decaer lixivie las sustancias que absorbió, por lo que el lirio debe ser tratado posteriormente para reducir su materia orgánica.

1.1.2. Digestión anaerobia.

La digestión anaerobia se puede llevar a cabo en ecosistemas muy diversos como: pantanos, sedimentos marinos o lacustres, los microambientes anóxicos del suelo, los tractos digestivos de los rumiantes y en algunas termitas (Zehnder, 1978; Garcia, 1991).

La degradación anaerobia de la materia orgánica se lleva a cabo en tres etapas:

- 1) Hidrólisis de los polímeros biológicos por los microorganismos hidrolíticos y; acidogénesis de los compuestos orgánicos sencillos formados por las bacterias fermentativas.

2) Acetogénesis de los metabolitos de la fermentación (ácidos orgánicos, ácidos grasos volátiles AGV, alcoholes) por las bacterias homoacetogénicas y sintróficas.

3) Metanogénesis, a partir del hidrógeno más dióxido de carbono, acetato, formato, compuestos metilados sencillos y de ciertos alcoholes en presencia de dióxido de carbono, por bacterias metagénicas, bajo condiciones ambientales particulares, como potenciales reductores de -350 mV, pH de 6.7 - 7.8, ausencia de sales aceptores finales de electrones como los sulfatos y nitratos (McInerney y Bryant 1981; Guyot, 1990).

1.1.3. Etapas de la digestión anaerobia.

1.1.3 1. Primera etapa: Hidrólisis y acidogénesis.

La hidrólisis es la primera etapa requerida para la utilización de los biopolímeros complejos como las proteínas, lípidos y carbohidratos que son transformados a moléculas más simples como aminoácidos, ácidos grasos y monosacáridos. Un gran número de factores afectan la velocidad a la cual los polímeros pueden ser hidrolizados. Por ejemplo, los materiales sin degradar, tales como la lignina y ceras, pueden retardar la hidrólisis de las partículas a las que estén asociadas cuando los polímeros son poco solubles o tóxicos (Gujer y Zehnder, 1983).

Los microorganismos que intervienen en la hidrólisis de los biopolímeros son muy diversos, como bacterias anaerobias o facultativas y hongos anaerobios, que degradan celulosa y se pueden hallar en el rumen, donde fueron descubiertos estos últimos (Theodorou y col., 1988). Además de éstos, se encuentran las bacterias proteolíticas y lipolíticas.

La rapidez de hidrólisis de distintos residuos puede interpretarse a través de una cinética de primer orden, teniendo siempre presente, que son funciones globales resultantes de cinéticas individuales más complejas y que no toda la materia orgánica es degradada con igual facilidad (Monroy, 1992).

En la Tabla 1.1. se muestran algunos microorganismos y enzimas que intervienen en la hidrólisis de biopolímeros así como sus constantes específicas de velocidad de degradación.

Tabla 1.1. Bacterias, enzimas hidrolíticas y constantes específicas de degradación de biopolímeros en la digestión anaerobia.

Biopolímero	Productos de hidrólisis	Exoenzima:E y Organismo O	k_p (d^{-1})
Lípidos	Ácidos grasos glicerol alcoholes	E: Lipasa O: <i>Clostridium sp</i>	0.4-0.6 (ésteres de ácidos grasos) 0.6-1.7(grasas) 0.08 (lípidos)
Proteínas	polipéptidos oligopeptidos aminoácidos	E: Proteasa E: Peptidasa O: <i>Proteus vulgaris</i> <i>Clostridium</i>	0.02 0.03
Celulosa	polisacáridos oligosacáridos glucosa	E: Celulasa O: <i>Acetovibrio cellulolyticus</i> Hongos facultativos <i>Clostridium</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Ruminococcus flavifaciens</i>	0.04 (celulosa cruda) 0.13
Hemicelulosa (xylanas, petosanas)	polisacáridos oligosacáridos hexosas pentosas	E: Hemicelulasa O: Hongos <i>Clostridium</i> <i>Bacteroides ruminocola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0.054

k_p Constante específica de velocidad de degradación, éstas han sido calculadas sobre datos de la literatura, asumiendo que todo el material es biodegradable.

(Gujer y Zehnder, 1983)

Durante esta primera etapa se lleva a cabo la fermentación de los compuestos hidrolizados a ácidos orgánicos, alcoholes, hidrógeno y bióxido de carbono, a través de la producción de intermediarios como el lactato, etanol, piruvato, succinato, entre otros, ocupando el piruvato una posición clave en la orientación de las fermentaciones. La producción de los intermediarios como el lactato y el etanol no se acumulan, pues la microflora metanogénica consume el hidrógeno y desplaza el metabolismo hacia productos más oxidados como el acetato, lo que hace que las bacterias fermentativas produzcan más acetato e hidrógeno que los otros metabolitos (García, 1991).

La producción de los ácidos orgánicos por las bacterias fermentativas disminuyen el pH, lo que puede tener un efecto inhibitorio, sobre todo en las bacterias metanogénicas, ya que las fermentativas pueden crecer a pH de 4.5 a 5.0 (Hobson, 1982).

Intervienen en la fermentación un conjunto diverso de bacterias anaerobias o facultativas, algunos ejemplos de ellas se muestran en la Tabla 1.2. así como los productos formados.

Tabla 1.2. Bacterias fermentativas de la digestión anaerobia

ESPECIES DE BACTERIAS FERMENTATIVAS	PRODUCTO
<i>Acetobacterium wodii</i> <i>Clostridium aceticum</i> <i>Clostridium formiaceticum</i>	acetato
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Acidaminococcus</i> sp.	acetato, butirato
<i>Lactobacillus</i> sp.	acetato, etanol, lactato
<i>Propionibacterium</i> sp.	acetato, propionato
<i>Bifidobacterium</i> sp.	acetato, lactato
<i>Ruminococcus</i> sp.	acetato, lactato, formiato
<i>Streptococcus</i> sp. <i>Leptotrichia</i> sp.	lactato
<i>Succinivibrio</i> sp.	succinato

(Guyot, 1990).

1.1.3.2. Segunda etapa: Acetogénesis.

Los compuestos formados en la primera etapa son transformados en acetato, hidrógeno y bióxido de carbono en la acetogénesis.

En esta etapa se evita que se acumulen los ácidos orgánicos formados anteriormente, y que pueden inhibir a la metanogénesis. Los grupos microbianos que intervienen son tres: a) las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, por sus siglas en inglés), b) las homoacetogénicas y c) las sulfato reductoras (BSR).

a) Las bacterias acetogénicas OHPA producen acetato e hidrógeno, éste último las inhibe, por lo que tienen estrecha relación con las bacterias que remueven el hidrógeno, las metanogénicas hidrogenofílicas, y con las bacterias sulfato reductoras (BSR) cuando en el medio existen sulfatos limitantes (García, 1982). Esta relación sintrófica entre bacterias OHPA y bacterias hidrogenofílicas recibe el nombre de transferencia interespecies de hidrógeno (McInerney y Bryant, 1981; Mountfort, 1984).

Actualmente han sido aisladas muy pocas bacterias OHPA, debido a que crecen en cocultivos con las bacterias hidrogenofílicas y tienen tiempos de crecimiento muy largos de 90-160 horas. En la Tabla 1.3 se muestran cuatro bacterias OHPA que son capaces de llevar a cabo la hidrólisis de los ácidos grasos y la de oxidar el benzoato (Guyot, 1990)

Tabla 1.3. Bacterias sintróficas (OHPA) de la digestión anaerobia .

BACTERIAS	SUSTRATO OXIDADO	PRODUCTO
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	ácidos carboxílicos saturados de C4 a C8	acetato, hidrógeno
<i>Syntrophobacter wolinii</i>	propionato	acetato, dióxido de carbono, hidrógeno
<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	ácidos grasos saturados de C4 a C18 y algunos ácidos grasos insaturados	acetato, hidrógeno
<i>Syntrophospora bryantii</i>	ácidos grasos de C4	acetato, hidrógeno
<i>Syntrophus buswellii</i>	benzoato	acetato, dióxido de carbono, hidrógeno

(Guyot, 1990; García, 1991).

b) Las bacterias homoacetogénicas se caracterizan por producir únicamente acetato, sin generar hidrógeno molecular, éstas se dividen en dos grupos: 1) las que son capaces de reducir el dióxido de carbono a acetato por los electrones generados durante la fermentación de sustratos carbonados, como la glucosa y fructosa y; 2) las que transforman una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono en acetato.

En la Tabla 1.4 se muestran algunos ejemplos de bacterias homoacetogénicas.

Tabla 1.4. Bacterias homoacetogénicas de la digestión anaerobia .

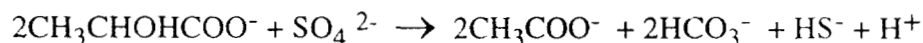
GRUPO 1. H^+ (reducción de un compuesto carbonado) + $CO_2 \rightarrow$ acetato	GRUPO 2. $H_2 + CO_2 \rightarrow$ acetato
<i>Clostridium formicoaceticum</i> <i>Clostridium aciuri</i> <i>Butyribacterium rettgeri</i> <i>Peptococcus glycinophilus</i>	<i>Acetobacterium wodii</i> <i>Acetogenium kivui</i> <i>Clostridium aceticum</i> <i>Acetitomaculum ruminis</i> <i>Acetoanaerobium noterae</i>

(García, 1991).

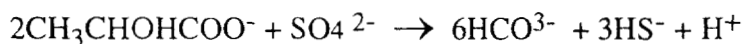
c) Las bacterias sulfato reductoras (BSR) se caracterizan por su capacidad de reducir los sulfatos a sulfuros.

Se pueden dividir en dos grupos (Pfennig y col., 1981).

i) Las del grupo I, que son capaces de oxidar parcialmente el lactato en acetato y dióxido de carbono, la reacción que se lleva a cabo es la siguientes.



ii) Las del grupo II realizan, en presencia de sulfatos, la oxidación de los ácidos grasos volátiles y de algunos compuestos aromáticos. La siguiente reacción es un ejemplo de la reacción de sulfatorreducción de este grupo.



Algunas bacterias sulfatorreductoras compiten por el uso del acetato y del hidrógeno con las bacterias metanogénicas, en presencia de sulfato. Cuando se acumulan los sulfuros producidos tienen un efecto negativo ya que pueden inhibir la metanogénesis (Guyot, y col., 1985). Los niveles de inhibición son muy variados y van de 50 a 1000 mg/l.

En la Tabla 1.5 se presentan algunos ejemplos de bacterias sulfatorreductoras

Tabla 1.5. Bacterias sulfatorreductoras.

GRUPO 1		GRUPO 2	
Género	Especie	Género	Especie
<i>Desulfovibrio</i>	<i>alcoholovorans</i>	<i>Deulfobacterium</i>	<i>nilini</i>
	<i>desulfuricans</i>		<i>autotrophicum</i>
	<i>fructosovorans</i>		<i>catecholicum</i>
	<i>furfuralis</i>		<i>indolicum</i>
	<i>sulfodismutans</i>		<i>niacini</i>
<i>Desulfobotulus</i>	<i>vulgaris</i>	<i>Desulfococcus</i>	<i>phenolicum</i>
	<i>sapovorans</i>		<i>biacutus</i>
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>antarticum</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>multivorans</i>
	<i>nigrificans</i>		<i>acetoxidans</i>
	<i>ruminis</i>		<i>geothermicum</i>
<i>Desulfobulbus</i>	<i>elongatus</i>	<i>Desulfosarcina</i>	<i>thermobenzoicum</i>
	<i>propionicus</i>		<i>variabilis</i>

(García, 1982)

1.1.3 3. Tercera etapa: Metanogénesis.

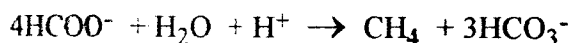
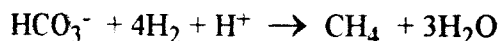
La última etapa de la digestión anaerobia es llevada a cabo por el grupo de las bacterias metanogénicas, que son las únicas capaces de producir metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono; de acetato, formato, de algunos compuestos como el metanol y las metilaminas y de ciertos alcoholes en presencia de dióxido de carbono.

Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y para que la metanogénesis se pueda llevar a cabo necesitan potenciales de oxidorreducción de -330 mV y un valor de pH entre 6 y 8.

Las particularidades bioquímicas de las bacterias metanogénicas hicieron que fueran clasificadas en el reino de las arqueobacterias (Balch y col., 1979), algunas de estas particularidades son: la composición de su pared que no contiene mureína, secuencias nucleotídicas, coenzimas y metabolismo, la presencia del cofactor F₄₂₀ (Rouvière y Wolfe, 1988) que es un 5-diazaflavin análogo a la flavina mononucleótico (FMN), que presenta una fuerte fluorescencia a 420 nm en el estado oxidado. Se puede observar el FMN observar en microscopia de epifluorescencia con un color azul-verde que permite identificar y determinar su presencia en los digestores anaerobios.

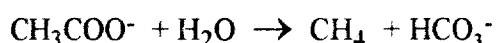
Las bacterias metanogénicas se pueden dividir en dos grupos:

i) Bacterias metanogénicas hidrogenofilicas, que obtienen su energía de la oxidación del hidrógeno en presencia de dióxido de carbono como aceptor de electrones; pueden utilizar al acetato como fuente de carbono pero no como fuente de energía. La mayoría de estas bacterias también pueden consumir el formato. Las reacciones de la formación de metano a partir de estos sustratos son:



Estas bacterias al oxidar el hidrógeno permiten la actividad de las bacterias OHPA formadoras de acetato.

ii) Bacterias metanogénicas acetoclásticas, las que producen metano a partir del acetato. La reacción es la siguiente :



Estas bacterias producen a partir de acetato el 73 % del metano en los digestores anaerobios (Smith y Mah, 1966), además pueden utilizar el metanol, metilaminas y el hidrógeno, Se dividen en dos géneros las bacterias metanogénica acetoclásticas, a saber:

Las del género *Methanosarcina* que tienen baja afinidad para el acetato, (del orden de 5 mM) y tiempos de generación de 30 horas y pueden ser inhibidas por el hidrógeno y el formato (Guyot y Ramírez, 1989).

Las bacterias del género *Methanosaeta* (anteriormente conocidas como *Methanothrix* (Zehnder y col., 1980), tienen una alta afinidad para el acetato entre 0.7 y 1.2 mM, no son capaces de utilizar el hidrógeno y el formato, aunque estos no son inhibitorios para ellas.

En la Tabla 1.6 se presentan las especie de bacterias metanogénicas más representativas.

Tabla 1.6. Bacterias metanogénicas en la digestión anaerobia .

Bacterias metanogénicas hidrogenofilicas.		Bacterias metanogénicas acetoclásticas	
Género	Especie	Género	Especie
<i>Methanobacterium</i>	<i>formicicum</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>barkeri</i>
	<i>bryantii</i>		<i>mazei</i>
	<i>thermoautotrophicum</i>		<i>thermophila</i>
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>ruminantium</i>	<i>Methanosaeta</i>	<i>concilii</i>
	<i>arboriphilus</i>		<i>thermoacetophila</i>
	<i>smithii</i>		
<i>Methanoplanus</i>	<i>limicola</i>		
<i>Methanococcus</i>	<i>vannielli</i>		
	<i>thermolithotrophicus</i>		
<i>Methanomicrobium</i>	<i>mobile</i>		
<i>Methanogenium</i>	<i>cariaci</i>		
	<i>marisnigri</i>		
<i>Methanospirillum</i>	<i>hungatei</i>		

(Schoberth, 1982, Guyot, 1990).

En la Figura 1 se presenta el esquema con las tres etapas de la digestión anaerobia.

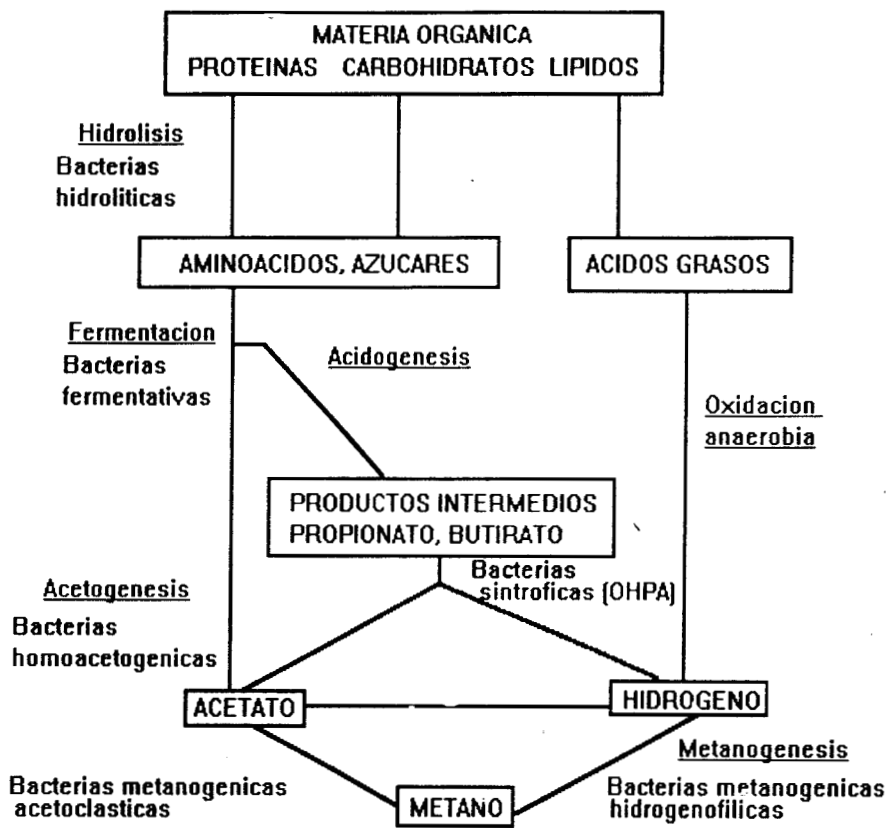


Figura 1.1. Esquema de la digestión anaerobia. (Gujer y Zehnder, 1983).

1.1.4. Un ambiente natural de la digestión anaerobia: el rumen.

El rumen es un sistema anaerobio muy reductor, donde se encuentra una mezcla de sólidos y líquidos. En éste se utiliza del 70 al 85 % de la materia seca digestible que consume el animal. La fase gaseosa esta compuesta por bióxido de carbono, metano y nitrógeno (Annison y col., 1981). La temperatura es muy cercana a 39°C, el pH permanece estable alrededor de 6.7, si la alimentación es a base de fibras, y desciende si se suministran almidones y azúcares solubles. Las fibras que son ingeridas por los rumiantes son reducidas a menor tamaño por la acción de las bacterias y por la masticación. Los sólidos en el rumen pueden tener tiempos de retención de 2 a 3 días y los líquidos entre 10 y 20 horas. Estos líquidos están compuestos principalmente de saliva, incrementándose así la capacidad amortiguadora en el rumen (la saliva es un amortiguador de bicarbonato-fosfato a pH 8.2), e impide que el pH baje, lo cual podría ser inhibitorio para una fracción de la población bacteriana. Los posibles productos inhibitorios bacterianos son los ácidos grasos volátiles y el amonio, pero estos no alcanzan altas concentraciones debido a que se absorben a través de la pared del rumen.

Además de las bacterias, están presentes los protozoarios ciliados y flagelados. Los primeros son organismos de mayor tamaño, estrictamente anaerobios y fermentan carbohidratos y digieren fibras y almidones. La principal fuente de nitrógeno proviene de las bacterias que ingieren. Algunas especies de protozoarios flagelados son parte del ciclo de vida de los hongos ficomicetos que se encuentran en el rumen (Bauchop, 1981).

El papel exacto de los protozoarios en el rumen no es bien conocido. Se ha sugerido que el almacenamiento de polisacáridos en los protozoarios es de gran importancia nutritiva para el animal, su proteína es de valor alimenticio y que pueden contribuir activamente al fraccionamiento de la celulosa, del almidón y de las proteínas (Annison y col., 1981).

Existen también en el rumen hongos que hidrolizan las fibras, fermentan carbohidratos a mezclas de ácidos y producen bióxido de carbono, éstos pueden ser sustratos para la metanogénesis (Mountfort y col., 1982).

Muchos tipos de bacterias del rumen forman asociaciones simbióticas y son necesarias para la estabilidad y funcionamiento de la población microbiana mixta. Por ejemplo, el rompimiento de la celulosa requiere de por lo menos tres enzimas y las bacterias celulolíticas del rumen no poseen todas las enzimas (Wood y col, 1982). Esto sugiere que existen otras cepas en el rumen que son necesarias para suplir esa deficiencia. También las bacterias tienen diferentes tasas de crecimiento, y algunas pueden crecer hasta que una reacción les provea de sustrato o factores de crecimiento.

Las bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas representan una pequeña fracción del rumen, quizá debido a la adhesión de éstas a las partículas. Ejemplos de algunas bacterias celulolíticas son: *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes*, hemicelulolíticas, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Bacteroides ruminicola*.

1.1.5. Producción de biogás a partir del lirio acuático.

El lirio acuático dada su composición química, puede ser utilizado para la producción de metano, en la Tabla 1.7 se presenta la composición elemental.

Tabla 1.7. Composición elemental del lirio acuático.

COMPONENTE %	REFERENCIA			
	GHOSE (1979)	WOLVERTON (1984)	SARMA (1984)	CHYNOWETH (1982)
Nitrógeno	3.8	2.3	1.55	3.98
Fósforo		0.4	0.53	0.84
Carbono	48	40	49	43.8

La relación carbono/nitrógeno (C/N) de 12.6, 17 y 11, la de C/P de aproximadamente 100 y de 52 no se consideran limitantes para la digestión anaerobia.

La composición orgánica del lirio acuático, se presentan en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8. Composición del lirio acuático.

		REFERENCIA				
		WOLVERTON (1980)	PILLAI (1984)	SARMA (1984)	SCHETTINO (1989)*	
P.S. 5-6%	S.V.					
		CELULOSA	22	25	18	23.76
		HEMICELULOS A	34	28	9.6	27.57
	80-89%	PROTEINA	15	27.5		14.25
		LIGNINA	6		9	8
		LIPIDOS	1.6	2		
	CENIZAS 11-20%					
	H. 94-95%					

P.S. =Peso seco; H. = Humedad; S.V. = Sólidos volátiles

* Análisis realizados a la fibra del lirio.

A partir de ésta composición se puede calcular la biodegradabilidad, por el contenido de lignina, del lirio con el modelo propuesto por Chandler y col. (1980).

