

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“EVALUACIÓN DE LA MACROALGA *Ulva lactuca* COMO APORTANTE DE NUTRIENTES A UN INÓCULO METANOGENICO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS Y BIOL MEDIANTE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE RESIDUOS ORGÁNICOS DEL COMEDOR DE LA UNALM”

Presentado por

LIZ MELISSA CAPCHA EULOGIO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AMBIENTAL

Lima – Perú

2014

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1.	MACROALGAS.....	3
2.2.	MICROORGANISMOS METANOGÉNICOS.....	7
2.3.	INÓCULOS MICROBIALES	10
2.4.	BIOGAS	12
2.5.	BIOL.....	13
2.6.	DIGESTION ANAEROBICA	14
2.7.	RESIDUOS ORGÁNICOS	19
2.8.	PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGÉNICA (AME).....	20
2.9.	PRUEBA DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)	23
2.10.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	UBICACIÓN	27
3.2.	CRONOGRAMA DE TRABAJO.....	27

3.3. ACTIVIDAD 1: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD METANOGÉNICA (AME).....	29
3.4. ACTIVIDAD 2 – DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUIMICO DE METANO (PBM)	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1. ANÁLISIS DE LOS MATERIALES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL INÓCULO METANOGÉNICO	58
4.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DIARIA DE METANO DURANTE LA PRIMERA FASE EXPERIMENTAL - AME.....	60
4.3. EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO.....	65
4.4. CARACTERIZACIÓN DEL BIOL.....	70
4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BIOL EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LECHUGA	77
V. CONCLUSIONES	81
VI. RECOMENDACIONES	82
VII. BIBLIOGRAFIA.....	83
VIII. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de algas presentes en el Callao	5
Cuadro 2. Composición de Macro y Micro elementos en <i>Ulva lactuca</i>	6
Cuadro 3. Composición de Macronutrientes y Micronutrientes en la <i>Ulva lactuca</i>	6
Cuadro 4. Composición del biogás	13
Cuadro 5. Duración de la investigación por etapas.	28
Cuadro 6. Volúmenes de carga de materia prima.....	36
Cuadro 7. Cálculo de sólidos volátiles de los tratamientos.....	39
Cuadro 8. Cálculo del volumen de carga del reactor AME	43
Cuadro 9. Contenido de Humedad y Relación Carbono:Nitrógeno (C/N)	47
Cuadro 10. Cálculo de Sólidos Totales y Sólidos Volátiles para prueba PBM.....	47
Cuadro 11. Análisis de pH y C.E.....	58
Cuadro 12. Análisis a la <i>Ulva lactuca</i> Humedad, C, N, C/N	59
Cuadro 13. Resultado del Análisis Físico-Químico al contenido ruminal.....	59
Cuadro 14. Calculo de Actividad Metanogénica	65
Cuadro 15. Caracterización de la materia prima	66
Cuadro 16. Resultado del Análisis Microbiológico del Biol	71
Cuadro 17. Comparativa de Resultados Finales Microbiológicos.....	71

Cuadro 18. Resultados del análisis Físico-Químico del biol.....	73
Cuadro 19. Comparación de los Análisis de Biol con otros Autores	74
Cuadro 20. Límites máximos permisibles de metales pesados en fertilizantes.....	77
Cuadro 21. Características físico-químicas de los tratamientos evaluados.....	78
Cuadro 22. Índice de germinación de las semillas de lechuga - Biol	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Lugar de estudio La Punta – Callao	30
Figura 2: Extracción de <i>Ulva lactuca</i> en La Punta	30
Figura 3. Colecta del contenido ruminal.	31
Figura 4. Preparación de la muestra.....	33
Figura 5. Mezclas de contenido ruminal y <i>Ulva lactuca</i> al 20%, 30%, 50% y 100% de dilución.	34
Figura 6. Armado del sistema de Determinación de Actividad Metanogénica	38
Figura 7. Sistema armado de Determinación Actividad Metanogénica (AME)	41
Figura 8. Sistema Armado Potencial Bioquímico de Metano	49
Figura 9. Preparación de la prueba de biogerminación.....	56
Figura 10. Realización del Bioensayo de Germinación de plantas de lechuga	56
Figura 11. Comportamiento de la Actividad Metanogénica– 20%, 30%, 50%, 100% y Blanco.....	62
Figura 12. Velocidad de Producción de Metano – 20%	62
Figura 13. Velocidad de Producción de Metano – 30%	63
Figura 16. Velocidad de Producción de Metano – 50%	63
Figura 15. Velocidad de Producción de Metano – 100%.....	63

Figura 16. Velocidad de Producción de Metano – contenido ruminal	64
Figura 17. Volumen (ml) de Biogás producido por g de SV adicionado al reactor	69
Figura 18. Tasa de producción (ml) de biogás por g SV adicionado.....	69
Figura 19. Porcentaje de Metano producido por g SV adicionado al reactor	70
Figura 20. Índice de germinación de las semillas de lechuga – Biol.....	80