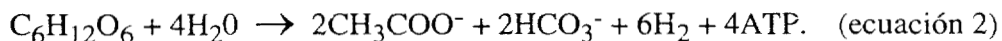
$$B = -0.028X + 0.83 \quad (\text{ecuación 1})$$

B = fracción biodegradable.

X = % de contenido de lignina en los sólidos volátiles

La biodegradabilidad lirio acuático, utilizando el modelo anterior, es del 60 al 66%.

También se puede estimar un rendimiento teórico a ácido acético en base a la composición del lirio acuático, mostrada en la Tabla 1.8, a partir de celulosa, hemicelulosa y proteína (aproximadamente 0.75 g/g de lirio seco), su biodegradabilidad del 66 % y considerando la conversión de glucosa a ácido acético:

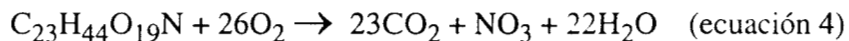


Se obtiene un redimiento de: $(0.75)(0.66)(0.655) = 0.3245$ g acetato/g de lirio seco.

Balance de materia en la digestión anaeróbica del lirio acuático: tomando como base promedio su composición, se ha propuesto la fórmula condensada $C_{23}H_{44}O_{19}N$ y un peso molecular de 638, se puede calcular la producción máxima de metano (PMM) con el siguiente balance estequiométrico:



y considerando que la materia orgánica se oxida a CO_2 de acuerdo con la siguiente ecuación:



De tal forma que al dividir la producción de metano/mol de lirio (ecuación 3) entre la DQO/mol de lirio (demanda química de oxígeno) (ecuación 4) se puede calcular la PMM: $(190 \text{ g } CH_4/\text{mol de lirio})/832 \text{ g DQO/mol de lirio} = 0.228 \text{ g } CH_4/\text{g DQO}$. El lirio acuático tiene una DQO de 1.09 g DQO/g lirio seco, lo que resulta en una producción de metano de 0.2485 g de CH_4/g lirio seco. Considerando que el 66 % del lirio es biodegradable, se obtienen 0.167 g CH_4/g lirio seco.

En la Tabla 1.9 se muestran los resultados obtenidos de la fermentación líquida del lirio acuático para producir biogas.

Tabla 1.9. Producción de biogás a partir de lirio acuático.

SOLIDOS %	SOLIDOS %	TIEMPO RETENCION	PRODUCCION DE BIOGAS	% CH ₄	REFERENCIA
INICIALES	DEGRADACION	DIAS	l gas/g ST	EN GAS	
9.7			0.11		DESPHANDE 1979 ¹
2.5		22	0.35	56	WOLVERTON 1980 ⁵
3.5		6	0.185	57	BOILLOT 1983 ⁴
		30	0.25		" ⁴
	42	15	0.32	67	CHYNOWETH 1982 ¹
2.65	68	32	0.56	56	MIAMBI 1983 ⁴
2.75	56	22	0.206	56	" ⁴
2.75	60	19	0.202	56	" ⁴
5		16	0.78	50	HAYES 1985 ¹
2	37.5	90	0.667	60	DIRAR 1985 ²
3	35.9	"	0.589	66	" ²
5	29.3	"	0.638	56	" ²
		5.7	0.285		SARASWAT 1986 ^{5*}
		3.2	0.104		" ⁵
5	31	5.33	0.12	51	MONROY 1988 ³

ST SOLIDOS TOTALES

- ¹ Mezclas de lirio con lodos de tratamiento primario.
- ² Mezclas de lirio con lodos adaptados previamente en digestores con lirio.
- ³ Mezclas de lirio con estiércol de vaca.
- ⁴ Lirio únicamente.
- ^{5*} Mezclas de lirio con lodos, sistema de dos fases, acidogénica y metanogénica con tratamiento alcalino.
- ⁵ Mezclas de lirio con lodos, sistema de dos fases, acidogénica y metanogénica

Se observa en la Tabla 1.9 que en la fermentación líquida generalmente se han utilizado concentraciones menores que 5% de lirio acuático obteniéndose altos rendimientos en la producción de biogás y metano.

Ramírez y col., (1988), trabajaron con mayores concentraciones de lirio acuático seco (50 a 100 g), utilizando como inóculo estiércol de vaca lechera, en un fermentador agitado, pero no lograron mejores conversiones a ácido acético, (0.031 g acético/l.h., utilizando 100 g de lirio seco).

De particular importancia han sido los residuos sólidos ya que la mayoría de los desechos orgánicos agrícolas, municipales y de la industria de los alimentos contienen alrededor del 20% de sólidos, éstos pueden ser tratados por un proceso que se conoce como digestión seca (Gosh y Lall, 1988), en donde el medio carece de agua drenable, y presenta ventajas en comparación con las fermentaciones líquidas ya que permite cargas orgánicas altas y diseño de digestores de menor volumen. El residuo digerido es un producto final orgánico bien estabilizado que puede ser usado como acondicionador de suelo o fertilizante.

La digestión seca se ha llevado a cabo en sistemas de una fase (hidrólisis-metanogénesis), en la Tabla 1.10 se mencionan algunos trabajos realizados para la producción de biogas.

Tabla 1.10. Producción de biogás por digestión anaerobia seca.

SOLIDOS %	SOLIDOS %	TIEMPO RETENCION	PRODUCCION DE BIOGAS	% CH4	REFERENCIA
INICIALES	DEGRADACION	DIAS	l gas/g ST	EN GAS	
30 - 35	30-35	16-21	0.1466	55	BAERE, 1985 ¹
	30-35	70	0.095	30-55	"
32			0.6	57	RIVARD, 1990
9.6		90	0.64	60	WUJCIK, 1980
20		105	0.725	55	"
30		150	0.7	51	"
32		250	0.625	53	"
35		259	0.325	55	"
55		140	0.075	44	"
35	55	120	0.133	60	BRUMMELER, 1988

¹ Termofílico (55°C)

Al proceso descrito por Baere (1985) también se le conoce como DRANCO (Dry Anaerobic Compost), que consiste de una digestión anaerobia seguida por un composteo.

La mayoría trabaja con la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales. Wujcik y Jewell (1980) utilizaron mezclas de estiércol de vaca fresco y seco con un inóculo metanogénico. La producción de biogás y metano se vio afectada cuando el contenido de sólidos aumentó; que después del 30% de sólidos empieza a decrecer la producción de biogás y de metano. También reportan que la producción de ácidos grasos volátiles se vio afectada por el contenido de sólidos, a niveles arriba del 55 %.

La digestión seca se puede llevar a cabo también en sistemas de dos fases, en ésta las moléculas complejas se rompen primero, para preparar el sustrato de la metanogénesis, además permiten una tasa de hidrólisis mayor, la cual ha sido la etapa limitante de los procesos de digestión (Mata-Alvarez, 1990).

Gosh y Lall (1988) utilizaron un lecho de residuos sólidos de derivados celulósicos, el lixiviado de la fermentación era recirculado al lecho de sólidos, lo que permitió que los ácidos volátiles se acumularan a niveles mayores de 22 g/l, la concentración de los ácidos volátiles no incrementó más allá de este nivel, indicando que la fase de hidrólisis-acidificación fue probablemente suspendida debido a la inhibición por producto o represión. El lecho exhibió muy poca producción de gas y metano, aparentemente porque las bacterias metanogénicas fueron severamente inhibidas por las concentraciones de ácidos volátiles altas. Por lo que fue necesario que parte de la recirculación del lixiviado pasara a un digestor metanogénico, logrando así tasas de formación de metano más altas en el digestor metanogénico que en el lecho de sólidos.

La fermentación en medio sólido de una fase, hidrólisis-acidificación, no es factible debido a la inhibición por las altas concentraciones de ácidos grasos volátiles, generalmente las concentraciones que se alcanzan de éstos ácidos es de 20 - 30 g/l. Esto indica que los ácidos grasos volátiles son inhibitorios a la fase de hidrólisis (De Baere, y col., 1985).

Pero basados en los hechos de que la formación de metano toma lugar espontáneamente en los rellenos sanitarios, y que ésta no es inhibida significativamente a niveles de 30 % de sólidos. De Baere y col. continuaron las investigaciones hacia el desarrollo de una sola fase anaeróbica para el proceso de fermentación en medio sólido de los residuos municipales, los cuales producen gas metano y una composta estable como productos finales.

Las desventajas de la fermentación seca o sólida pueden atribuirse al bajo contenido de humedad, limitación en el transporte de masa de algunos sustratos, difusión y distribución de los microorganismos a través del sustrato. En este tipo de fermentaciones más que el contenido de agua del sustrato es más importante la actividad de agua (a_w), para el crecimiento de los microorganismos (Jarvis, 1976; Leistner y Rodel, 1976), que difiere considerablemente dependiendo del soluto (Barbel, 1986).

1.1.6. Actividad de agua (a_w).

El término a_w determina el grado de interacción del agua con los constituyentes de los solutos en una solución real y es una medida indirecta del agua disponible para llevar a cabo diferentes reacciones.

Se define desde el punto de vista termodinámico como el cociente entre la presión de vapor del agua con un soluto (P), respecto a la presión de vapor del agua pura (P_o), a la temperatura de equilibrio del sistema.

$$a_w = P/P_o \quad (\text{ecuación 5})$$

La multiplicación de $a_w \times 100$ da la humedad relativa (HR) de la atmósfera en equilibrio con el soluto (Van den Berg y Bruin, 1981).

$$HR (\%) = a_w \times 100 \quad (\text{ecuación 6})$$

Para las condiciones de equilibrio entre el líquido, sólido y fase vapor, el potencial de agua puede ser relacionado a la humedad relativa en equilibrio (ERH) de la fase de vapor o la actividad de agua del sustrato por la ecuación:

$$\phi = RT \ln a_w / V_w \quad (\text{ecuación 7})$$

donde:

R = constante universal de los gases.

T = temperatura (°K)

V_w = volumen parcial molal del agua (m³/mol)

φ = potencial de agua (Pa)

(Gervais y col., 1988).

La razón por la que es mejor determinar la a_w , que el contenido de agua, para definir el crecimiento de los microorganismos, es porque el contenido de agua de un material no representa la concentración de agua disponible, la cual difiere considerablemente dependiendo del soluto (Hahn-Hägerdahl, 1986).

1.1.6.1. Influencia de la actividad de agua en la actividad microbiana.

La influencia de la a_w sobre la actividad microbiana puede ser a tres niveles a) celular, b) enzimático y c) en reacciones fisiológicas particulares.

a) En la actividad fisiológica de los microorganismos el potencial de agua del sustrato tiene un efecto significativo. Cuando éste disminuye la disponibilidad de agua se reduce y puede ser reconocida con un factor clave en la fermentación en estado sólido en donde se involucran dos principales componentes del potencial de agua: potencial matricial y osmótico, el primero incluye adsorción y efectos capilares del sólido presente y el potencial osmótico es determinado por la concentración y las propiedades polares de los solutos. Los efectos de estos dos potenciales están implicados en la disminución de la actividad microbiana debido a la repercusión en la difusión de solutos y gas. Cuando hay condiciones diferentes de potenciales de agua, la célula previene la salida pasiva de agua, adapta su potencial de agua interno, sintetizando solutos compatibles como azúcares, polioles o aminoácidos, o por difusión facilitada de solutos (Gervais y col., 1988).

El metabolismo de los microorganismos está fuertemente influenciado por la a_w del medio circundante para la producción de metabolitos secundarios tales como toxinas, enzimas y otros compuestos, controlando la a_w incluso se puede regular la fermentación y orientarla a la obtención de productos específicos, ya que a valores de a_w bajas, los microorganismos no usan la misma vía metabólica que a valores altos. (Gervais y col., 1986).

b) En la actividad enzimática la disponibilidad del agua puede influir en diversas formas (Hahn-Hägerdal, 1986):

i) En la flexibilidad conformacional de las proteínas y en las propiedades fisicoquímicas de la enzima.

ii) En la actividad ejercida por la enzima.

iii) En reacciones hidrolíticas el agua toma parte como un reactivo.

iv) La selectividad y la actividad catalítica podría depender del solvente usado.

c) En las reacciones de hidrólisis el agua sirve como un reactivo activo y como medio de difusión para llevar a la enzima en contacto con el sustrato, por lo que la reducción de la actividad de agua induce a que disminuya la tasa de reacción.

Solamente en las reacciones de oxidorreducción de lípidos ó reacciones involucradas en fase líquida no acuosa, como la hidrólisis enzimática de aceites, la actividad no está necesariamente correlacionada con a_w .

1.1.6.2. Solutos para bajar la actividad de agua y sus efectos.

Al tratar de estudiar la a_w sobre la actividad microbiana se han utilizado diferentes solutos para decrecerla como la adición de sales, azúcares o polioles, los más usados son: arabitol, polietilenglicol, 1-prolina, l-lisina, sorbitol, KCl, lactato de sodio, entre otros.

Debido a que no existe un soluto completamente inerte que baje sólo la actividad de agua sin ningún otro efecto sobre el metabolismo microbiano, se realizaron estudios en *Staphylococcus aureus* utilizando 1-prolina, sorbitol, KCl, lactato de sodio y polietilenglicol (PEG) de forma individual, se observó que no hay crecimiento celular a una a_w menor de 0.86 y que los polietilenglicoles tienen un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de los microorganismos (Chirife y Ferro Fontan, 1980). Además de la disminución de la a_w el efecto con PEG-200 (200 unidades de etilenglicol) o PEG-400 (400 unidades de etilenglicol) parece ser por parte del soluto, puesto que la inhibición del crecimiento de *S. aureus* con estos solutos ocurre a una a_w mas alta de 0.86, teniendo un efecto bactericida que no puede ser explicado solamente en términos de a_w (Vaamonde y col., 1982; Vaamonde y col., 1984; Hahn-Hägerdal, 1986).

Plitman y col. (1973), trabajaron sobre el efecto en el crecimiento de los dioles alifáticos 1,2-propanodiol y 1,3-butanodiol en *S. aureus*. Estos autores indican que éstos dioles tienen un efecto bactericida, el cual depende de la estructura química de las moléculas de soluto, encontrando que concentraciones mínimas de 1,2-propanodiol y 1,3-butanodiol fueron inhibitorias a a_w de 0.95 y 0.97 respectivamente.

Akedo (1977) investigó la actividad antimicrobiana de una variedad de dioles alifáticos y encontró que la inhibición de *Bacillus subtilis* depende de la longitud de la cadena y posición de los grupos hidroxilos y que el efecto antimicrobiano primario de los dioles fué debido a la inhibición del transporte del sustrato. Los resultados encontrados concuerdan con los de inhibición del transporte de sustrato por ácidos lipofílicos, en donde los derivados de ácidos grasos de cadena más larga inhiben el crecimiento bacteriano y la incorporación de aminoácidos, aún a bajas concentraciones. Es interesante notar que hay algunas estructuras similares entre los ácidos de cadena larga y los dioles, ambos tienen terminaciones hidrofílicas de grupos carboxilos o grupos hidroxilos y terminaciones hidrofóbicas de residuos hidrocarbonados de cadena larga, generalmente son llamados anfipáticos. En estudios de

microscopía electrónica en células, se han observado cambios estructurales por tales compuestos (Akedo, 1977).

Al disminuir la a_w en cultivos de bacterias, éstas acumularon ácido glutámico. especies más tolerantes acumularon ácido alfa aminobutírico, otras como *S. aureus* acumuló prolina (Measures, 1975).

En los microorganismos eucariotes se encontró que hay una acumulación intracelular de metabolitos, siendo el glicerol el principal producto acumulado. Por ejemplo, durante el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii*, a a_w reducidas el glicerol es el principal soluto osmoregulador, aunque el arabitol puede ser acumulado durante el crecimiento (Van Zyl, 1990).

1.1.6.3. Métodos para determinar la actividad de agua (a_w), adicionando solutos.

Los cambios de la a_w se pueden medir por medio de la ley de Raoult, la ecuación de Norrish o la ecuación de Ross como formas más frecuentes, a continuación se mencionarán brevemente cada una de ellas.

1.1.6.3.1. Ley de Raoult.

La ley de Raoult es poco precisa por abajo de una a_w de 0.95, a menos que se conozca el coeficiente de actividad para el soluto. Existen otras soluciones matemáticas disponibles, algunas de las cuales requieren conocimiento de la isoterma de sorción de agua del humectante.

Cuando esta ley se usa para predecir la a_w de sustratos de humedad intermedia, los datos de desorción se aplican hasta una a_w de aproximadamente 0.7, abajo de ésta se utiliza la de adsorción.

$$a_w = \delta (n_{H_2O} / (n_{H_2O} + n_{\text{soluto}})) \quad (\text{ecuación 8})$$

n_{H_2O} = moles de agua en solución

n_{soluto} = moles de especies de soluto disueltas en una solución de n_{H_2O} moles de agua.

δ = coeficiente de actividad (1 para soluto ideal.)

1.1.6.3.2. Ecuación de Norrish.

Norrish (1966) propuso una ecuación para predecir a_w en soluciones binarias no electrolíticas

$$a_w = X_1 \exp(-KX_2^2) \quad (\text{ecuación 9})$$

X_1 y X_2 son las fracciones molares del agua y del soluto respectivamente, y K es la constante de correlación.

Chirife y Ferro-Fontan (1980), aplicaron sucesivamente la ecuación para aproximadamente 20 diferentes soluciones acuosas binarias no electrolíticas, como azúcares, polioles, aminoácidos, amidas e hidroxiaácidos orgánicos. Concluyeron que el modelo de Norrish fue una excelente herramienta para describir la a_w en soluciones acuosas no electrolíticas para los alimentos de humedad intermedia.

1.1.6.3.3. Ecuación de Ross.

La ecuación de Ross (1975) supone que cada soluto se comporta independientemente y se disuelve en toda el agua del sistema. La ecuación es la siguiente:

$$a_{wf} = a_{wp} \cdot a_{w1} \cdot a_{w2} \cdot a_{w3} \dots a_w \quad (\text{ecuación 10})$$

a_{wf} = actividad de agua final

a_{wp} = actividad de agua en el producto antes de añadir el soluto.

a_{w1} = la actividad de agua que el soluto tendría si se disolviera en toda el agua. Se recomienda el uso de las isotermas del soluto para éste término.

En la ecuación de Ross se utilizan las isotermas experimentales, y ha sido usada para calcular la a_w iniciales de la fermentación en medio sólido con harina de yuca, utilizando el hongo *Aspergillus niger* (Oriol, 1987).

1.1.6.4. Isotermas de sorción.

Una isoterma de sorción puede ser descrita como un gráfico de la actividad de agua en función de la humedad relativa o actividad del espacio de vapor que rodea a un material. La temperatura debe ser constante. La isoterma de sorción es una herramienta útil porque puede ser empleada para predecir los cambios de potencial en la estabilidad de los alimentos (Caurie, 1981).

En la Figura 1.2 se muestran 3 tipos de isotermas. La del tipo 1 describe una isoterma para azúcar cristalina pura, ésta presenta muy pocos cambios en la ganancia de humedad hasta que llega a a_w de 0.7-0.8. Esto se debe a que el agua forma puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos, ya que a a_w bajas el efecto dieléctrico no es suficientemente fuerte para romper las fuerzas interactivas entre las moléculas individuales de azúcar. Sin embargo cuando la a_w se incrementa, las interacciones azúcar-agua son suficientes para disolver las moléculas y exponer nuevas superficies, en este punto el contenido de humedad aumenta considerablemente debido a la creación de una solución.

La isoterma del tipo 2, sigue una curva sigmoideal, la mayoría de los alimentos presentan este tipo de isoterma. La curva sigmoideal es causada por los efectos aditivos de la ley de Raoult, efectos de capilaridad e interacciones superficie-agua. Se observan dos deflecciones, una alrededor de la a_w de 0.2-0.4 y otra de 0.6-0.7. Estos son el resultado de los cambios en magnitud de los efectos fisicoquímicos separados.

En la isoterma del tipo 3 el agua se adsorbe sobre sitios específicos, la energía de enlace es muy grande y la a_w no aumenta, pero cuando se han llenado todos los sitios de enlace y los capilares, cualquier cambio en el contenido de humedad provoca un incremento en la a_w . Esto se debe a que el material no se disuelve, así que el agua añadida interactúa con el agua ya presente a través de puentes de hidrógeno y una solución superficial comienza a tener lugar (Van den Berg y Bruin, 1981).

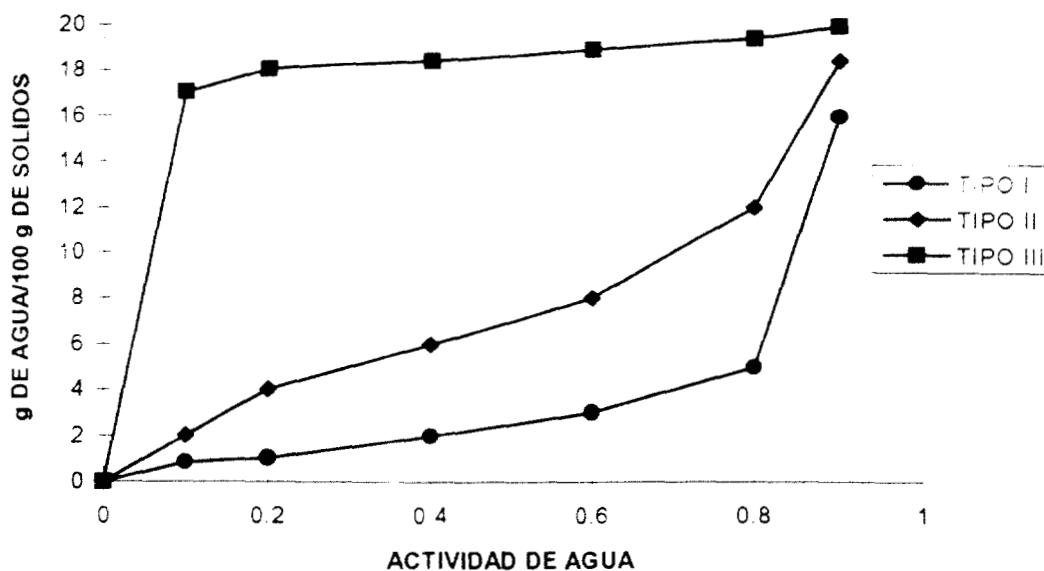


Figura 1.2. Tipos de Isotermas de adsorción de agua (Van den Berg y Bruin, 1981).

La forma en que el agua interacciona con los sustratos sólidos existe en diferentes grados de enlace o ligamento del agua, los tres principales efectos físicos son:

a) Efecto coligativo. Cuando un sólido se disuelve en agua, interacciona espacialmente con ésta a través de fuerzas electrostáticas, dipolo-dipolo, enlaces iónicos y puentes de hidrógeno. Estas interacciones afectan las propiedades del agua como el punto de ebullición, punto de congelación y presión de vapor. Esta interacción puede ser evaluada mediante la ley de Raoult.

b) Efecto capilar. La presión de vapor de agua sobre un menisco líquido curvo, es menor que la de agua pura, debido a los cambios en los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, como resultado de la curvatura de la superficie. Como los alimentos presentan una gama de capilares, se espera una disminución de la a_w .

El metabolismo de los microorganismos está fuertemente influenciado por la a_w del medio circundante para la producción de metabolitos secundarios tales como toxinas, enzimas y otros compuestos, controlando la a_w incluso se puede regular la fermentación y orientarla a la obtención de productos específicos. ya que a valores de a_w bajas, los microorganismos no usan la misma vía metabólica que a valores altos. (Gervais y col., 1986).

b) En la actividad enzimática la disponibilidad del agua puede influir en diversas formas (Hahn-Hägerdal, 1986):

i) En la flexibilidad conformacional de las proteínas y en las propiedades fisicoquímicas de la enzima.

ii) En la actividad ejercida por la enzima.

iii) En reacciones hidrolíticas el agua toma parte como un reactivo.

iv) La selectividad y la actividad catalítica podría depender del solvente usado.

c) En las reacciones de hidrólisis el agua sirve como un reactivo activo y como medio de difusión para llevar a la enzima en contacto con el sustrato, por lo que la reducción de la actividad de agua induce a que disminuya la tasa de reacción.

Solamente en las reacciones de oxidorreducción de lípidos ó reacciones involucradas en fase líquida no acuosa, como la hidrólisis enzimática de aceites, la actividad no está necesariamente correlacionada con a_w .

1.1.6.2. Solutos para bajar la actividad de agua y sus efectos.

Al tratar de estudiar la a_w sobre la actividad microbiana se han utilizado diferentes solutos para decrecerla como la adición de sales, azúcares o polioles, los más usados son: arabitol, polietilenglicol, 1-prolina, l-lisina, sorbitol, KCl, lactato de sodio, entre otros.

Debido a que no existe un soluto completamente inerte que baje sólo la actividad de agua sin ningún otro efecto sobre el metabolismo microbiano, se realizaron estudios en *Staphylococcus aureus* utilizando l-prolina, sorbitol, KCl, lactato de sodio y polietilenglicol (PEG) de forma individual. se observó que no hay crecimiento celular a una a_w menor de 0.86 y que los polietilenglicoles tienen un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de los microorganismos (Chirife y Ferro Fontan, 1980). Además de la disminución de la a_w el efecto con PEG-200 (200 unidades de etilenglicol) o PEG-400 (400 unidades de etilenglicol) parece ser por parte del soluto, puesto que la inhibición del crecimiento de *S. aureus* con estos solutos ocurre a una a_w mas alta de 0.86, teniendo un efecto bactericida que no puede ser explicado solamente en términos de a_w (Vaamonde y col., 1982; Vaamonde y col., 1984; Hahn-Hägerdal, 1986).

Plitman y col. (1973), trabajaron sobre el efecto en el crecimiento de los dioles alifáticos 1,2-propanodiol y 1,3-butanodiol en *S. aureus*. Estos autores indican que éstos dioles tienen un efecto bactericida, el cual depende de la estructura química de las moléculas de soluto, encontrando que concentraciones mínimas de 1,2-propanodiol y 1,3-butanodiol fueron inhibitorias a a_w de 0.95 y 0.97 respectivamente.

Akedo (1977) investigó la actividad antimicrobiana de una variedad de dioles alifáticos y encontró que la inhibición de *Bacillus subtilis* depende de la longitud de la cadena y posición de los grupos hidroxilos y que el efecto antimicrobiano primario de los dioles fué debido a la inhibición del transporte del sustrato. Los resultados encontrados concuerdan con los de inhibición del transporte de sustrato por ácidos lipofílicos, en donde los derivados de ácidos grasos de cadena más larga inhiben el crecimiento bacteriano y la incorporación de aminoácidos, aún a bajas concentraciones. Es interesante notar que hay algunas estructuras similares entre los ácidos de cadena larga y los dioles, ambos tienen terminaciones hidrofílicas de grupos carboxilos o grupos hidroxilos y terminaciones hidrofóbicas de residuos hidrocarbonados de cadena larga, generalmente son llamados anfipáticos. En estudios de

microscopía electrónica en células, se han observado cambios estructurales por tales compuestos (Akedo, 1977).

Al disminuir la a_w en cultivos de bacterias, éstas acumularon ácido glutámico, especies más tolerantes acumularon ácido alfa aminobutírico, otras como *S. aureus* acumuló prolina (Measures, 1975).

En los microorganismos eucariotes se encontró que hay una acumulación intracelular de metabolitos, siendo el glicerol el principal producto acumulado. Por ejemplo, durante el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii*, a a_w reducidas el glicerol es el principal soluto osmoregulador, aunque el arabitol puede ser acumulado durante el crecimiento (Van Zyl, 1990).

1.1.6.3. Métodos para determinar la actividad de agua (a_w), adicionando solutos.

Los cambios de la a_w se pueden medir por medio de la ley de Raoult, la ecuación de Norrish o la ecuación de Ross como formas más frecuentes, a continuación se mencionarán brevemente cada una de ellas.

1.1.6.3.1. Ley de Raoult.

La ley de Raoult es poco precisa por abajo de una a_w de 0.95, a menos que se conozca el coeficiente de actividad para el soluto. Existen otras soluciones matemáticas disponibles, algunas de las cuales requieren conocimiento de la isoterma de sorción de agua del humectante.

Cuando esta ley se usa para predecir la a_w de sustratos de humedad intermedia, los datos de desorción se aplican hasta una a_w de aproximadamente 0.7, abajo de ésta se utiliza la de adsorción.

$$a_w = \delta (n_{H_2O} / (n_{H_2O} + n_{\text{soluto}})) \quad (\text{ecuación 8})$$

n_{H_2O} = moles de agua en solución

n_{soluto} = moles de especies de soluto disueltas en una solución de n_{H_2O} moles de agua.

δ = coeficiente de actividad (1 para soluto ideal.)

1.1.6.3.2. Ecuación de Norrish.

Norrish (1966) propuso una ecuación para predecir a_w en soluciones binarias no electrolíticas.

$$a_w = X_1 \exp(-KX_2^2) \quad (\text{ecuación 9})$$

X_1 y X_2 son las fracciones molares del agua y del soluto respectivamente, y K es la constante de correlación.

Chirife y Ferro-Fontan (1980). aplicaron sucesivamente la ecuación para aproximadamente 20 diferentes soluciones acuosas binarias no electrolíticas, como azúcares, polioles, aminoácidos, amidas e hidroxiaácidos orgánicos. Concluyeron que el modelo de Norrish fue una excelente herramienta para describir la a_w en soluciones acuosas no electrolíticas para los alimentos de humedad intermedia.

1.1.6.3.3. Ecuación de Ross.

La ecuación de Ross (1975) supone que cada soluto se comporta independientemente y se disuelve en toda el agua del sistema. La ecuación es la siguiente:

$$a_{wf} = a_{wp} \cdot a_{w1} \cdot a_{w2} \cdot a_{w3} \dots a_w \quad (\text{ecuación 10})$$

a_{wf} = actividad de agua final

a_{wp} = actividad de agua en el producto antes de añadir el soluto.

a_{w1} = la actividad de agua que el soluto tendría si se disolviera en toda el agua. Se recomienda el uso de las isotermas del soluto para éste término.

En la ecuación de Ross se utilizan las isotermas experimentales, y ha sido usada para calcular la a_w iniciales de la fermentación en medio sólido con harina de yuca, utilizando el hongo *Aspergillus niger* (Oriol, 1987).

1.1.6.4. Isotermas de sorción.

Una isoterma de sorción puede ser descrita como un gráfico de la actividad de agua en función de la humedad relativa o actividad del espacio de vapor que rodea a un material. La temperatura debe ser constante. La isoterma de sorción es una herramienta útil porque puede ser empleada para predecir los cambios de potencial en la estabilidad de los alimentos (Caurie, 1981).

En la Figura 1.2 se muestran 3 tipos de isotermas. La del tipo 1 describe una isoterma para azúcar cristalina pura, ésta presenta muy pocos cambios en la ganancia de humedad hasta que llega a a_w de 0.7-0.8. Esto se debe a que el agua forma puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos, ya que a a_w bajas el efecto dieléctrico no es suficientemente fuerte para romper las fuerzas interactivas entre las moléculas individuales de azúcar. Sin embargo cuando la a_w se incrementa, las interacciones azúcar-agua son suficientes para disolver las moléculas y exponer nuevas superficies, en este punto el contenido de humedad aumenta considerablemente debido a la creación de una solución.

La isoterma del tipo 2, sigue una curva sigmoideal, la mayoría de los alimentos presentan este tipo de isoterma. La curva sigmoideal es causada por los efectos aditivos de la ley de Raoult, efectos de capilaridad e interacciones superficie-agua. Se observan dos deflecciones, una alrededor de la a_w de 0.2-0.4 y otra de 0.6-0.7. Estos son el resultado de los cambios en magnitud de los efectos fisicoquímicos separados.

En la isoterma del tipo 3 el agua se adsorbe sobre sitios específicos, la energía de enlace es muy grande y la a_w no aumenta, pero cuando se han llenado todos los sitios de enlace y los capilares, cualquier cambio en el contenido de humedad provoca un incremento en la a_w . Esto se debe a que el material no se disuelve, así que el agua añadida interactúa con el agua ya presente a través de puentes de hidrógeno y una solución superficial comienza a tener lugar (Van den Berg y Bruin, 1981).

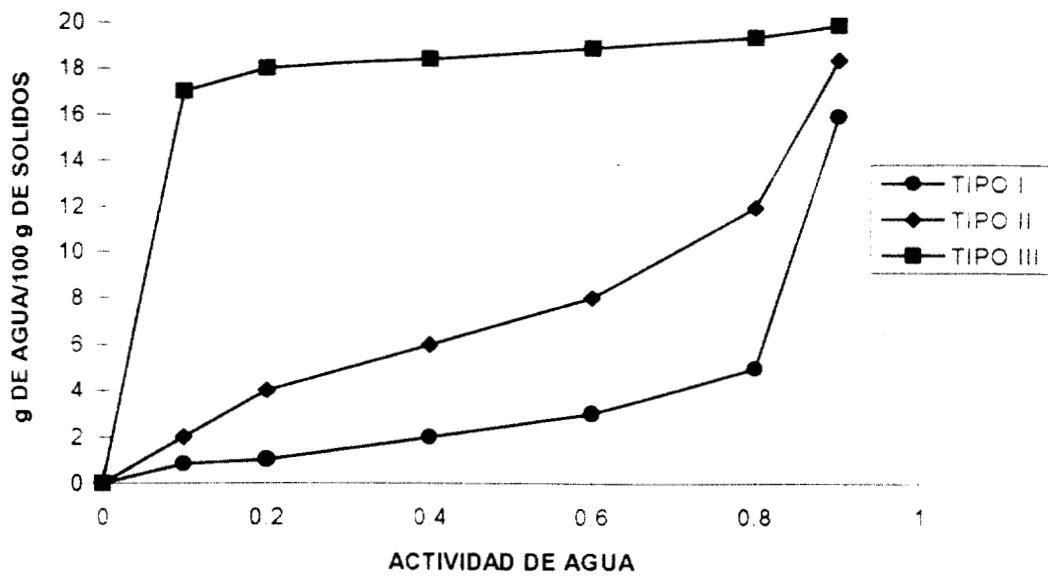


Figura 1.2. Tipos de Isotermas de adsorción de agua (Van den Berg y Bruin, 1981).

La forma en que el agua interacciona con los sustratos sólidos existe en diferentes grados de enlace o ligamento del agua, los tres principales efectos físicos son:

a) Efecto coligativo. Cuando un sólido se disuelve en agua, interacciona espacialmente con ésta a través de fuerzas electrostáticas, dipolo-dipolo, enlaces iónicos y puentes de hidrógeno. Estas interacciones afectan las propiedades del agua como el punto de ebullición, punto de congelación y presión de vapor. Esta interacción puede ser evaluada mediante la ley de Raoult.

b) Efecto capilar. La presión de vapor de agua sobre un menisco líquido curvo, es menor que la de agua pura, debido a los cambios en los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, como resultado de la curvatura de la superficie. Como los alimentos presentan una gama de capilares, se espera una disminución de la a_w .

202361

c) *Interacciones superficie-agua.* El agua interacciona directamente con otros grupos químicos a través de fuerzas dipolo, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals (enlaces hidrofóbicos) y puentes de hidrógeno. Estas moléculas de agua, así enlazadas, requieren de energía extra para ser transferidas del estado líquido al estado de vapor, por lo que presentan una menor presión de vapor, resultando en una reducción de la a_w . Este efecto es más pronunciado a bajos niveles de a_w (Labuza, 1985).

Existen modelos para describir la adsorción de una capa monomolecular de vapor en la superficie del material sólido, como el modelo de Langmuir que fue mejorado por Freundlich. Este autor supuso que la isoterma estaba compuesta por una serie de capas monomoleculares adsorbidas en una superficie compuesta por sitios heterogéneos.

Otro modelo fue descrito por Brunauer-Emmett-Teller (modelo de BET), que se obtuvo a partir de un modelo de adsorción cinético, el que no toma en cuenta la atracción entre las moléculas de adsorbato. A pesar de ser un modelo que sólo se ajusta a la isoterma del sustrato, en el intervalo de actividad de agua de 0 a 0.5, ha sido muy usado, porque permite calcular el valor de la monocapa (cantidad de agua necesaria para formar una capa de moléculas que cubra la superficie del alimento), considerada por algunos autores como punto de máxima estabilidad (Caurie, 1981).

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactor con agitación, control de temperatura y pH. La fermentación en medio líquido se llevó a cabo en un reactor de 2.5 l con propelas para la agitación y baffles para mayor turbulencia, con dos bombas para controlar el pH a 7, y recirculación de agua para mantener la temperatura a 37 °C.

Para la fermentación en medio sólido se utilizaron botellas serológicas de 55 ml con tapón de hule y sellos de aluminio.

2.1.2. Inóculos: Se utilizaron dos inóculos mixtos heterogéneos, el primero fué acidogénico (líquido ruminal) y el segundo metanogénico (lodos anaerobios).

El líquido ruminal (LR) fué obtenido de ovejas fistuladas, con una dieta del 3.5 % de su peso/día de: 40 % alfalfa, 40 % avena y 20 % de alimento concentrado. El pH del LR fué de 6.2 con un potencial de oxido-reducción (Eh) de - 255.

Para ser transportado, al inóculo se le burbujeó nitrógeno para conservar la atmósfera libre de aire. Al momento de usarse, se filtró con gasa para separar los restos de alimento y se centrifugó a 1500 rpm (300 g) en una centrífuga Sorvall durante 15 minutos, con el fin de separar los protozoarios y algunos otros microorganismos.

El lodo anaerobio (LAN) provenía del reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) de una fábrica de levaduras. Antes de ser utilizados fueron estabilizados con acetato a 35 °C y pH de 7.5. Se dejaron al vacío de 20 mm de Hg durante 12 horas para eliminar el metano y otros gases disueltos antes de inocular.

A ambos inóculos se les determinó la concentración de sólidos suspendidos volátiles.

Tabla 2.1. Concentración de sólidos suspendidos volátiles

Inóculo	Sólidos suspendidos volátiles (SSV). g/l
Líquido ruminal	16.8
Lodo anaerobio	15.66

2.1.3. Preparación del sustrato para la digestión anaerobia en medio sólido: El Lirio Acuático (LA) cosechado del Lago de Xochimilco, D.F. y Valsequillo. Pue., se mantuvieron en invernadero desde su recolección hasta el momento de su uso.

El lirio sin raíces fué molido y prensado para extraer el jugo y obtener la fibra de lirio. Esta última fué el sustrato.

El medio de cultivo utilizado para esta fermentación fué el siguiente:

2.1.3.1. Medio de cultivo para la fermentación en medio sólido: Se utilizó un medio mineral de acuerdo a los requerimientos de los microorganismos del rumen y para mantener un pH adecuado para la celulólisis. La urea adicionada suple una tercera parte del nitrógeno requerido, la suplementación de azufre y fósforo ayuda a la utilización del nitrógeno no proteico y digestión de la materia orgánica o fibra. También el fósforo es necesario para la actividad de las celulasas de las bacterias del rumen, que tienen requerimientos específicos de éste. (Hungate, 1980, Balch y col., 1979, Durand y Komizarczuk, 1987)

Tabla 2.2. Composición del medio de cultivo

Compuesto	g/100 g de L.A. seco
K_2HPO_4	0.83
KH_2PO_4	0.65
$MgSO_4$	0.30
Urea	1.93
$CaCl_2$	0.034
$NaHCO_3$	0.80
$NiCl_2$	trazas
Solución de vitaminas *	22 ml
Solución de oligoelementos *	22 ml

*Ver Apéndice 5.1

La fibra de lirio acuático se mezcló con el medio de cultivo.

Se utilizó etilenglicol (peso molecular de 62.07 g/mol, ligeramente viscoso con una densidad d_4^{20} 1.1135, miscible en agua) para disminuir la a_w .

La temperatura de incubación fue de 35 °C.

2.1.2.1. Medio de cultivo para la fermentación en medio líquido: La composición del medio de cultivo está basado en el medio descrito por Balch y Wolfe (1976).

Tabla 2.3. Medio de cultivo (por litro).

Solución mineral 1*	50 ml
Solución mineral 2*	50 ml
Solución de oligoelementos	10 ml
Solución de vitaminas	10 ml
Solución de NiCl (0.005 %)	10 ml
Solución de FeSO ₄ (2.5 %)	1.0 ml
Peptona de caseína	0.1 g
Extracto de levadura	0.1 g
Bicarbonato de sodio	2.0 g
Cisteína	0.5 g
Urea	2.38

Solución mineral 1

Compuesto	g/l
K ₂ HPO ₄	6.0

Solución mineral 2

Compuesto	g/l
KHPO ₄	6.0
NH ₄ Cl	2.4
NaCl	12.0
MgCl.6H ₂ O	2.1
CaCl ₂ .H ₂ O	0.16

Se mezclan todos los componentes, excepto la cisteína. Se pone a ebullición bajo atmósfera de nitrógeno para remover todo el oxígeno presente, después se enfría sin dejar de burbujear nitrógeno y se adiciona la cisteína.

El medio se esteriliza a 15 libras/pulgada² durante 15 minutos.

El sustrato utilizado fué glucosa, la cual se preparó en agua hervida, bajo nitrógeno, y se esterilizó en las mismas condiciones que el medio de cultivo.

2.2. Métodos. Se realizaron las isotermas de adsorción-desorción de la fibra del lirio acuático, del sistema etilenglicol-agua y de la mezcla de etilenglicol con la fibra del lirio acuático.

Se realizaron las cinéticas de la fermentación en medio sólido en las que se varió la a_w y el nivel de inóculo.

En la fermentación en medio líquido se realizaron las cinéticas variando la a_w , con el fin de determinar el tipo de inhibición que tiene el adicionar etilenglicol en los medios de cultivo.

2.2.1. Experimentales.

2.2.1.1. Técnicas analíticas.

Actividad de agua (a_w). Se determinó en un medidor de actividad de agua (Pullman, Wa.) CX-1 Decagon. La muestra sólida o líquida se deposita en una cajita de plástico que se coloca en el equipo. Un pequeño ventilador permite la circulación del aire sobre la superficie de la muestra, acelerando el equilibrio del vapor. Un sensor infrarrojo mide la temperatura de la superficie de la muestra. Un espejo interno enfría hasta llegar a la condensación de vapor de agua a la temperatura del punto de rocío. Un sistema de computo interno mediante las temperaturas de superficie y el punto de rocío calcula la a_w . Este sistema permite una lectura de la a_w en un tiempo menor que 5 minutos.

pH. Se suspendió 1 g de la muestra fermentada en 10 ml de agua destilada, se maceró en un homogeneizador de tejidos Ultraturax a 13000 rpm. La medición se realizó en un potenciómetro marca Corning.

Humedad. Se determinó por pérdida de peso a 100 °C, hasta peso constante. El peso seco fué la diferencia en peso.

Sólidos fijos (S.F.) y sólidos volátiles (S.V.). Se determinó por calcinación de la muestra seca de la fermentación en medio sólido a 550 °C durante dos horas, los sólidos volátiles (S.V.) fueron la diferencia en peso.

Determinación de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato). Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890, con detector de ionización de flama, con una columna capilar Superox II FA de 10 m de longitud y 0.53 mm de diámetro interno. Las temperaturas fueron: horno a 120 °C, detector a 120 °C e inyector a 130 °C con

programación de temperatura de 120 a 170 °C, el gas acarreador fué nitrógeno a una velocidad de 4 ml/min. Para la determinación se midió 1 ml de la muestra previamente homogenizada que se utilizó para medir el pH y se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos. A 250 µl del sobrenadante se le adicionaron 30 µl de ácido fórmico concentrado (99 % de pureza) y se congelaron a -4 °C hasta antes de ser analizadas. El volumen de inyección fué de 0.4 µl. En la Figura 5.1, 5.2 y 5.3 del Apéndice se muestra la curva estándar para cinco concentraciones de acetato, propionato, butirato

Composición del Biogás (metano - CO₂). Se determinó en un cromatógrafo con detector de conductividad térmica Gow Mac 550. La columna fué de acero inoxidable de 2 m de longitud, empacada con Carbosphere malla 80/100. El gas utilizado fué helio con un flujo de 45 ml/min. Las condiciones de operación fueron: temperatura de la columna 140 °C, detector 190 °C, inyector 170 °C, la corriente en los filamentos fué de 120 mA. El volumen de inyección fué de 50 µl, utilizando una jeringa pressure lock Hamilton. En la Figura 5.4 del Apéndice se muestra la curva estándar para metano a 6 diferentes concentraciones y en la Figura 5.5 la curva estándar para CO₂ con 8 diferentes concentraciones.

Cuantificación de glucosa. Se realizó por el método de azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). La figura 5.6 del Apéndice muestra la curva estándar realizada con 5 diferentes concentraciones de glucosa.