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Reporte de laboratorio de la <i>Ulva lactuca</i>	91
Anexo 2. Reporte del análisis Agronómico al contenido ruminal.....	92
Anexo 3. Base de datos de la prueba AME.....	93
Anexo 4. Resultado de la prueba estadística	94
Anexo 5. Análisis Microbiológico al biol	95
Anexo 6. Reporte del análisis Agronómico del biol.....	96
Anexo 7. Tabla de presión de vapor del agua para 35 °C usados en la prueba PBM.....	97
Anexo 8. Base de datos de la prueba PBM	98
Anexo 9. Base de datos del Bioensayo de germinación	99

RESUMEN

La presente investigación denominada “Evaluación de la macroalga *Ulva lactuca* como aportante de nutrientes a un inóculo metanogénico en la producción de biogás y biol mediante digestión anaerobia de residuos orgánicos del comedor de la UNALM” tiene como fin darle un uso a la *Ulva lactuca*, evaluando su desempeño en la producción de biogás y biol, analizando su interacción con el contenido ruminal de vacuno, usando para esto residuos del comedor universitario como sustrato en la prueba batch de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), realizado a nivel laboratorio.

Para el cumplimiento de los objetivos se utilizó un tratamiento previo, el cual consistió en incubar 4 mezclas de contenido ruminal y diferentes proporciones de *Ulva lactuca* al 20, 30, 50 y 100% durante 15 días. Luego de la incubación se realizó la prueba de determinación de la Actividad Metanogénica (AME), se escogió el tratamiento con los mejores resultados de actividad metanogénica, asociado directamente a la generación de metano. Finalmente se planteó la metodología de la prueba de determinación de Potencial bioquímico de metano, tomándose en cuenta las características químicas de las materias primas, que favorece por un lado la actividad metanogénica y la generación de un biofertilizante. Asimismo el uso de los residuos generados en el comedor universitario de la UNALM fue parte de esta investigación debido a que se contaba con datos de estudios previos y su fácil acceso.

Durante los primeros 5 días se generó de manera constante la mayor cantidad de metano al igual que la producción de biogás del tratamiento que contenía residuos orgánicos del comedor como sustrato. Por otro lado la producción de biogás y metano en la prueba en blanco es decir sólo con inóculo, obtuvo mucha mayor producción constante hasta el día 3 y se dio por culminada la prueba a los 7 días.

Luego de 17 días, tiempo de duración de la prueba de determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM) se reflejó la eficacia de este inóculo a base de contenido ruminal y *Ulva lactuca*, plasmados en el corto tiempo de retención hidráulica y el alto porcentaje de metano producido. Debido a que la prueba se llevó a cabo a escala laboratorio, los únicos parámetros

posibles de monitorear fueron, contenido de metano (CH_4) y el contenido de biogas. Se obtuvo un promedio de 68% de contenido de CH_4 en el tratamiento de residuos orgánicos del comedor mezclando con el inóculo a partir de *Ulva lactuca* y contenido ruminal.

Los residuos orgánicos del comedor Universitario UNALM usados como sustrato generaron 1.3 L CH_4 /g SV adicionado, adicionalmente se evaluó la generación de metano sólo del inóculo sin sustrato resultando 0.1 L CH_4 /g SV.

Por otro lado, el resultado de análisis microbiológico al biol dio a conocer la presencia de Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Estos presentaron resultados por debajo de los límites dados por la legislación peruana para aguas con fines de riego, lo que hace que el biol sea apto para su aplicación como fertilizante orgánico. Así también se evaluó la variación de contenido nutricional y fisicoquímico del biol.

Finalmente, se comprobó que el uso del contenido ruminal y *Ulva lactuca* como inóculo presentan buenos resultados mediante digestión anaerobia con residuos orgánicos del comedor universitario UNALM, pues se obtuvo buenos resultados en producción de calidad de biogás y biol. Por lo tanto los resultados expuestos en esta investigación manifiestan la viabilidad de utilizar estos elementos mediante esta metodología para generar metano y fertilizantes orgánicos a partir de residuos que actualmente no son aprovechados.

Palabras clave: Digestión anaeróbica, Potencial Bioquímico de Metano, *Ulva lactuca*, residuos orgánicos, biogas, biol.

ABSTRACT

This research entitled "Evaluation of the macroalga *Ulva lactuca* as contributor of nutrients to a methanogenic inoculum biogas production by anaerobic digestion and biological organic waste from UNALM Diningroom " aims to give an application to the *Ulva lactuca*, evaluating performance in the production of biogas, and biol, analyzing their interaction with the rumen contents of cows, using for this university dining hall waste as substrate in batch test Biochemical Methane Potential (PBM), performed at laboratory level.