Determinación de humedad. Se utilizó otro método para determinar las humedades en la curva de desorción del lirio acuático, el cual fué por destilación con tolueno (AOAC, 1975)

Sólidos suspendidos totales (SST). Se cuantificaron por evaporación de la muestra y secado durante una hora a 110 °C. Los sólidos resultantes del secado se calcinaron durante una hora a 550 °C para obtener los sólidos suspendidos fijos (SSF). Por diferencia entre los SST y SSF, se obtuvieron los sólidos suspendidos volátiles (SSV) (APHA, 1988). La cantidad de SSV se consideró como la biomasa presente en el líquido ruminal y lodo anaerobio analizado.

Determinación de Fibra Detergente Neutra (FDN). Este método determina la fibra total en los sustratos de origen vegetal que está compuesta de hemicelulosa, celulosa, y lignina. La FDN es considerada como sinónimo de pared celular.

Determinación de Fibra Detergente Acida (FDA). Es un método que determina la lignocelulosa de los sustratos, el detergente utilizado en éste procedimiento disuelve todo el contenido celular y las hemicelulosa. La diferencia entre la FDN y la FDA es un estimado de la hemicelulosa, aunque ésta incluya la proteína adherida a las paredes celulares (Van Soest, 1963; Goering y Van Soest, 1972)

2.2.1.2. Toma de muestras. La fermentación en medio sólido se muestreo diariamente durante 10 días. Los parámetros medidos fueron actividad de agua, pH, humedad, sólidos fijos y volátiles, producción de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato), producción de metano y CO₂

De la fermentación en medio líquido se tomaron muestras cada 4 horas durante 48 horas, a éstas se les midió la a_w , el consumo de glucosa y la producción de etanol, acetato, propionato y butirato.

2.2.1.3. Inoculación. En la cámara anaerobia se inocularon con líquido ruminal las botellas serológicas que contenían 8 g de lirio con medio de cultivo para la fermentación sólida, la humedad final fué de aproximadamente 85 %.

La fermentación en medio sólido del lirio acuático se realizó también con líquido ruminal y lodos anaerobios, éstos últimos fueron dejados 12 horas al vacío en la cámara anaerobia antes de ser utilizados.

Para la fermentación en medio líquido el reactor se inoculó con 150 ml de líquido ruminal.

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. Isotherma de adsorción.

3.1.1. Isotherma de adsorción de agua de la fibra de lirio. Se determinó la isoterma en el intervalo que comprende las cantidades de 4 a 14 g de agua/g de lirio seco. En la Figura 3.1 se muestran los resultados

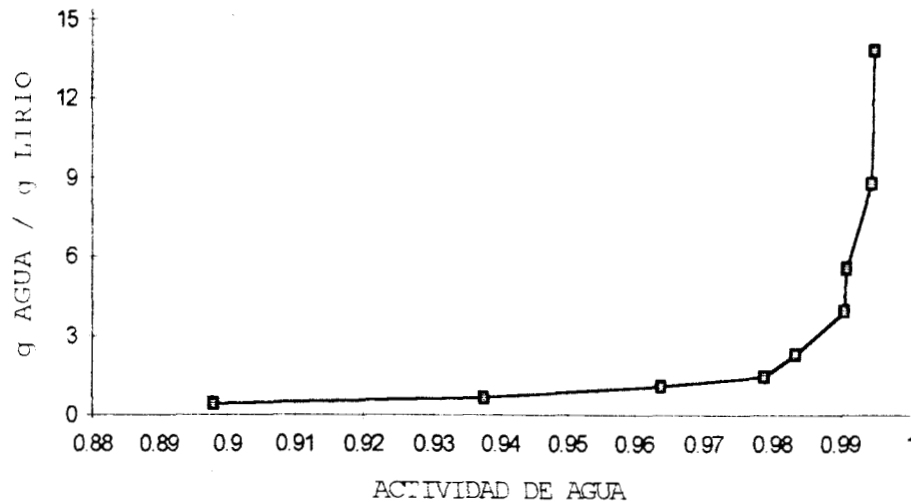


Figura 3.1. Isotherma de adsorción de agua sobre lirio acuático.

Se observa en la Figura diferentes regiones de la isoterma, que sugieren distintas formas de interacciones del agua. Se aprecia que cambios mínimos en el contenido de agua provocan grandes cambios en la a_w en el intervalo de 0.898 a 0.98. Esto sugiere un fenómeno de adsorción en la superficie externa. Después de 0.98 el incremento en la a_w es paulativo y sólo se logran cambios con grandes incrementos del contenido de agua en el lirio, sugiriendo que el agua es retenida por capilaridad en las fibras del lirio (Van den Berg y Bruin, 1981).

Las fibras del lirio acuático tuvieron una capacidad de retención del agua de 6 g H_2O/g lirio, sin provocar agua drenable, ésta fué mayor que la del bagazo de caña que se reporta

de 4 g H₂O/g bagazo (Oriol, 1987). Esta capacidad de retención de agua de la fibra del lirio fue importante para llevar a cabo la fermentación en medio sólido, se observó que la mayor retención de agua fue en el intervalo de a_w de 0.98 a 0.993.

3.1.2. Isotherma del sistema etilenglicol-agua. Varios solutos pueden ser incorporados a los sustratos para disminuir la a_w en el intervalo deseado. La utilización del etilenglicol requiere, entre otras cosas, un conocimiento preciso de su capacidad para disminuir la a_w , por lo que se realizó la isoterma del sistema etilenglicol-agua, los resultados son presentados en la Figura 3.2

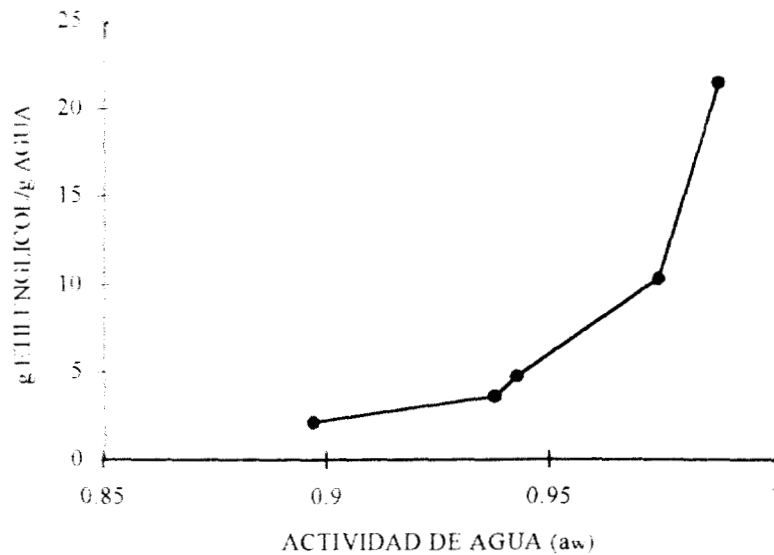


Figura 3.2 Isotherma del sistema etilenglicol-agua.

Predicción de la a_w de la fibra de lirio con etilenglicol. Se utilizó la ecuación de Ross, para predecir la a_w en la fibra de lirio con etilenglicol.

Ecuación de Ross

$$a_w \text{ final} = (a_w \text{ lirio}) (a_w \text{ etilenglicol}) \quad (\text{ecuación 11})$$

Para emplear la ecuación se utilizaron las isotermas de la fibra de lirio y del etilenglicol.

En la Figura 3.3. se muestran las gráficas con los valores obtenidos experimentalmente de la a_w de la fibra de lirio con diferentes concentraciones de etilenglicol, y los valores calculados con la ecuación de Ross y se observa que ambas siguen un comportamiento similar. Empleando ésta ecuación se puede predecir la a_w en la fermentación en medio sólido cuando se utiliza etilenglicol para disminuir la a_w .

La concentración de sales adicionadas al lirio (en base seca) fué de aproximadamente 5% por lo que no influyó para ser considerada en la ecuación.

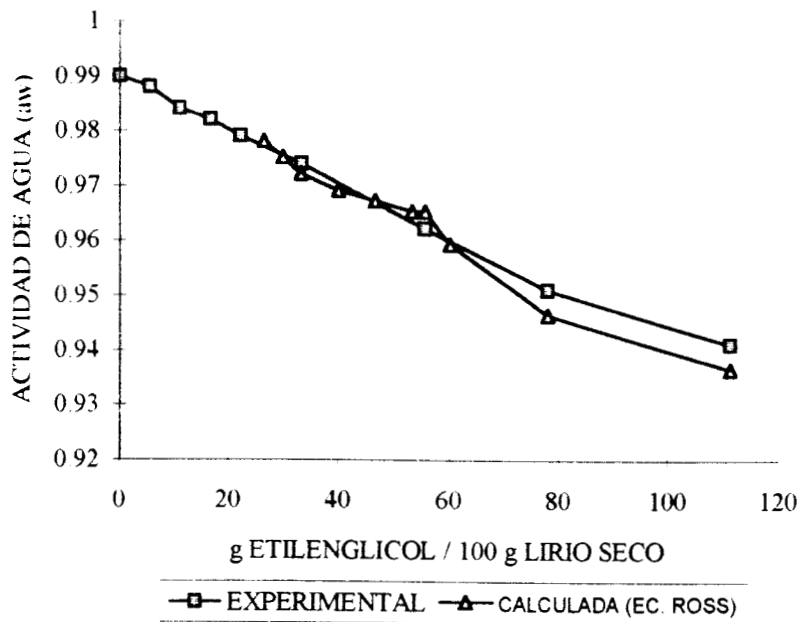


Figura 3.3. Actividad de agua del Lirio acuático con etilenglicol a diferentes concentraciones.

Curva de adsorción-desorción de la fibra de lirio acuático. Esta curva se realizó en el intervalo de humedad de 30 a 95 % y se midió a que a_w correspondía. La figura 3.4 representa el comportamiento a diferentes valores

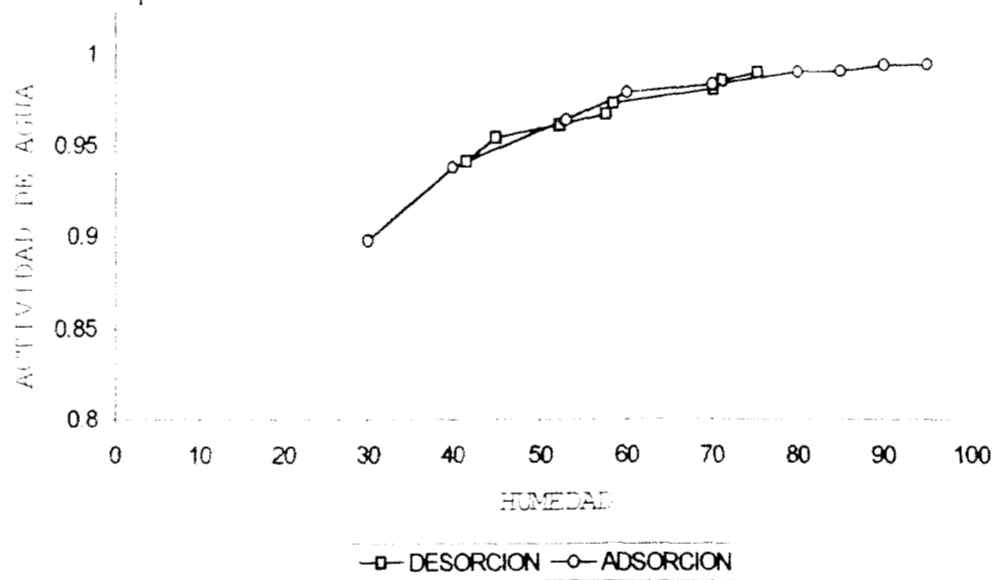


Figura 3.4. Curva de adsorción-desorción del lirio acuático.

La curva de adsorción-desorción no muestra histéresis en el intervalo de humedad del 40 al 80%, este tipo de curva es característico de los alimentos con alto contenido de azúcares (Labuza, 1985). Esta gráfica permitirá además conocer a que humedades corresponden las a_w empleadas en la fermentación en medio sólido.

Se puede decir que empleando la ecuación de Ross se puede predecir la a_w inicial en el medio de cultivo, ya que considera el efecto de la a_w del lirio y del soluto.

La fibra del lirio acuático es un sustrato que por su capacidad de retención de agua permite a los microorganismos, como las bacterias su crecimiento y formación de productos, ya que requieren de a_w más altas, de 0.91 - 1.00, en comparación con los hongos filamentosos, que pueden crecer a a_w de 0.8 - 0.87 (Beuchat, 1983).

3.2. Fermentación en medio líquido. Cuando la a_w disminuye en la fermentación en medio líquido es importante conocer y entender el efecto que tiene sobre el metabolismo de los microorganismos, así como el efecto que tiene el adicionar un soluto, como etilenglicol, para modificar la a_w . Para observar ésto se realizaron cinco fermentaciones a diferentes a_w en un reactor agitado con control de pH y temperatura, utilizando glucosa (30 g/l) y líquido ruminal (10 % v/v). De los resultados obtenidos se calcularon las constantes cinéticas K_s y u_{max} con la ecuación de Monod a diferentes a_w y se determinó el tipo de inhibición. Las condiciones de cultivo para la fermentación en medio líquido a diferentes a_w se presentan en Tabla 3.1

Tabla 3.1. Condiciones de cultivo de la fermentación en medio líquido con glucosa y líquido ruminal.

FERMENTACION	INOCULO g S.S.V./l	pH	$a_{wi} - a_{wf}$	ETILENGLICOL mmoles/l
1	2.29	7.5	0.996 - 0.987	0
2	2.29	7.5	0.981 - 0.978	525.8
3	2.29	7.4	0.971 - 0.964	1854.84
4	2.29	7.2	0.941 - 0.940	2516.13
5	2.29	7.9	0.921 - 0.92	3612.9

S.S.V. = sólidos suspendidos volátiles; a_{wi} = actividad de agua inicial;
 a_{wf} = actividad de agua final

La primera fué un control a un nivel de a_{wi} de 0.996 (sin etilenglicol), decreciendo al final de la fermentación a una a_{wf} de 0.987, debido a la utilización del agua en las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo, como la hidrólisis (Hahn-Hägerdal, 1986) o bien porque se transforma de un soluto a otro, como lo fué la transformación del sustrato a productos. Los perfiles del consumo de sustrato y producción de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato), se muestran en la Figura 3.5.

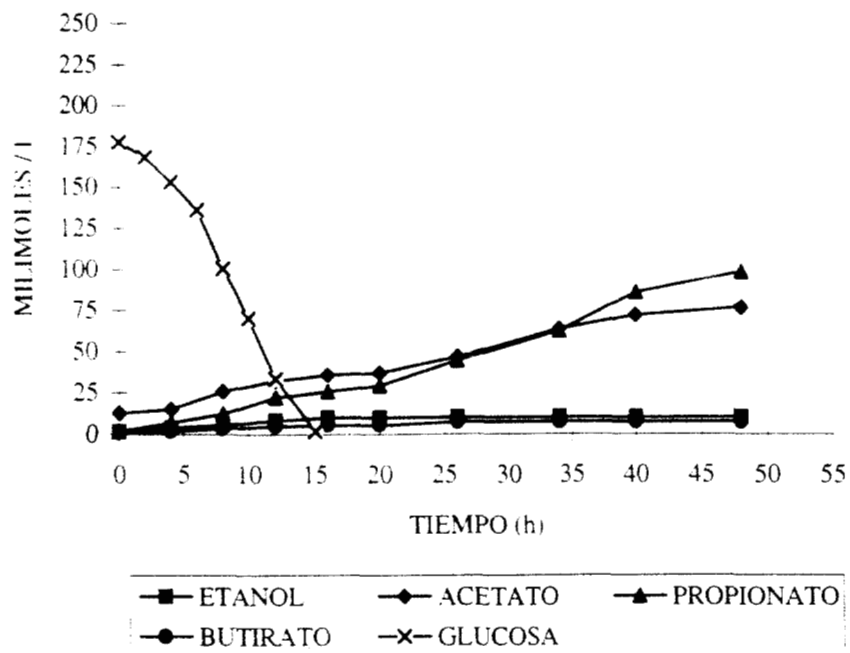


Figura 3.5. Fermentación líquida con glucosa a a_w de 0.996-0.987

Los principales productos de la fermentación fueron el propionato y el acetato. El perfil de la fermentación fué similar a la fermentación propiónica de un cultivo axénico, estabilizándose a las 45 horas. (Moat y Foster, 1988). La glucosa fué consumida en 15 horas aproximadamente y el perfil de producción de los ácidos grasos volátiles (AGV) se disoció del consumo de sustrato.

Los resultados obtenidos a una a_{wi} de 0.971 y a_{wf} 0.964 se muestran en la Figura 3.6.

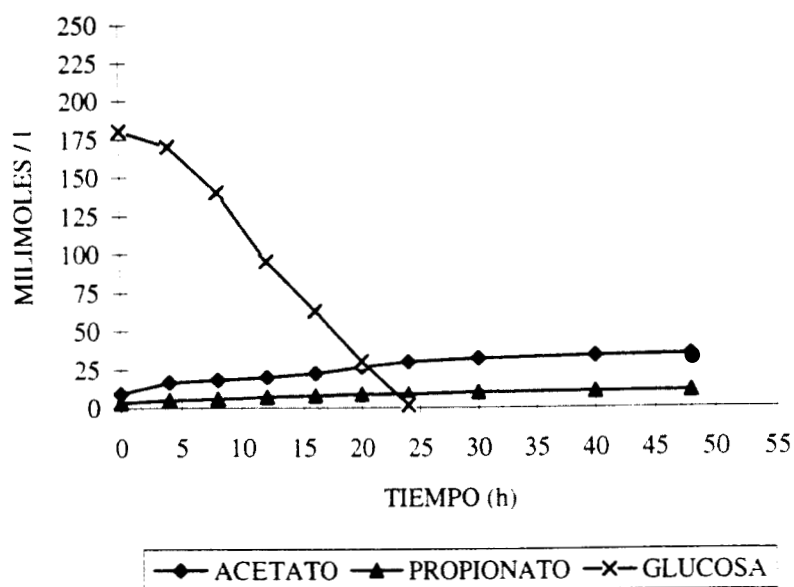


Figura 3.6. Fermentación líquida con glucosa a a_w de 0.971-0.964.

El consumo del sustrato fué similar al encontrado a una a_w de 0.996 y representó una asimilación de cerca del 95 % del azúcar inicial. Se observa que se consume en 25 horas. El patrón fermentativo también cambió bajo estas condiciones de cultivo, el acetato fué el producto principal, ya que los microorganismos no utilizan las mismas vías metabólicas cuando la a_w disminuye (Gervais y col., 1986). Por otro lado, la producción de acetato fué estequiométricamente más baja que la esperada (Wang, 1984). Una explicación del consumo de glucosa sin la formación aparente de productos se pudo deber a un incremento en los requerimientos energéticos del cultivo para mantenerse viable, ya que es mayor para el crecimiento anaerobio que para el aerobio. Su metabolismo productor de energía tiene un menor rendimiento, el coeficiente de mantenimiento es de 0.47 g glucosa/g biomasa seca (Rose, 1977). Los microorganismos responden a la disminución de la a_w en el medio de crecimiento, incrementando las concentraciones de uno o más de los componentes intracelulares, como el glicerol o aminoácidos, éstos pueden actuar como osmorreguladores, además protegen la actividad enzimática y pueden servir como material de reserva, para ser

utilizados cuando la a_w se incrementa, algunos de estos metabolitos incluso pueden ser excretados al medio (Van Zyl, 1990; Gervais y col., 1988; Measures, 1975).

La Figura 3.7 muestra el perfil de la fermentación a una a_{w_i} de 0.941, la glucosa se consume en aproximadamente 40 horas. La producción de los ácidos grasos volátiles fue casi nula en comparación con la a_w de 0.971, esto nuevamente refleja que el metabolismo fue afectado por la disminución de la actividad del agua.

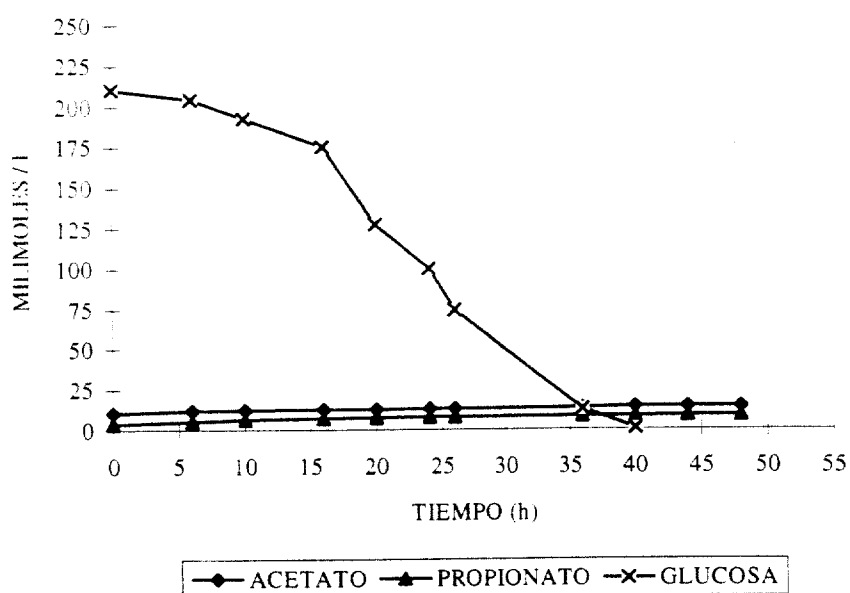


Figura 3.7. Fermentación líquida con glucosa a a_w de 0.941-0.940.

El perfil de la fermentación a una a_{w_i} de 0.921 se observa en la Figura 3.8. Después de 45 horas, el consumo de glucosa fue menor del 15 %, y los productos de la fermentación fueron nulos.

222861

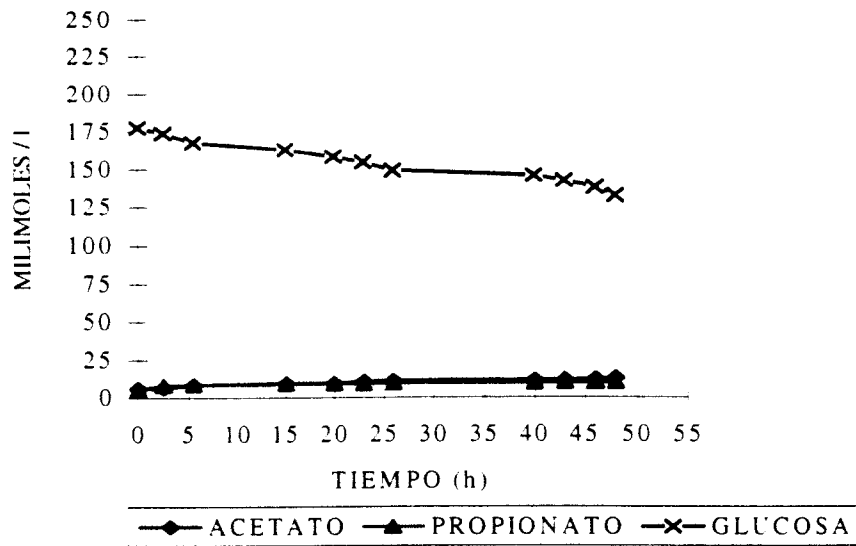


Figura 3.8. Fermentación líquida con glucosa a a_w de 0.921 - 0.92

A continuación se presentan en la Tabla 3.2. las velocidades de producción de los ácidos grasos volátiles a diferentes a_w en la fermentación líquida con glucosa.

Tabla 3.2. Velocidades de producción de ácidos grasos volátiles.

ETILENGLICOL mmoles/l	$a_{wi} - a_{wf}$	ETANOL mmoles/l*h	ACETATO	PROPIONATO	BUTIRATO
0	0.996 - 0.987	0.559	1.402	2.05	0.142
525.8	0.981 - 0.978	0.394	2.04	0	0
1854.84	0.971 - 0.964	0	0.719	0.213	0
2516.13	0.941 - 0.940	0	0.076	0.114	0
3612.9	0.921 - 0.92	0	0	0	0

Se observa que las velocidades de producción de acetato y propionato disminuyen al modificarse la a_w , esto puede ser debido a la disminución de agua disponible en el medio, por lo que los sustratos y los productos se concentran, afectando el metabolismo de los microorganismos.

3.2.1. Determinación de las constantes cinéticas a diferentes a_w . Para determinar las constantes cinéticas a diferentes concentraciones de etilenglicol se utilizó la ecuación de Monod para un cultivo en lote.

Ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max}(X)(S)}{K_s + S} \quad (\text{ecuación 12})$$

μ = velocidad específica de crecimiento

μ_{\max} = velocidad máxima de crecimiento.

X = biomasa.

K_s = constante de afinidad ó de saturación.

S =concentración del sustrato.

Con la ecuación de velocidad específica de crecimiento de Monod, la obtención del tiempo de curso de la reacción puede ser ahora determinado analíticamente por la integración de la ecuación 13.

$$t = \int_s^{S_0} \frac{dS}{Y\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} \int_s^{S_0} \frac{S + K_s}{Y(X)(S)} dS \quad (\text{ecuación 13})$$

$$Y = (X - X_0)/(S_0 - S) \quad (\text{ecuación 14})$$

Y : rendimiento.

$$X = X_0 + Y(S_0 - S)$$

Para obtener:

$$\mu_{\max} t = \left(\frac{K_s}{S_0 + YX} + 1 \right) \ln \frac{X}{X_0} - \left(\frac{K_s}{S_0 + YX_0} \right) \ln \frac{S}{S_0} \quad (\text{ecuación 15})$$

La ecuación 15 es más fácilmente utilizada, para calcular el tiempo requerido para llegar a varias concentraciones de sustrato (Bailey y Ollis, 1986).

El siguiente método lineariza la ecuación integrada para encontrar los parámetros cinéticos:

$$\frac{t}{\ln \frac{S_0}{S}} = \frac{\left[\frac{K_s}{S_0 + \frac{X_0}{Y}} + 1 \right] \ln \frac{X}{X_0}}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max} \left(S_0 + \frac{X_0}{Y} \right)} \quad (\text{ecuación 16})$$

(Levenspiel, 1989).

Utilizando la ecuación 16 se obtuvieron las constantes cinéticas K_s y μ_{\max} a diferentes a_w (ver Apéndice 5.3), los resultados se muestran en la Tabla 3.3.

Los perfiles de biomasa se calcularon a partir de la concentración inicial de inóculo, medido como sólidos suspendidos volátiles y considerando un rendimiento celular de 0.10 (Pérez. 1981; Quintero. 1981).

Tabla 3.3. Constantes cinéticas del modelo de Monod a diferentes concentraciones de etilenglicol.

ETILENGLICOL mmoles/l	$a_{w,i} - a_{w,f}$	K_s mmoles/l	μ_{\max} h^{-1}	r^2
0	0.996 - 0.987	1.033	0.062	0.9984
525.8	0.981 - 0.978	4.605'	0.0409 ^	0.9909
1854.84	0.971 - 0.964	5.410'	0.0354 ^	0.996
2516.13	0.941 - 0.940	19.67'	0.0351 ^	0.9987
3612.9	0.921 - 0.92	--	--	--

K_s' aparente

μ_{\max}^{\wedge} μ_{\max} aparente

Se observa que al disminuir la a_w , los valores de K_s aparente aumentan , esto se puede deber a que la utilización del sustrato es menos eficiente, ya que el transporte de éste se modifica cuando los microorganismo se encuentran en medios con a_w baja (Rose 1977) . Los valores de μ_{\max} aparente disminuyeron al modificar la a_w , lo que puede deberse a que el crecimiento de los microorganismos esta siendo afectado por el proceso de incorporación del sustrato, por la modificación de las vías metabólicas utilizadas normalmente por los microorganismos, o por la activación de mecanismos de adaptación al medio sintetizando osmorreguladores, para mantener el equilibrio osmótico (Gervais y col., 1988).

3.2.2. Tipo de inhibición en la fermentación a diferentes a_w . Para tratar de entender la respuesta de una población microbiana a un inhibidor del crecimiento y con la idea de plantear con mayor claridad los resultados, sin perder de vista las restricciones que esto implica, se hizo referencia a una teoría simple la cual se basa en una analogía con la cinética de inhibición enzimática. En este enfoque se considera que los microorganismos se comportan como una enzima que reacciona con un sustrato que limita su crecimiento (Pirt, 1975). Para determinar el tipo de inhibición se probaron únicamente los modelos de inhibición competitiva y no competitiva utilizados en cinética enzimática. El modelo que más se ajustó a los resultados obtenidos fué el de inhibición no competitiva, en este se describe que el inhibidor puede combinarse con la enzima libre o con el complejo enzima sustrato, modificando el destino de ambos por la formación de dos especies inactivas EI y ESI, que participan en dos equilibrios químicos diferentes que se describen mediante dos constantes de inhibición: la del complejo enzima-inhibidor (K_{EI}) y la del complejo enzima-sustrato inhibidor (K_{ESI}). La ecuación diferencial utilizada fué la siguiente:

$$r_R = \frac{\left[\frac{q_s}{1 + L(I)} \right] (X)(S)}{K_S \left[\frac{1 + N(I)}{1 + L(I)} \right] + S} \quad (\text{ecuación 17})$$

r_R = velocidad de formación de productos

$$1/L = K_{ESI}$$

$$1/N = K_{EI}$$

(Levenspiel, 1989)

Para determinar el coeficiente metabólico (q_s) se dividió μ_{max} entre el rendimiento (0.1)

El valor de L se determinó realizando una regresión lineal entre q_s/q_s^{\wedge} (q_s^{\wedge} = q_s aparente) y la concentración del etilenglicol (I), el valor de la pendiente fué L (ecuación 18).

$$q_s/q_s^{\wedge} = 1 + L(I) \quad (\text{ecuación 18})$$

Para determinar el valor de N se realizó una regresión lineal entre los valores de $(K_s/K_s')(1+L(I))$ y la concentración de etilenglicol (I), el valor de la pendiente fue N (ecuación 19).

$$\frac{K_s}{K_s'} = \frac{1 + N(I)}{1 + L(I)} \quad (\text{ecuación 19})$$

$K_s' = K_s$ aparente.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: el valor de N fué de 0.010266 l/mmol, el recíproco corresponde a la constante de inhibición enzima-inhibidor (K_{iEI}) y fué de 97.4089 mmol / l.; el valor de L fué de 0.000272 l/mmol, el recíproco corresponde a la constante de inhibición enzima sustrato inhibidor (K_{iESI}) y fué de 3.676×10^3 mmol / l.

La disminución de la actividad de agua en el medio de cultivo provocó cambios en el comportamiento cinético que pueden ser evaluados mediante este modelo. La inhibición puede ser a dos niveles, a) modificando el metabolismo de los microorganismos, para transformar el sustrato y reproducirse, por cambios en las vías metabólicas ó por la síntesis de osmorreguladores para mantener el equilibrio osmótico y b) cuando altera su entorno afectando la incorporación del sustrato.

La ecuación resultante para evaluar la velocidad de formación de producto en la fermentación líquida de glucosa con líquido ruminal, en función de la concentración de etilenglicol fué la siguiente:

$$r_R = \frac{\left[\frac{0.62}{1 + (0.010266)(I)} \right] (X)(S)}{1.033 \left[\frac{1 + 0.010266(I)}{1 + 0.000272(I)} \right] + S} \quad (\text{ecuación 20})$$

Para conocer el tipo de inhibición que tiene la disminución de la a_w en la fermentación en medio líquido sería necesario realizar más pruebas con otros solutos que disminuyan la a_w .

Se realizó una fermentación investigar si la disminución en la actividad microbiana fué debido al efecto de la a_w , o a las propiedades tóxicas del etilenglicol. Se inoculó un medio de cultivo con L.R. a una a_w de 0.92, después de 20 horas de cultivo se centrifugó y fué transferido a un medio sin el depresor de la a_w , obteniéndose una a_w de 0.981, esto se puede observar en la Figura 3.9

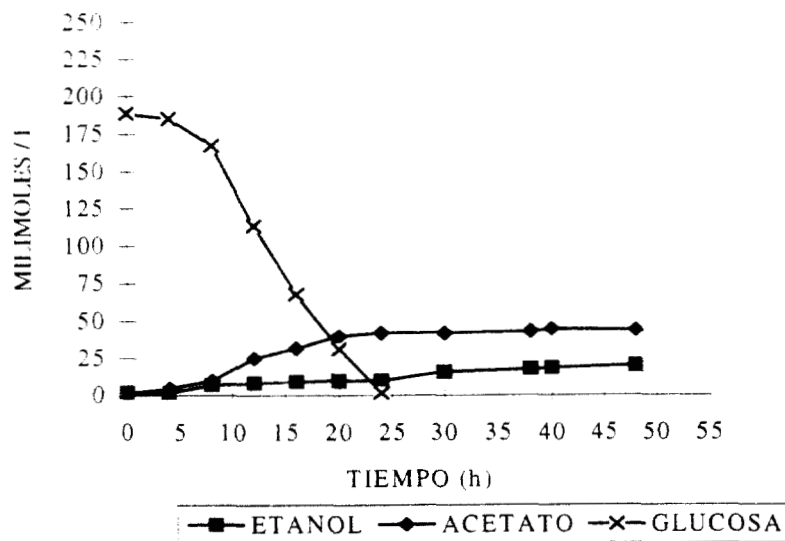


Figura 3.9 Fermentación líquida con glucosa a a_w de 0.981-0.978.

Se observa que hubo un efecto sobre el metabolismo de los microorganismos, ya que en esta fermentación los productos fueron acetato y etanol. La glucosa se consumió completamente en 25 horas, esto refleja un cambio en la velocidad de incorporación del sustrato. El disminuir la a_w hasta niveles de 0.92 no tuvo un efecto bactericida para la mayoría de la población microbiana (Plitman y col., 1973), pero si afectó el metabolismo de éstos pues no se encontraron los mismos productos que en la fermentación con a_w de 0.996 (control Figura 3.5) y además los productos formados no fueron equivalentes a las concentraciones estequiométricamente esperadas .

3.3. Fermentación en medio sólido. En la fermentación en medio sólido (o seca) la disponibilidad de agua es particularmente importante, ya que ésta afecta principalmente el transporte y consumo del sustrato, la difusión y distribución a través de los microorganismos y modifica su metabolismo (Gosh y Lall, 1988; Gervais y col., 1986)). El agua en este tipo de fermentaciones actúa en mayor proporción como reactivo en las reacciones bioquímicas (Hahn-Hägerdal, 1986).

3.3.1. Fermentación en medio sólido con líquido ruminal como inóculo. Con el propósito de establecer las condiciones de cultivo para la fermentación en medio sólido, se realizaron fermentaciones variando el tamaño de inóculo con niveles de 40 a 80 mg de SSV (sólidos suspendidos volátiles)/g peso seco, con y sin la adición, de medio de cultivo y bicarbonato y se observó que se podían obtener velocidades de producción mayores de ácidos grasos volátiles (AGV) con niveles de inóculo superiores, medio de cultivo y la adición de bicarbonato.

Para determinar el nivel de inóculo para la fermentación en medio sólido se realizaron dos fermentaciones con 151.5 y 120 mg SSV/g peso seco, las condiciones de cultivo se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Condiciones de cultivo en la fermentación con líquido ruminal al variar el tamaño de inóculo.

FERMENTACION	INOCULO	pHi - pHf	Hi - Hf	ETILENGLICOL	$a_{w,i}$ - $a_{w,f}$
	mg SSV / g peso seco		%	milimoles / g peso seco	
1	151.5	7.5 - 7	81 - 84	0	0.981 - 0.982
2	120	7.5 - 7.6	80 - 83	0	0.982 - 0.983

SSV = Sólidos suspendidos volátiles; pHi = pH inicial; pHf = pH final; Hi = humedad inicial; Hf = humedad final; $a_{w,i}$ = actividad de agua inicial; $a_{w,f}$ = actividad de agua final.

Se observan en las Figuras 3.10 y 3.11 los resultados de ambas fermentaciones.

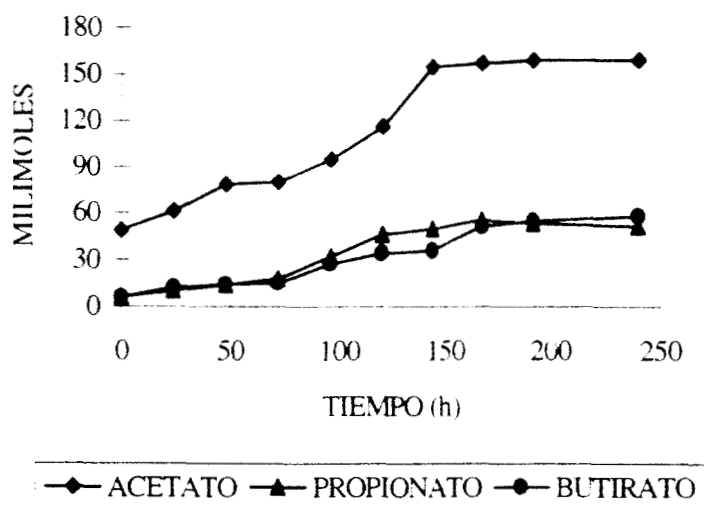


Figura 3.10. Fermentación sólida con 151.5 mg de SSV/g peso seco, a_w 0.981-0.982, la producción de los ácidos grasos volátiles fué por 100 g de peso seco.

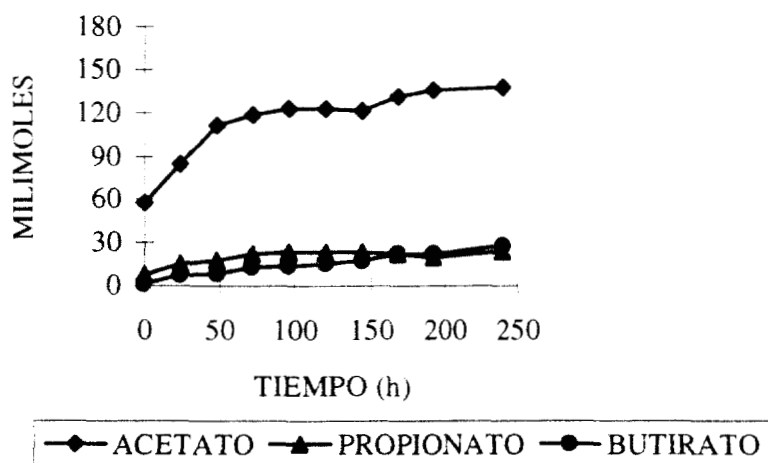


Figura 3.11. Fermentación sólida con 120 mg de SSV/g peso seco a_w 0.982-0.983, la producción de los ácidos grasos volátiles fué por 100 g de peso seco.

Las velocidades de formación de acetato en la fase exponencial en ambos casos, fué 0.6409 y 0.5432 mmoles/100 g peso seco*hora. Las velocidades para propionato y butirato fueron mayores con 151.5 mg de SSV/g peso seco. Los resultados se observan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Velocidades de producción de los ácidos grasos volátiles.

FERMENTACION	$a_{w,i}$ $a_{w,f}$	ACETATO	PROPIONATO	BUTIRATO
		mmoles x 100/ g peso seco*h		
1	0.981-0.982	0.6409	0.4652	.2511
2	0.982-0.983	0.5432	0.1571	.1270

Para conocer el rendimiento teórico de la producción de acetato metano y CO₂ se empleó la composición del lirio acuático.

Los rendimientos obtenidos de la conversión a acetato se observan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Conversión a acetato a partir de lirio acuático.

Fermentación	Producción de acetato teórica milimoles/100 g peso seco	Producción de acetato obtenida milimoles/100 g peso seco	% de rendimiento
1	544.5	160	29.41
2	544.5	138	25.40

En la Figura 3.10 se observó que a las 150 horas de cultivo, la formación de los ácidos grasos volátiles (AGV) cesó debido quizá a que las concentraciones fueron de 571 milimoles/l, calculadas a partir del contenido de humedad. Los niveles reportados como inhibitorios para la hidrólisis fueron de 300 a 500 milimoles/l (De Baere y col, 1985). Para la fermentación 2 la producción de ácidos grasos volátiles fue de 452 milimoles/l.

La acumulación principalmente de acetato pudo deberse a la escasa población de bacterias metanogénicas acetoclásticas (Smith y Mah, 1966). Observaciones realizadas en el microscopio mostraron algunas bacterias del género de *Methanosarcina*, las que parecen tener una baja afinidad para el acetato con Km del orden de 5 mM (Guyot, 1990)

La producción de metano fue mínima, esto debido quizá a que en el líquido ruminal se encuentran mayormente poblaciones de microorganismos hidrolíticos (celulolíticos y hemicelulolíticos) y bacterias acidogénicas (Annison y col., 1981) y probablemente también a las condiciones de cultivo.

En la fermentaciones 1 y 2 se obtuvieron por 100 g de peso seco 8.3875 y 7.3875 l de biogas con 20% de metano, que corresponden a 68.5 y 60.3 milimoles de metano, está

representó un 6.6 % del teórico esperado de 1043.75 milimoles de metano (Monroy y col., 1988).

La hidrólisis de la fracción orgánica no soluble del lirio acuático, como paredes celulares, mostró la falta de ésta, ya que se han reportado valores del 66 % (Chandler y col., 1980), estos resultados se pueden observar en la Tabla 3.7. Esto probablemente se debió a las propiedades refractarias de ciertos componentes del lirio como la lignina o a la inhibición por las concentraciones altas de los ácidos grasos volátiles formados (Chynoweth, 1982).. Los cálculos realizado se encuentran en el Apéndice 5.4.

Tabla 3.7. Hidrólisis del lirio acuático por fermentación.

FERMENTACION	PAREDES CELULARES	FIBRA DETERGENTE ACIDA
	%	%
1	11.39	26.8
2	10.24	21.53

La hidrólisis de la celulosa fué mayor, ya que la fibra detergente neutra (FDA) mostró un porcentaje del 26.8, este valor fué muy cercano a los reportados (Chandler, 1980), debido quizá a la acción de las bacterias celulolíticas presentes en el líquido ruminal, esto significó que hubiera disponible sustratos de más fácil consumo por los microorganismos lo que resulta benéfico para la fermentación, aunque ésto condujo a la rápida producción de AGV y por lo tanto a su acumulación, esto es una desventaja en la digestión seca donde los sustratos están más concentrados (Gosh, 1984)

Para descartar el hecho de que el inóculo utilizado pudiera interferir en los resultados obtenidos, ya que se pudieron formar los AGV de la materia orgánica presente en él, se realizó la determinación de carbono orgánico total (COT) al inóculo, este fué de 1830 mg de COT/ l., esta cantidad de materia orgánica es mínima para que a partir de ella se produzcan los ácidos grasos volátiles, por ejemplo en la fermentación 1 se utilizaron 4.5 ml de inóculo/g lirio seco, esto corresponde a 8.235 mg COT/ l, considerando la conversión de glucosa a ácido acético se obtendrían 22.1 milimoles por 100 g peso seco.

Se realizó también un testigo que contenía únicamente el inóculo (líquido ruminal), que se incubó durante 280 horas, observándose que no se producían acetato ni propionato únicamente se formó butirato, probablemente de la materia orgánica que estaba presente en él, los resultados se muestran en la Figura 3.12.

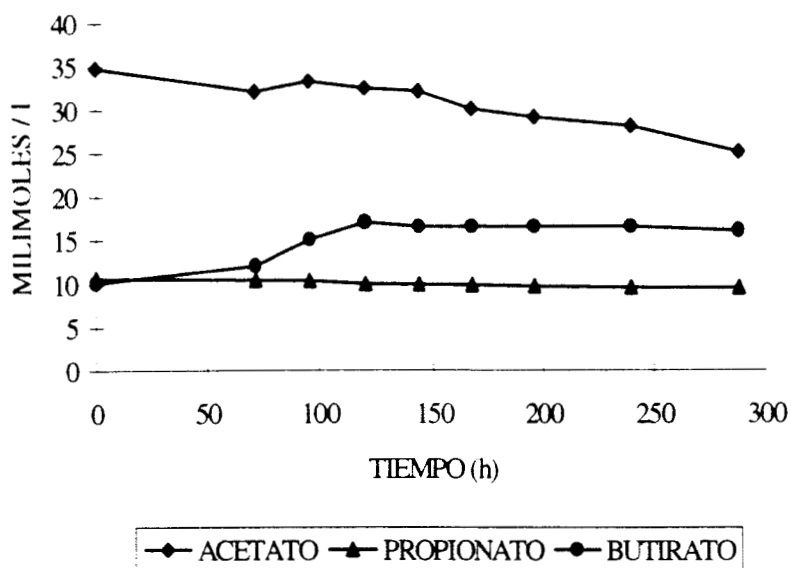


Figura 3.12. Producción de ácidos grasos volátiles de la fermentación con líquido ruminal (Testigo).

Se realizaron 4 fermentaciones a diferentes a_w con el fin de conocer el efecto que tenía ésta sobre la fermentación sólida del lirio acuático. El nivel de inóculo elegido fué el de 120 mg de SSV/g de peso seco, debido a que después de las 150 horas de fermentación la producción de acetato continua, como se observa en la Figura 3.11, ya que con 151.5 mg de SSV/g de peso seco de inóculo se observó que después de ese tiempo de fermentación cesó la formación de acetato, como se observa en la Figura 3.10.

En la Tabla 3.8 se presentan las condiciones de cultivo para la fermentación con lirio y líquido ruminal variando la a_w .

Tabla 3.8. Condiciones de cultivo en la fermentación con líquido ruminal al variar la actividad de agua (a_w).

FERMENTACION	INOCULO mgSV/g peso seco.	pHi - pHf	Hi - Hf %	ETILENGLICOL milimoles/g peso seco.	$a_{w,i}$ $a_{w,f}$
3	120	7.6 - 7.6	84 - 81	0	0.980 - 0.978
4	120	7.3 - 7.0	82 - 80	4.144	0.971 - 0.974
5	120	7.2 - 7.4	81 - 83	9.278	0.963 - 0.964
6	120	7.8 - 7.9	80 - 82	18.558	0.940 - 0.942

En la Figura 3.13 se presentan los resultados de las producciones de acetato a diferentes a_w de agua. La fermentación 3 fué un control, sin etilenglicol, con una $a_{w,i}$ de 0.98, se observa que la producción de acetato empieza a declinar a a_w de 0.963 y en 0.94 se observa que no hubo formación significativa de este compuesto.

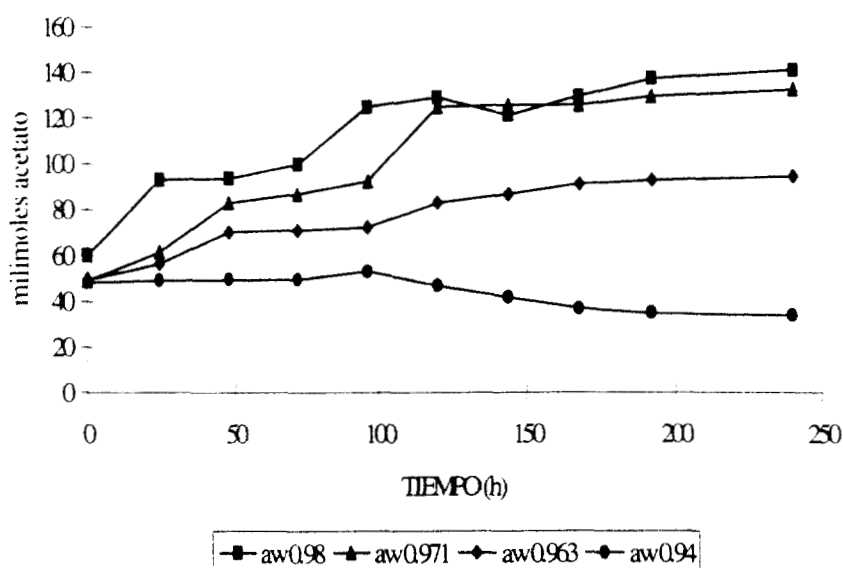


Figura 3.13. Producción de acetato en la fermentación sólida del lirio acuático (100 g de peso seco) a diferentes a_w

Las velocidades de producción de acetato empiezan a disminuir cuando la disponibilidad de agua desciende excepto para la fermentación a $a_{w,i}$ de 0.971 que fué mayor que la de 0.98 (control). Con respecto a las velocidades de producción del propionato se observó que

fueron mayormente afectadas cuando la a_w disminuyó. Los resultados de las velocidades de producción se observan en la Tabla 3.9

Tabla 3.9. Velocidades de producción de los ácidos grasos volátiles.

FERMENTACION	ETILENGLICOL milimoles / g peso seco	$a_{w,i}$ $a_{w,f}$	ACETATO mmoles / 100 g peso seco*h	PROPIONATO	BUTIRATO
3	0	0.980 - 0.978	0.5345	0.2447	0.0760
4	4.144	0.971 - 0.974	0.5665	0.1251	0
5	9.278	0.963 - 0.964	0.2435	0.0498	0
6	18.558	0.940 - 0.942	0.0	0.0	0.0

El butirato no se pudo cuantificar, sin embargo cabe suponer que su concentración no fué significativa.

Los rendimientos de la producción de acetato con respecto al teórico esperado se muestran en la Tabla 3.10

Tabla 3.10. Conversión a acetato a partir de lirio acuático.

Fermentación	Producción de acetato obtenida milimoles acetato/100g peso seco	% de rendimiento
3	141.6	26.01
4	133.0	24.5
5	95.0	17.45
6	0.0	0.0

Esta disminución en la producción de ácidos grasos volátiles, principalmente en la de acetato, indica que el metabolismo de los microorganismos está afectado, ya que el etilenglicol en el medio de cultivo podría estar formando esferas de hidratación con el agua, por lo que el agua disponible en los capilares de la fibra del lirio disminuye, concentrando los productos y los solutos presentes en él, provocando que la presión osmótica en el medio aumente, y repercuta en la difusión de los sustratos y por lo tanto en su metabolismo (Gervais y col., 1986).

La digestión anaerobia seca del lirio acuático con líquido ruminal como inóculo se pudo llevar a cabo a a_w de 0.983 a 0.963 que corresponden a un intervalo de humedad observados en la curva de adsorción-desorción del lirio (Figura 3.4), del 80 al 50 %, por lo que abajo de este valor no sería conveniente realizar la fermentación.

3.3.2. Fermentación en medio sólido con líquido ruminal y lodos anaerobios como inóculo. Para evitar que los ácidos grasos volátiles se acumularan se utilizaron lodos anaerobios, además del líquido ruminal. Los lodos fueron adicionados a las 88 horas de cultivo, con el fin de que las bacterias metanogénicas no perdieran su actividad, o ésta se viera afectada para la producción de metano. Se realizaron 4 fermentaciones, en la Tabla 3.11 se presentan condiciones de cultivo.

Tabla 3.11. Condiciones de cultivo de la fermentación con líquido ruminal y lodos anaerobios

FERMENTACION	INOCULO		pHi - pHf	Hi - Hf %	ETILENGLICOL milimoles /g peso seco.	$a_{w,i}$ - $a_{w,f}$
	LR	LAN				
	mg SV. / g. peso seco					
7	67.46	47.22	8 - 8.2	85 - 86	0	0.99 - 0.988
8	60	45.3	7.3 - 7.4	85	5.387	0.976 - 0.971
9	60	42	8.15 - 7.3	85 83.7	6.450	0.968 - 0.967
10	67.35	42.18	7.14 - 6.7	87 - 88	8.977	0.955 - 0.962

Los resultados de la fermentación 7 se muestran en la Figura 3.14, está fué un control con $a_{w,i}$ de 0.99, se observó que a las 96 horas hubo una producción máxima de acetato de 100 milimoles que luego desciende hasta 50, indicando que el acetato no se acumuló sino parece que fué utilizado por las bacterias metanogénicas para producir metano.

La reacción estequiométrica para la producción de metano a partir de acetato indicó que el 50% del metano producido fué a partir de acetato, el resto pudo ser formado por la oxidación del hidrógeno en presencia del dióxido de carbono como aceptor de electrones (Guyot, 1990).

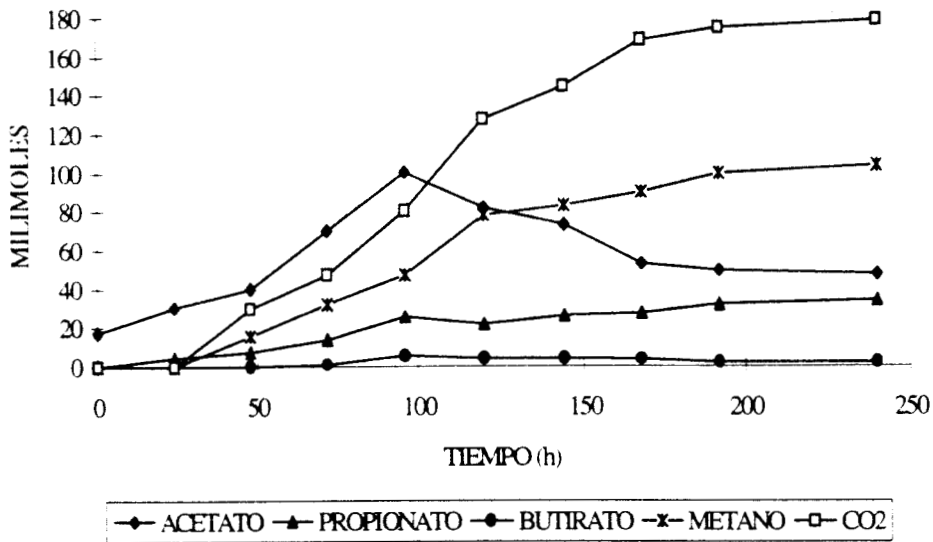


Figura 3.14. Fermentación sólida con líquido ruminal y lodos anaerobios, a_w 0.99, la producción de los ácidos grasos volátiles fué por 100 g de peso seco.

Con respecto al biogas se obtuvieron 10.400 l/100 g de peso seco, donde el metano formado correspondió al 32%. Estos valores comparados con los obtenidos por fermentación en medio sólido por otros autores fueron menores.

La hidrólisis de las paredes celulareras en ésta fermentación fue de 15.7 % y de celulosa fue del 21 %. De manera similar que en la fermentación con el líquido ruminal, la hidrólisis de las paredes celulares no se llevó a cabo completamente. Los cálculos que se realizaron se encuentran en el Apéndice 5.4.

En la Figura 3.15, con a_{wi} de 0.976 se observa que el acetato se acumula hasta niveles de 120 milimoles por lo tanto la producción de metano fué casi nula.

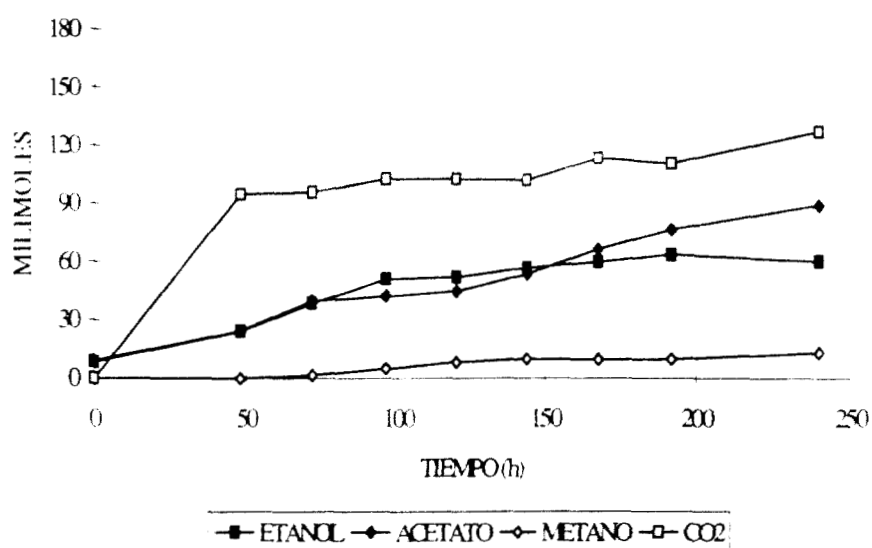


Figura 3.15. Fermentación sólida con líquido ruminal y lodos anaerobios, a_w 0.976-0.971, la producción de los ácidos grasos volátiles fué por 100 g de peso seco.

La acumulación del etanol indicó que la microflora metanogénica hidrogenoflica se hallaba de alguna forma afectada de lo contrario se consumiría el hidrógeno y desplazaría el metabolismo hacia productos más oxidados como el acetato (Garcia, 1991).

En la fermentación 9 con una a_{wi} de 0.968, se observó que no hubo producción de metano y la producción de acetato disminuyó, así como la del CO_2 . Esto indicó que la población metanogénica estaba fuertemente afectada por la disminución de la a_w . Los perfiles de la fermentación se muestran en la Figura 3.16.

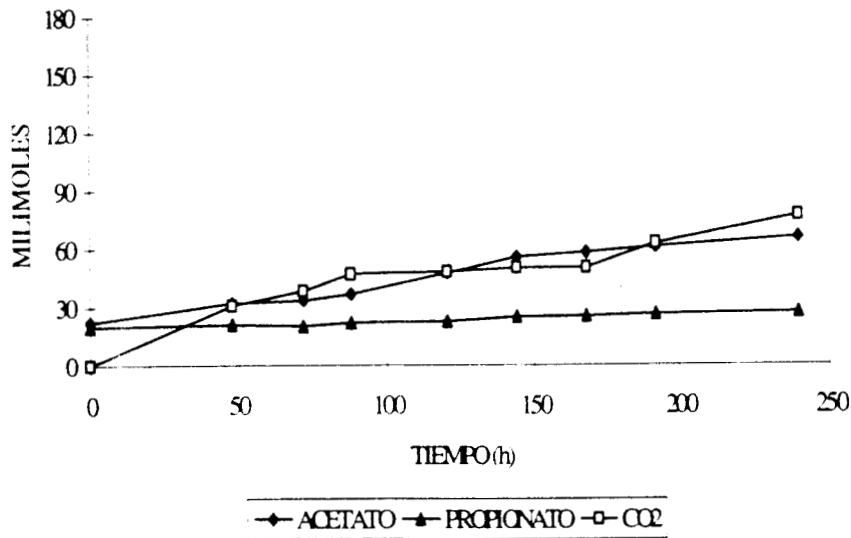


Figura 3.16. Fermentación sólida con líquido ruminal y lodos anaerobios, a_w 0.968-0.967, la producción de los ácidos grasos volátiles fué por 100 g de peso seco.

Se observa en la Figura 3.17, a_w de 0.955-0.966, que tampoco hubo producción de metano y la de acetato se redujó.

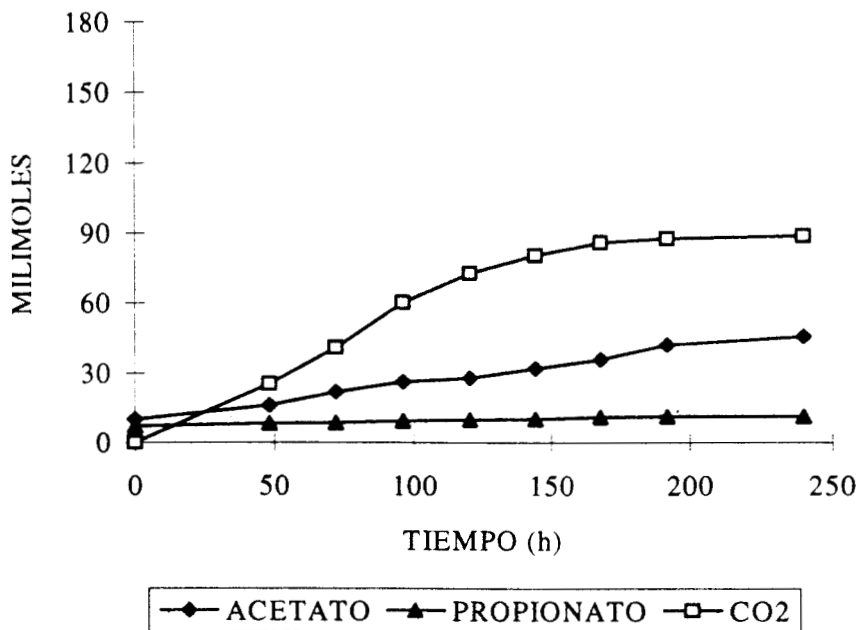


Figura 3.17. Fermentación sólida con líquido ruminal y lodos anaerobios, a_w 0.955 - 0.966, la producción de los ácidos grasos volátiles fué por 100 g de peso seco.

Se realizó un testigo con lodos anaerobios, los resultados se muestran en la Figura 3.18, se observó que no hubo producción de ácidos grasos volátiles ni metano.

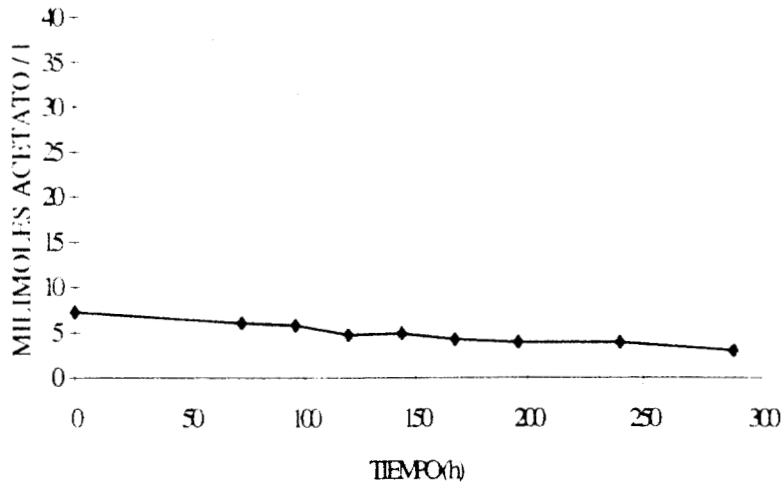


Figura 3.18. Producción de acetato de la fermentación con lodos anerobios. (Testigo).

Las velocidades de producción de los ácidos grasos volátiles, metano y CO_2 se muestran en la Tabla 3.12, se observa que éstas disminuyeron considerablemente al variar la a_w . La velocidad de producción de metano desciende de 0.515 a 0.068 milimoles al disminuir la a_w de 0.99 a 0.976. Las velocidades de producción de acetato disminuyeron, aunque su descenso no fué tan marcado, esto reflejó que la producción de metano es más sensible a los cambios de a_w .

Tabla 3.12. Velocidades de producción de los ácidos grasos volátiles, metano y CO₂

FERMENTACION	ETILENGLICOL	$a_{w,i} - a_{w,f}$	ACETATO	PROPIONATO	METANO	CO ₂
	milimoles / g peso seco.		mmoles/ 100 g peso seco*h			
7	0.0	0.99 - 0.988	0.8540	0.1271	0.515	0.9144
8	5.387	0.976 - 0.971	0.3573	0.0	0.068	0.8235
9	6.450	0.968 - 0.967	0.1835	0.0284	0.0	0.2050
10	8.977	0.955 - 0.962	0.1425	0.02172	0.0	0.4825

La disponibilidad de agua en el medio fué determinante para la producción de acetato y metano, esto pudo deberse a que el metabolismo de las bacterias acetogénicas y metanogénicas fué afectado, ya sea por la concentración del sustrato y sales minerales en el medio, o por la disminución en el transporte de éstos, puesto que el agua disponible aumenta la velocidad de difusión de los sustratos y de los productos hidrolizados o formados, hacia los microorganismos. Cuando la a_w disminuye, el potencial de agua disminuye también, y los microorganismos previenen la salida pasiva del agua, adaptando su potencial de agua interno y sintetizando otros metabolitos que actúan como osmorreguladores (Van Zyl, 1990; Gervais y col., 1986; Measure, 1975). La fermentación sólida con líquido ruminal y lodos anaerobios como inóculo se puede llevar a cabo en intervalos de a_w de 0.99-0.98 que corresponden al intervalo de humedad del 85 al 80 % en la curva de adsorción-desorción (Figura 3.4), hasta a_w de 0.976 que corresponde a 60 % de humedad, y a valores menores no se produjo, observándose que la disponibilidad de agua es muy importante y que la población metanogénica se inhibe a a_w de (0.968). Estos resultados concordaron con los reportados por Wujcik y Jewell (1980), que reportan que a humedades del 65 al 70% es afectada la formación la de metano.

3.3.3. Determinación de la constante de velocidad de primer orden de consumo de sustrato.

Las constantes de velocidad se obtuvieron con el modelo de consumo de primer orden para reactores en lote. Este modelo ha sido utilizado para describir el proceso de la fermentación seca (Wujcik y Jewell, 1980).

$$dS/dt = -kS \text{ (ecuación 1)}$$

donde:

S = concentración de sólidos volátiles biodegradables (SVB).

k = coeficiente de la tasa de eliminación del sustrato (tiempo⁻¹).

La ecuación integrada:

$$S = S_0 e^{-kt} \text{ (ecuación 2)}$$

donde:

S₀ = concentración inicial de sólidos volátiles consumibles.

Arreglando y tomando logaritmo natural a ambos lados de la ecuación.

$$\ln(S/S_0) = -kt$$

Para obtener los valores de k, se graficó ln(S/S₀) en función del tiempo, los cálculos realizados se encuentran en el Apéndice 5.5. El valor de k representa la tasa de consumo de sustrato, en éste caso de celulosa.

En la Figura 3.19 se graficaron los valores obtenidos de k del lirio en función de las diferentes a_w, cuando se utilizó líquido ruminal como inóculo. Se observa que la curva sigue un comportamiento exponencial por lo que se ajustó a la siguiente ecuación:

$$k = \alpha e^{\beta a_w}$$

donde α y β son constantes de la ecuación empírica.

$$\ln K = \ln \alpha + \beta a_w$$

Se graficaron los valores de a_w contra $\ln k$ para encontrar los valores de α y β . El coeficiente de regresión fué de 0.98 y se observa que el comportamiento de la utilización de sustrato en función de la a_w fué exponencial, los datos ajustados también se graficaron en la Figura 3.19.

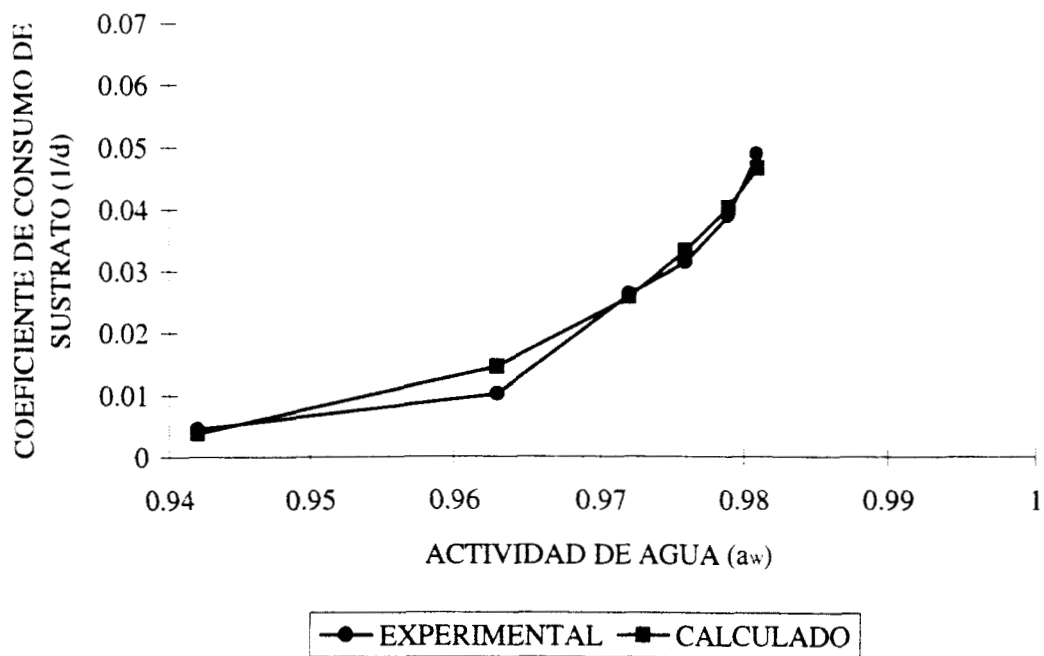


Figura 3.19. Velocidades de consumo de sustrato en la fermentación en medio sólido con líquido ruminal como inóculo, a diferentes actividades de agua.

En la Figura 3.20 se graficaron los valores obtenidos de k en función de las diferentes a_w y los valores ajustados a la ecuación exponencial, cuando se utilizó como inóculo líquido ruminal y lodo metanogénico. Se observó también que el coeficiente de consumo disminuye exponencialmente cuando la a_w disminuye.

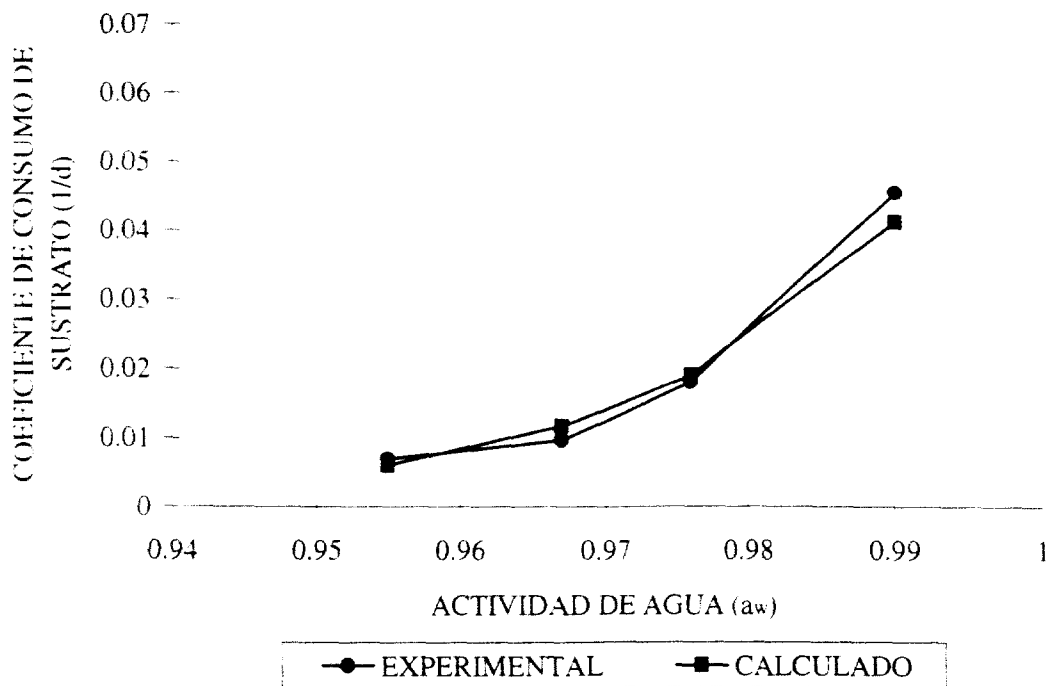


Figura 3.20. Velocidades de consumo de sustrato en la fermentación en medio sólido con líquido ruminal y lodos anaerobios como inóculos, a diferentes actividades de agua.

Los dos inóculos utilizados, líquido ruminal y lodos anaerobios y líquido ruminal presentan apreciables diferencias microbiológicas, al descender la a_w hasta el valor de 0.965, éstas se manifiestan en los diferentes valores de los coeficientes de consumo de sustrato (k), sin embargo abajo de este valor los coeficientes son similares., posiblemente debido a la sensibilidad del consorcio metanogénico al contenido de agua disponible.

El hecho de que el coeficiente de consumo a diferentes a_w tuviera un comportamiento exponencial, indicó que a pequeñas variaciones de la a_w el consumo de sustrato se ve considerablemente afectado.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

222861

4.1 Conclusiones

1. Al disminuir la a_w , la fermentación en medio líquido mostró cambios en el consumo de sustrato y en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV).

1.1. Al disminuir los valores de a_w de 0.996 a 0.941, las tasas globales de consumo de sustrato descendieron, llegando incluso a anularse a un valor de a_w de 0.92.

1.2. A un valor de a_w de 0.941 el sustrato todavía alcanzó a consumirse totalmente, sin embargo, ya no se observó producción de AGV ni variación global de la actividad de agua en la fermentación.

2. Al disminuir la a_w en la fermentación en medio líquido, se modificaron la constante aparente de saturación de sustrato (K_s) y la velocidad máxima aparente de crecimiento (μ_{max}).

3. En la digestión anaerobia en medio sólido del lirio acuático con líquido ruminal como inóculo, las tasas de producción de AGV no mostraron cambios al disminuir la a_w en el intervalo de 0.982 a 0.971, abajo de ese valor se observó una considerable disminución y a partir de 0.94 no hubo formación de productos de fermentación.

4. En la digestión anaerobia en medio sólido de lirio acuático con líquido ruminal y lodos anaerobios como inóculos, al disminuir la a_w en el intervalo de 0.99 a 0.955 las tasas de producción de AGV descendieron. Las tasas de formación de metano presentaron una mayor sensibilidad a los cambios de a_w en el intervalo de 0.99 a 0.976 y por debajo de este valor no se observó producción de metano.

5. Al disminuir la a_w en la fermentación en medio sólido, los coeficientes de consumo de sustrato descendieron considerablemente.

5.1 Los coeficientes de consumo de sustrato para ambos inóculos descendieron exponencialmente al disminuir los valores de a_w , sin embargo, en el intervalo de 0.981 a 0.965 los valores de los coeficientes fueron mayores cuando se utilizó únicamente líquido ruminal, por debajo de este valor no se observaron diferencias apreciables.

6. Para la formación de AGV es posible llevar a cabo favorablemente la fermentación en medio sólido del lirio acuático a valores de a_w en el intervalo de 0.98 a 0.963, los cuales corresponden a humedades del 80 al 50% sin embargo, para la producción de metano el intervalo es mas estrecho, 0.99 a 0.976 y estos corresponden a valores de humedad del 85 al 65%.

4.2.Recomendaciones.

1. Para evaluar el efecto sobre las tasas de consumo de sustrato y producción de metabolitos al disminuir la actividad de agua en el medio de cultivo, se podrían utilizar otras sustancias que se encuentran reportadas en la literatura, tales como sales inorgánicas, glicerol y sorbitol.

2. A fin de tener mayor información sobre el efecto de la actividad de agua en la digestión anaerobia, habría que considerar la utilización de otros inóculos tales como los consorcios sulfatorreductores e inóculos estabilizados a ciertos sustratos.

3. Al modificar la actividad de agua de los medios de fermentación, se observaron las respuestas inmediatas de poblaciones microbianas muy heterogéneas, estas respuestas pueden cambiar en el transcurso del tiempo, si es que se logra inducir un cambio en la distribución poblacional de los consorcios microbianos utilizados como inóculos. Se recomienda considerar lo anterior para tener la certeza de no estar observando una respuesta transiente a los cambios en la actividad de agua.

4. Se podrían emplear otras ecuaciones e incluso modelos para predecir los valores de a_w en el medio de fermentación de lirio acuático.

5. APENDICES

5.1 Solución de vitaminas y oligoelementos:

5.1.1. Solución de vitaminas

Compuesto	g/l
Biotina	0.0020
Acido fólico	0.0020
Piridoxina	0.0100
Tiamina	0.0050
Riboflavina	0.0050
D. L. ácido pantoténico	0.0050
Vitamina B12	0.0001
Acido p-amino benzoico	0.0050
Acido lipóico	0.0050

5.1.2. Solución de oligoelementos:

Preparar una solución con 1.5 g de ácido nitrilo triacético en 950 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.5 con una solución de KOH y aforar a un litro

Compuesto	g/l
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.0
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.5
Cloruro de sodio (NaCl)	1.00
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10
Cloruro de cobalto (CoCl_2)	0.10
Sulfato de zinc (ZnSO_4)	0.10
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.01
Sulfato de aluminio y potasio ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$)	0.01
Acido bórico (H_3BO_3)	0.01
Molibdato óxido de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01

5.2 Curvas estándar.

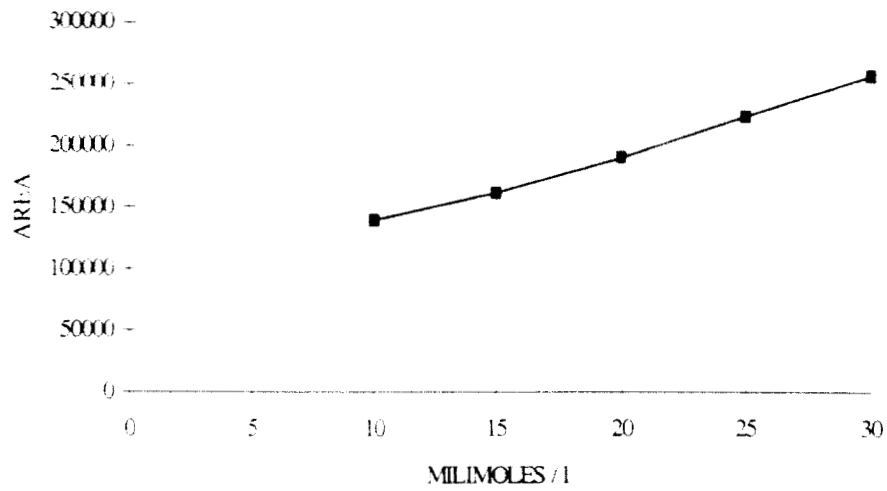


Figura 5.1. Curva estándar de acetato. Coeficiente de correlación $r = 0.998$

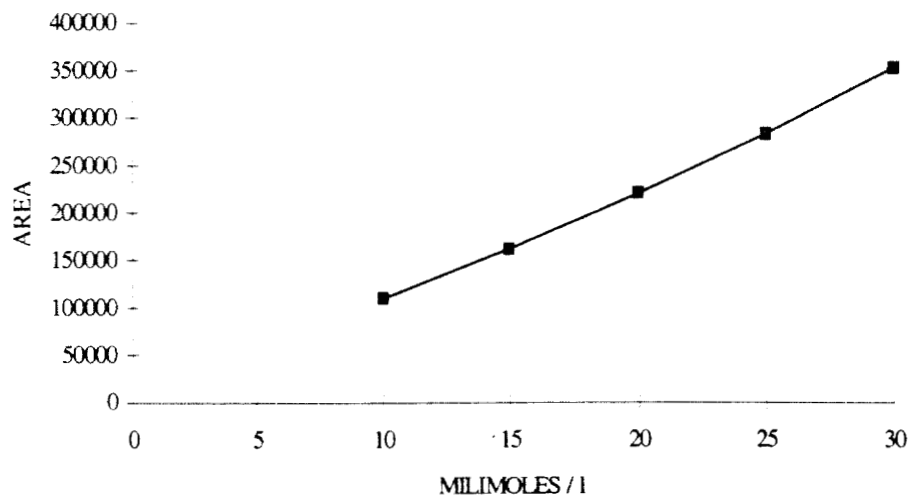


Figura 5.2. Curva estándar de propionato. Coeficiente de correlación = 0.996

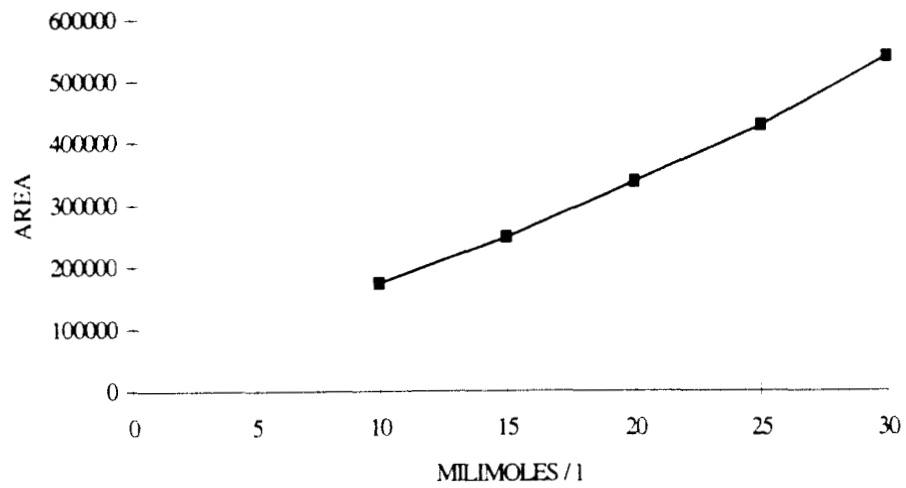


Figura 5.3. Curva estándar de butirato. Coeficiente de correlación = 0.991

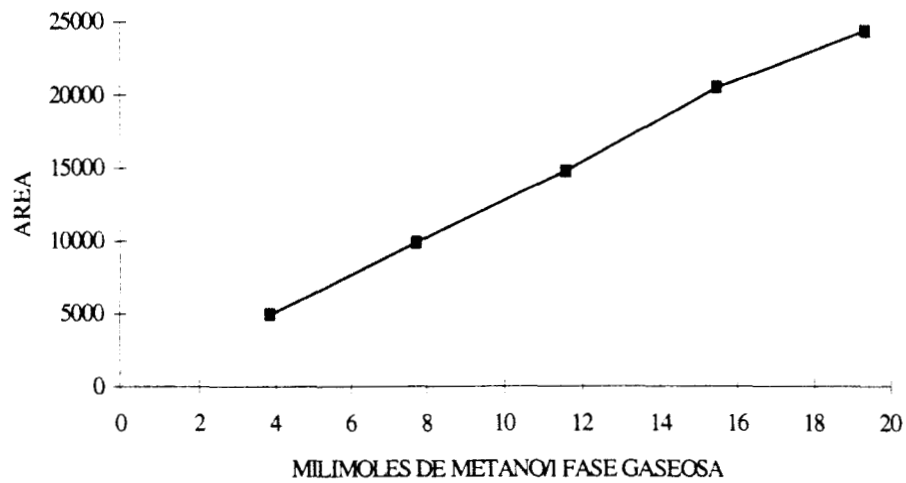


Figura 5.4. Curva estándar de metano. Coeficiente de correlación 0.992

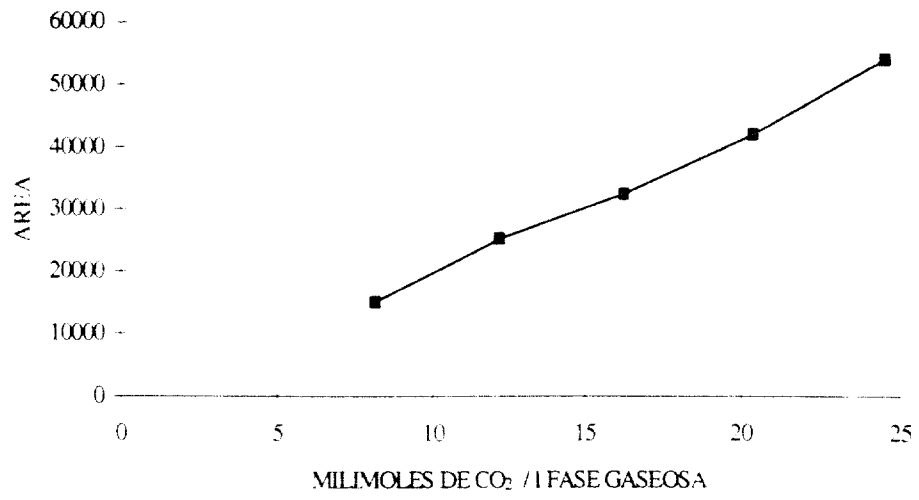


Figura 5.5. Curva estándar de CO₂. Coeficiente de correlación = 0.990.

CALCULO DE LAS CONSTANTES Ks Y μ_{max}						
aw 0.94						
tiempo	sustrato	lnSo/S	X	ln(x/xo)/ln(S/So)		t/lnSo/S
0	43.25		0	2.29	#DIV/0!	#DIV/0!
2	40.97	0.05415714		2.518	1.75255035	36.9295707
6	36.82	0.16095606		2.933	1.53752506	37.277255
10	34.77	0.21824229		3.138	1.44350502	45.8206341
12	33.35	0.25993946		3.453	1.57995096	46.1645952
14	32.6	0.28268495		3.355	1.35097379	49.5250994
16	31.62	0.3132074		3.453	1.31124488	51.0843611
20	23	0.63150302		4.315	1.00323433	31.6704742
22	20.32	0.75539161		4.583	0.91846663	29.1239665
24	18.07	0.87274413		4.808	0.84988183	27.4994689
26	13.4	1.17174253		5.275	0.71212476	22.189175
32	6.12	1.95543514		6.003	0.49283533	16.3646441
36	2.325	2.92327719		6.3825	0.35063663	12.3149457
38	0.55	4.36483423		6.56	0.2411177	8.70594345
40	0.22	5.28112497		6.593	0.20023322	7.57414382
1.54475761 intercepto						
30.0060371 slope						
0.99873639 rsq						
aw.0.965						
tiempo	sustrato	lnSo/S	X	ln(x/xo)/ln(S/So)		t/lnSo/S
0	27		0	2.29	#DIV/0!	#DIV/0!
2	25.6	0.053244		2.43	1.11448125	37.5629179
4	24.7	0.089033		2.52	1.07496191	44.9271618
6	22.85	0.166885		2.705	0.9979932	35.9529017
10	17.4	0.439366		3.25	0.79683721	22.7600679
14	13.1	0.723224		3.68	0.65589767	19.3577647
16	11.3	0.871034		3.86	0.59942019	18.368973
18	8.56	1.148736		4.134	0.51421183	15.6693966
20	5.43	1.603897		4.447	0.41379084	12.4696287
22	2.23	2.493835		4.767	0.29399113	8.82175445
24	0.27	4.60517		4.963	0.1679544	5.21153399
0.63771884 intercepto						
28.5276412 slope						
0.99570444 rsq						

aw0.98						
tiempo	sustrato	lnSo/S	X	ln(x/xo)/ln(S/So)		t/lnSo/S
0	33.97		0	2.29	#DIV/0!	#DIV/0!
2	33.7	0.007979		2.317	1.4690347	250.657977
4	33.4	0.016921		2.347	1.45299328	236.392648
5	33.17	0.023831		2.37	1.44090208	209.810751
8	30.2	0.117635		2.667	1.29555343	68.0069707
10	26	0.267381		3.087	1.11693773	37.3998152
12	20.44	0.507984		3.646	0.9155384	23.6227913
14	15.44	0.788516		4.143	0.75187865	17.7548712
16	12.7	1.026503		4.47	0.65156808	15.5869004
18	8.9	1.339426		4.797	0.55205656	13.4385924
20	0.36	1.795593		5.123	0.44842478	11.1383816
22	0.36	2.378075		5.372	0.35854566	9.25118005
24	0.36	4.547129		5.651	0.19864858	5.27805567
37.7648666 slope						
0.9302067 rsq						
aw0.99						
tiempo	sustrato	lnSo/S	X	ln(x/xo)/ln(S/So)		t/lnSo/S
0	32		0	2.29	#DIV/0!	#DIV/0!
2	30.32	0.053928		2.458	1.31279101	37.0864857
4	27.6	0.14792		2.73	1.18814083	27.0416441
6	24.49	0.267471		3.041	1.06043119	22.4323385
7	21.3	0.407028		3.36	0.9419233	17.1978341
8	18.08	0.570929		3.682	0.83180967	14.0122502
9	15.3	0.737883		3.96	0.74224804	12.1970556
10	12.67	0.926498		4.223	0.66054536	10.7933314
11	9.47	1.217606		4.543	0.56260873	9.03412105
12	6.06	1.664026		4.884	0.45516881	7.21142578
13	0.32	2.115068		5.104	0.37893473	6.14637449
14	0.32	3.325973		5.375	0.25652847	4.20929454
15	0.32	4.60517		5.458	0.18859903	3.25720875
0.05457511 intercepto						
16.170329 slope						
0.99844024 rsq						

5.4.Cálculo de hidrólisis del lirio acuático. (FDN y FDA)

HIDROLISIS DEL LIRIO ACUATICO.
FERMENTACION 1
60 ml de biogás con 20% de metano dan 0.0076 g de metano/ g de lirio y 0.0835 de dióxido de carbono/g de lirio
0.0076 g + .0835g = 0.0911g de biogás (metano+dióxido de carbono)
Paredes celulares inicial (PCi)= 53%
Paredes celulares final (PCf) = 51 %
1 g de lirio +0.151 g de inóculo
$1.151 \times 0.53 = .61003$ inicial
$(1.151 - 0.911) \times 0.51 = 0.5405$ final
$((0.61003 - 0.5405) / (0.61003)) \times 100 = 11.39 \%$
Fibra detergente ácida inicial (FDAi) = 39 %
Fibra detergente ácido final (FDAf) = 31 %
$1.151 \times 0.39 = 0.44889$
$(1.151 - 0.0911) \times 0.31 = 0.32857$
$((0.44889 - 0.32857) / 0.44889) \times 100 = 26.8 \%$
DEGRADACION DEL LIRIO ACUATICO
FERMENTACION 2
50 ml de biogás con 20% de metano dan 0.00633 g de metano/ g de lirio y 0.0694 de dióxido de carbono /g de lirio
0.00633 g + .06964g = .07597g de biogás
Paredes celulares inicial (PCi)= 62.18%
Paredes celulares final (PCf) = 59.87 %
1 g de lirio +0.120 g de inóculo
$1.120 \times 0.6218 = 0.6964$ inicial
$(1.120 - 0.7597) \times 0.5987 = 0.62506$ final
$((0.6964 - 0.62506) / (0.6964)) \times 100 = 10.24 \%$
Fibra detergente ácida inicial (FDAi) = 39.44 %
Fibra detergente ácida final (FDAf) = 33.2%
$1.120 \times 0.3944 = 0.441728$
$(1.120 - 0.7597) \times 0.332 = 0.3466$
$((0.441728 - 0.3466) / 0.441728) \times 100 = 21.53\%$

5.5. Cálculo del coeficiente de consumo de sustrato.

COEFICIENTE DE REMOCION FERMENTACION 1 151.5 mg S.V./g L.S										
AW 0.981										
TIEMPO	S.V.	ACETATO	PROPION	BUTIRAT	AGVt	M.O.	S.Vr	S/So	TIEMPO	ln (S/So)
HORAS		g/100 g				SVx0.66	M.O.-AGVt		HORAS	
0	78.36	2.956	0.4522	0.54	4	51.71	47.7	1	0	0
24	77.8	3.69	0.74	1.09	5.52	51.35	45.8	0.960168	24	-0.040647307
48	77.13	4.745	1.0034	1.253	7	51	44	0.922432	48	-0.080741764
72	77	4.88	1.29	1.34	7.51	50.82	43.31	0.907966	72	-0.096547843
96	74.6	5.72	2.41	2.34	10.47	49.23	38.76	0.812579	96	-0.207542611
120	74.6	7	2.41	2.91	12.32	49.23	37	0.775681	120	-0.254013485
144	74.6	9.32	3.67	3.16	16.15	49.23	33.35	0.699161	144	-0.357873626
168	75	9.5	4.1	4.53	18.13	49.5	31.37	0.657652	168	-0.419079376
192	74.8	9.6	4	4.8	18.4	49.37	30.97	0.649266	192	-0.431912404
240	74.7	9.61	3.8	5.12	18.53	49.3	30.77	0.645073	240	-0.438391209
INTERC	0.028494									
SLOPE	-0.00248									
RSQ	0.971904									
AW 0.979 FERMENTACION 2 120 mg S.V./g L.S.										
TIEMPO	S.V.	ACETATO	PROPION	BUTIRAT	AGVt	M.O.	S.Vr	S/So	TIEMPO	ln (S/So)
HORAS		g/100 g				SVx0.66	M.O.-AGVt		HORAS	
0										
24	83.77	3.45	0.54	0	4	55.2882	51.2882	1	0	0
48	82.9	5.1	1.1	0.65	6.85	54.714	47.864	0.933236	24	-0.06909705
72	82.4	6.7	1.3	0.7	8.7	54.384	45.684	0.890731	48	-0.115712579
96	82.31	7.1	1.68	1.15	9.85	54.3246	44.4746	0.867151	72	-0.142542467
120	82	7.4	1.69	1.18	10.27	54.12	43.85	0.854972	96	-0.156686987
144	81.5	7.4	1.69	1.3	10.4	53.79	43.39	0.846004	168	-0.20308699
168	81	7.3	1.69	1.5	10.5	53.46	42.96	0.83762	192	-0.215049769
192	80.73	7.9	1.62	1.9	11.42	53.2818	41.8618	0.816207	240	-0.235699578
240	80.4	8.15	1.63	1.91	11.7	53.064	41.364	0.806501		
	80.21	8.3	1.72	2.4	12.42	52.9386	40.5186	0.790018		
INTERC										
SLOPE	-0.01944									
RSQ	-0.00161									
	0.925108									
AW 0.98 FERMENTACION 3										
TIEMPO	S.V.	ACETATO	PROPION	BUTIRAT	AGVt	M.O.	S.Vr	S/So	TIEMPO	LN(S/So)
HORAS		g/100 g				SVx0.66	M.O.-AGVt			
0										
24	83.77	3.6	0.5	0.5	4.6	55.2882	50.6882	1	0	0
48	82.9	5.6	1.7	0.8	8.1	54.714	46.614	0.919622	24	-0.083792217
72	82.4	5.64	1.9	0.9	8.44	54.384	45.944	0.906404	48	-0.098269878
96	82.31	6.6	1.9	1.1	9.6	54.3246	44.7246	0.882347	72	-0.126169456
120	82	7.5	1.92	1.3	10.72	54.12	43.4	0.856215	96	-0.155233701
144	81.5	7.76	1.92	1.355	11.035	53.79	42.755	0.84349	120	-0.170206994
168	81	7.3	1.93	1.5	11	53.46	42.46	0.83767	144	-0.177130686
192	81	7.8	1.95	1.51	11.26	53.46	42.2	0.832541	168	-0.183272921
240	81	8.3	1.93	1.52	11.75	53.46	41.71	0.822874	196	-0.194952234
	80.98	8.5	1.9	1.56	11.96	53.4468	41.4868	0.818471	240	-0.200317838
INTERC										

SLOPE	-6.9E-18
RSQ	-0.0013
	0.911354

AW 0.971-0.974 FERMENTACION 4

TIEMPO	ACETATO PROPION BUTIRAT			AGVt	M.O.	S.Vr	S/So	TIEMPO	
HORAS	g/100 g				SVx0.66	M.O.-AGVt		HORAS	
0									
24	83.77	2.95	0.45		3.4	55.2882	51.8882	1	0
48	82.9	3.7	0.46		4.16	54.714	50.554	0.974287	24
72	82.4	5.03	0.615		5.645	54.384	48.739	0.939308	48
96	82.31	5.22	0.925		6.145	54.3246	48.1796	0.928527	72
120	82	5.56	1.2		6.76	54.12	47.36	0.912732	96
144	81.5	7.5	1.5		9	53.79	44.79	0.863202	120
168	81.3	7.56	1.63		9.19	53.658	44.468	0.856996	144
192	81.21	7.6	1.7		9.3	53.5986	44.2986	0.853732	168
240	81.21	7.8	1.8		9.6	53.5986	43.9986	0.84795	196
	81.21	8	1.85		9.85	53.5986	43.7486	0.843132	240

INTERC	
SLOPE	0.000475
RSQ	-0.00109
	0.971234

FERMENTACION 5

AW 0.963-0.964

TIEMPO	ACETATO PROPION BUTIRAT			AGVt	M.O.	S.Vr	S/So	TIEMPO	LN(S/So)
HORAS	g/100 g				SVx0.66	M.O.-AGVt		HORAS	
0									
24	82.56	2.95	0.45		3.4	54.4896	51.0896	1	0
48	82.44	3.4	0.46		3.86	54.4104	50.5504	0.989446	24
72	82	4.23	0.615		4.845	54.12	49.275	0.964482	48
96	81.8	4.27	0.703		4.973	53.988	49.015	0.959393	72
120	81.65	4.36	0.8		5.16	53.889	48.729	0.953795	96
144	81.5	5	0.85		5.85	53.79	47.94	0.938351	120
168	81.3	5.25	0.85		6.1	53.658	47.558	0.930874	144
192	81.21	5.5	0.85		6.35	53.5986	47.2486	0.924818	168
240	81.21	5.6	0.85		6.45	53.5986	47.1486	0.922861	196
	81.2	5.7	0.85		6.55	53.592	47.042	0.920774	240

INTERC	
SLOPE	-0.00694
RSQ	-0.00042
	0.950691

AW 0.942 FERMENTACION 6

TIEMPO	ACETATO PROPION BUTIRAT			AGVt	M.O.	S.Vr	S/So	TIEMPO	LN(S/So)
HORAS	g/100 g				SVx0.66	M.O.-AGVt		HORAS	
0									
24	82	2.9	0.5		3.4	54.12	50.72	1	0
48	81.8	2.95	0.6		3.55	53.988	50.438	0.99444	24
72	81.72	3	1		4	53.9352	49.9352	0.984527	48
96	81.65	3	1.1		4.1	53.889	49.789	0.981644	72

5. REFERENCIAS.

Association of Official Analytical Chemists, (1975). Official Methods of Analysis. 12th Edition, Washington, D.C.

APHA/AWWA/WPCF, (1988). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th Edition, Joint Editorial Board, Washington. DC. U.S.A.

Annison, E.F. y Dyfed L., (1981). El metabolismo en el rumen. Manual UTEHA. México. D.F., pp 10-24.

Akedo, M., Sinskey, A. J., y Gomez, R., (1977). Antimicrobial action of aliphatic diols and their esters. *J. of Food Sci.* **42**:3, 699-701.

Bauchop, T., (1981). The anaerobic fungi in rumen fiber digestion. *Ag. Environ.* **6**:339-348.

Bailey, J. E., y Ollis, D. F., (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd. edition, McGraw-Hill Book Co, NY, México, pp 100-130.

Balch, W. E., y Wolfe, R. S., (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanolsulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:781-791.

Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., y Wolfe R.S., (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, **43**: 260-296.

Beuchat, L.R., (1983). Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeast and molds. *J. Food. Prot.*, **46**:135-141.

Boillot, M., Girard, P., Aubort, C., y Fauchille, S., (1983). Methanol from water hyacinth, report interno de "Electricite de France y Entreprise Minierte et Chimique", Laref, Aspach Le Bas, 68700 Cernay, Francia.

Brij, G., (1984). Utilization of water hyacinth as a new source or for its control: some environmental considerations. Proceedings of the International Conference on water hyacinth. United Nations Environmental Program, Nairobi, India, pp 193-206.

Caurie M., (1981). Derivation of full range moisture sorption isotherms. En: Influences on food quality. Rockland, L. B., y Stewart, G.F. (Ed.) Academic Press. 64-67.

Chandler, J. A., Jewell, W. J., Gossett, J. M., Van Soest, P. J. y Robertson, J. B., (1980). Predicting methane fermentation biodegradability. *Biotech and Bioeng. Symp.*, **10**:93-107.

Chirife, J., y Ferro-Fontan, C., (1980). A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range. *J. Food Sci.*, **45**:1717-1719.

- Chynoweth, D. P., Dolenc, D. A., Gosh, S., Henry, M. P., Jerger, D. E., y Srivastava, V. J., (1982). Kinetics and advanced digester design for anaerobic digestion of water hyacinth and primary sludge. *Biotech. and Bioeng. Symp.*, **12**:381-398.
- De Baere, L., Verdonck, O. and Verstraete, W., (1985). High rate dry anaerobic composting process for the organic fraction of solids wastes. *Biotech. Bioeng. Symp.* **15**:321-330.
- Deshpande, P., Sarnik, S., Godbole, S. H., y Wagle, P.M., (1979). Use of water hyacinth in biogas production. *Current ScV* **48**, **11**:40-49.
- Dirar, H.A., y El Amin, H.B., (1985). Biogas production from water hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Perspectives in Biotechnology an Applied Microbiology*, 251-260.
- Durand, M., y Komisarczuk, S. 1988. Influence of major minerals on rumen microbiota. *J. Nutr.* **118**:249-260.
- Garcia, J.L.,(1982). Relations between acidogenesis and utilization of lactate, sulfate and nitrate, during anaerobic digestion. Segundo Simposio Panamericano de Combustibles y Productos Químicos vía fermentación. "Avances en Digestión Anaerobia", Octubre, México.
- Garcia, J.L., (1991). Ecología de inóculos anaerobios específicos en el tratamiento de aguas residuales. Memorias del II Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera. Manizales, Colombia.
- Gervais, P., y Christophe, B., (1986). Development of a solid-substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. *Biotech. Lett.*, **8**:3, 191-196.
- Gervais, P., Molin, P., y Bensoussan, M., (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotech. and Bioeng.*, **31**:457-463.
- Ghose, T. K., Singh, A., y Mukhpadhyan, S. N., (1979). Increased methane production in biogas. *VI.N1*:275-280.
- Goering, H. J., y Van Soest, P. J., (1972). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agricultural Handbook No. 379. Agricultural Research Service. United States Department o Agriculture.
- Gosh, S., (1984). Solid-phase digestion of low-moisture feeds. *Biotech. and Bioeng.*, **14**:365 - 382.
- Gosh, S., Lall U., (1988). Kinetics of anaerobic digestion of solid substrate. Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Poster-papers. Ed. by Tilche A., Rozzi A., Monduzzi Editore, Bologna, Italia: 213-220.

- Grajek, W., y Gervais, P., (1987). Influence of the water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol.*, **9**:658-662.
- Gujer, W., y Zehnder, A. J. B., (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Tech.*, **15**:127-167.
- Guyot, J. P., Traore, I., y Garcia, J. L., (1985). Methane production from propionate by methanogenic mixed culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, **26**:149-153.
- Guyot, J. P. y Ramírez F., (1989). Inhibition of anaerobic acetate degradation by formate. *Biotechnol. Lett.* **11**: 365-368.
- Guyot, J. P., (1990). Introducción a la microbiología de los digestores anaerobios. Conferencias sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en America Latina. México, pp 83-95.
- Hahn-Hägerdal, B., (1986). Water activity: a posible external regulator in biotechnical processes. (Reviews) *Enzyme Microb. Technol.*, **8**:322-327.
- Hayes, T. D., Chynoweth, D.P., Reddy, K. R., y Schwegler, B., (1985). The integration of biogas production with wastewater treatment. *Energy Applications of Biomass*. Ed. Lowenstwein M., Elseiver App. Sc. Pub: 189 - 199.
- Hobson, P.N. (1982). The microbiology of the rumen and anaerobic digesters: a comparison. Memorias del Segundo Simposio Panamericano de Combustibles y Productos Químicos vía fermentación. "Avances en Digestión Anaerobia", Octubre, México, D.F.. pp 31 - 40.
- Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. Academic Press, New York. pp 533.
- Jamil, K., Vinay, K. (1984). Histological damage of *Eichhornia crassipes* due to heavy metals uptake. Proceeding of the International Conference on water hyacinth. United Nations Environmental Program, Nairobi, India.
- Jarvis B. (1976). Do micotoxins present a potential hazard for intermediate moisture foods?. En: Intermediate moisture foods. Ed. por Davies, T., Birch, G. G., Parker, K. J. Applied Science publishers LTD. Londres, pp 120-134.
- Labuza, T. R., (1985). Water binding of humectants. En: Properties of water in foods. D.Simatos y J.L. Multon (Ed.) M. Nijhoff Publishers, Dodrecht, Holanda
- Leistner, L. and Rodel W. (1976). The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. En: Intermediate moisture foods. Ed. por Davies, T., Birch, G. G., Parker, K. J. Applied Science publishers LTD. Londres, pp 150 - 170.

Levenspiel, O. (1989). The chemical reactor omnibook. OSU Book stores, Inc. Carvallis, Oregon, cap. 83..

Manual de operaciones "CX1 Water Activity System." 1988. Pullman, Washington.

Mata-Alvarez, J. (1989). A simulation study of a continuous two-phase dry digestion system. *Biotech. Bioeng.*, **34**:609-616.

McDonald, R. C., y Wolverton, B. C., (1989). Comparative study of water hyacinth. *Economic Botany*, **34**(2):101.

McInerney, M. J., y M. P. Bryant., (1981). Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. En S.S. Sofer y O.R. Zabrosky (Ed.) Biomass conversion process for energy and fuels. Plenum Publishing Corporation. 277-296

Measures, J. C., (1975). Role of amino acids in osmorregulation of non-halophilic bacteria. *Nature*, **257**:398-400.

Miller, G. L., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.*, **31**:426-429

Miambi, E., (1983). Contribution a l'étude des conditions de fermentation methanique de la jacinthe d'eau (*Eichhornia* sp). tesis para obtener el Diplome D'Etudes Aprofondes de Physicochimie appliquee a la Biologie, Universite Paris Val de Marne. Francia.

Moat, G. A., y Foster, W. J., (1988). Microbial Physiology. 2a Ed. John Willey & Sons. Inc. Londres, Inglaterra, pp 193-197

Monroy, O., Ramirez, F., Noyola, A., y Guyot, J. P., (1988). Producción de biogas a partir de lirio acuatico. Curso Seminario-Taller "Control y aprovechamiento del lirio acuatico. Cuernavaca, Morelos, pp. 200 - 220.

Monroy, H. O., (1992). Cinética de la digestión anaerobia. Curso En "Bioprocesos anaerobios para el tratamiento de efluentes industriales". Mayo. UAM-I, México, pp 55-79.

Mountfort, D. O., Brulla, W. J., Krumholz, L.R., y Bryant, M. P., (1984). *Syntrophus buswelli* gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**:216-217.

Mountfort, D. O., Asher, R. A., y Bauchop, T., (1982). Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. Strain RAI and *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 128 - 134.

- Norrish, R. S., (1966). An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionary syrups. *J. Food. Technol.*, **1**: 25
- Pillai, K. R., Unni, B. G., Borthakur, A., Singh, H. D., Baniah, H. N.. (1984). Production of biogas from water hyacinth. Proceedings of the International Conference on water hyacinth. Ed. G. Thyagarajan, UNEP, Nairobi, Kenya, 507-525.
- Pirt, S.J., (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 170 - 185.
- Oriol, E. (1987). Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: importance de l'eau et de l'activite de l'eau. Tesis de doctorado en Microbiologia, INSA de Toulouse, Francia, pp 35-65.
- Pérez, G. P., (1981). Principios microbiológicos y químicos de la producción bovina. En: Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. O. Monroy, G. Viniegra (Comp.), AGT Editor, S.A.México, pp 47 - 55.
- Pfennif. N., Widdel F., y Truper, H. G. (1981). The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. The Prokaryotes, chap 74, pp 926-940. Starr M:P:, Stolp H., Truper H.G., Balows A., and Schlegel H.G., Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Plitman, M., Park, Y., Gómez, R., y Sinskey, A. J., (1973). Viability of *Staphylococcus aureus* in intermediate moisture meats. *J. Food Sci.* **38**: 1004.
- Quintero, R. (1981). Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana., México, D.F., pp 27-38.
- Ramírez, F., Vargas, G., y Monroy, O., (1988). Digestión anaeróbica del lirio acuático: fase acetogénica. Memorias del I Simposio en Ingeniería Ambiental. UNAM, México, D.F. pp. 198-214.
- Reddy, K.R. y DeBurk, W.F., (1984). Growth characteristics of aquatic macrophytes cultered in nutrient-enriched water. I. Water hyacinth, water lettuce, and pennywort. *Econ. Botany*, **38**:229-239.
- Rouvière, P. E., y Wolfe, R. S., (1988). Novel biochemistry of methanogenesis. *J. Biol. Chem.*, **263**: 7913-7916.
- Rose, A.H. (1977). Microbiología química, 2a. ed. Alhambra, España, Madrid, pp 110-115.
- Ross, K.D., (1975). Estimation of water activity in intermediate moisture foods. *Food. Technol.*, **29**: 26 - 34.

Saraswat, N., y Khanna P., (1986). Methane recovery from water hyacinth through anaerobic activated sludge process. *Biotech. and Bioeng.*, **28**: 240 - 246.

Schoberth, S. M., (1982). Methanogenic flora and their metabolic routes. Segundo simposio panamericano de combustibles y productos químicos vía fermentación. "Avances en digestión anaerobia". Octubre, México.

Schettino, B.S., y Monroy, O., (1989). Degradación biológica del lirio acuático. III Congreso de Biotecnología y Bioingeniería. Monterrey N. L.

Smith, P. H., and Mah, R. A., (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl. Microbiol.*, **14**:368-371.

Srivastava, R. C., Pillai K. R., Singh H. D., y Rafhavan. K. V., (1984). Studies in design of an anaerobic digester for water hyacinth. *idem Pillai et al 1984*: 566 - 592.

Theodorou, M. K., Lowe E. S. y Trinci, A.P. J., (1988). The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *ByoSystems*, **21**:371-376

Vaamonde, G., Chirife, J., y Scorza, O. C., (1982). An examination of the minimal water activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P growth in Laboratory media adjusted with less conventional solutes. *J. Food. Sci.*, **47**:1259-1262.

Vaamonde, G., Chirife, J., y Scarmato G., (1984). Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media of water activity adjusted with polyethylene glycols. *J. Food. Sci.*, **49**:296-297.

Van den Berg, C., y Bruin, S., (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. En: Water activity. influences on food quality. Ed. by Rockland, L. B., and Stewart, G.F.(Ed.) Academic Press., pp 18 - 28.

Van Soest, P. J., (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Assoc. Off. Agr. Chem. Jour.*, **46**:825-829.

Van Soest, P. J., (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Assoc. Off. Agr. Chem. Jour.*, **46**:829-835.

Van Zyl, P.J. y Prior, B. A. (1990). Adaptation *Zygosaccharomyces rouxii* to changes in water activity in transient continuous culture. *Biotechnol. Letters*, **12**:361

Wolverton, B.C., y McDonald, R. C., (1980). Energy from aquatic plant wastewater treatment systems. Report from Earth Resources Lab., NASA, NSTL Station, MS39529, USA.

Referencias

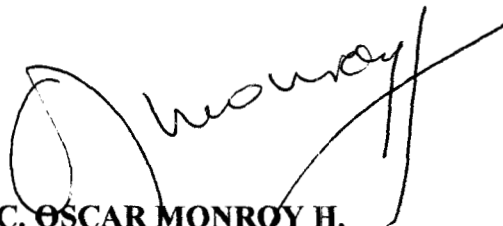
Wood, T. M., Wilson, C. A., y Stewart, C. S., (1982). Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. *Biochem. J.*, **205**:129-137.

Wujcik, W. J., y Jewell, W. J., (1980). Dry Anaerobic Fermentation. *Biotech. Bioeng. Symp.* **10**:43-65.

Zehnder, A. J. B., Huser, B. A., Brock, T. D., y K. Wuhrman., (1980). Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, **124**: 1-11.

Zehnder, A. J. B., (1978). Ecology of methane formation. En: Water pollution Microbiology. R. Mitchell. John Wiley & Sons, Inc., Londres, Inglaterra, pp 349 - 378.

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobó la presente tesis el día 23 de julio de 1996.

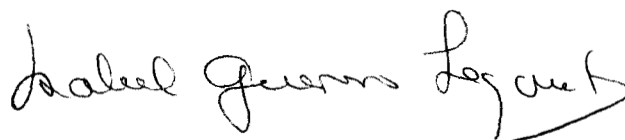


M.C. OSCAR MONROY H.

PRESIDENTE



**DR. JORGE GOMEZ H.
SECRETARIO**



**DRA. ISABEL GUERRERO L.
VOCAL**