To achieve the objectives was conducted a prior treatment, which consisted of 4 mixtures incubated rumen contents and different ratios of *Ulva lactuca* at 20, 30, 50 and 100% for 15 days. After incubation the test for determining the methanogenic activity was performed (AME), treatment was chosen with the best results of methanogenic activity directly associated with the generation of methane. Finally the method of determining the biochemical test of methane was raised potential, taking into account the chemical characteristics of the raw materials, which on one hand favors the methanogenic activity and the generation of a biofertilizer. Also the use of the waste generated in the UNALM dining was part of this research because data were available from previous studies and was easily accessible.

During the first 5 days the more methane is produced as consistently producing biogas from organic waste treatment containing dining as substrate. On the other hand the production of biogas and methane in the blank that is only inoculum, obtained much more constant production until day 3 and ended on day 7.

After 17 days, duration of the test for determining the Biochemical Methane Potential (PBM) the effectiveness of the ruminal inoculum based content and *Ulva lactuca*, reflected in the short hydraulic retention time and the high percentage of reflected methane produced. Since the test was carried out at laboratory scale, the only possible to monitor parameters were: content of methane (CH₄) and the content of biogas. The average methane production was 68% in the treatment of organic waste mixing dining with the inoculum from *Ulva lactuca* and rumen contents.

Organic wastes UNALM dining used as substrate generated 1.3 L CH₄ / g VS added, In addition methane generation only inoculum without substrate was evaluated resulting 0.1 L CH₄ / g VS.

Furthermore, the results of microbiological analysis at biol unveiled the presence of Total Coliform and Fecal Coliform. These results presented below the limits given by Peruvian law for water for irrigation, which makes the biol is suitable for use as organic fertilizer. The variation of the physicochemical and biological nutritional content was also evaluated.

Finally, it was found that the use of rumen contents and *Ulva lactuca* as inoculum present good results by anaerobic digestion of organic waste from university dining hall, because good results were obtained in biogas production and biological quality. Therefore the results presented in this study demonstrate the feasibility of using these items using this methodology to generate methane and organic fertilizer from waste that are currently underutilized.

Keywords: Anaerobic Digestion, Biochemical Methane Potential, *Ulva lactuca*, organic waste, biogas, biol.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación constituye una de las preocupaciones más importante a nivel mundial. La gran cantidad de residuos orgánicos generados a diario representan un gran problema, ya que constituyen un foco de infección pues atrae moscas, roedores y demás animales que aportan bacterias y con ellas enfermedades a la población, además del olor que incorpora al medio ambiente.

Según IMARPE (2007) en aguas tranquilas como las de la bahía de Pucusana, Paracas, Callao, Ancón y Paita abunda la *Ulva lactuca*. Un gran porcentaje de ellas son principalmente aprovechadas mediante extracción con fines gastronómicos e industriales, otra parte mucho menor yacen varadas a orillas del mar, las cuales al aglomerarse generan problemas de contaminación ambiental. Este estudio se ocupará de este porcentaje de macroalgas usándolas como aportante de nutrientes a un inóculo metanogénico en el proceso de digestión anaeróbica para la obtención de biogás y bioabono.

Asimismo según la investigación de autores como Allen *et al.* (2013), Díaz (2010) y Hughes *et al.* (2012), quienes refieren la importancia de la *Ulva lactuca*, en sus componentes químicos y que presenta un gran potencial para producir metano de una forma más directa, vía digestión anaerobia. Para Gil *et al.* (2000), el uso potencial de la macroalga *Ulva lactuca* puede resultar importante desde el punto de vista socioeconómico y ambiental por lo que es recomendable estudiar sus posibilidades de uso.

Según Gao y Mckinley (1993), la macroalga tienen una mayor productividad que las plantas terrestres, y no compiten con ellas por terreno, además, debe considerarse que las algas se pueden cultivar en zonas marinas o tierra, obteniéndose varias cosechas al año.

De igual manera Chapman (1980) y Both (1996) citados por Aldón (2008) resaltan la importancia de los macro y micronutrientes en la composición de la *Ulva lactuca* para la fertilización como la alimentación humana y animal.

Para desarrollar la presente investigación nos dirigimos a la zona costera conocida como La Arenilla, lugar donde a lo largo del año crece *Ulva lactuca* en gran cantidad, debido al proceso de eutrofización. Cabe resaltar que se observó que con el paso de los días las algas varadas a las orillas de dicha zona entran en descomposición, generando la proliferación de agentes vectores.

El objeto del estudio es obtener mediante la digestión anaerobia de residuos orgánicos procedentes del comedor universitario de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), biogás y bioabono mediante una prueba tipo batch o también llamados por lote; para finalmente evaluar los productos en términos de calidad (composición) y cantidad.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. MACROALGAS

Las macroalgas son comprendidas por un gran número de organismos acuáticos fotosintéticos, las cuales representan un enorme potencial sin explotar para la producción de energía. Las macroalgas usan la luz como fuente de energía y el agua de mar como medio de crecimiento, asimismo capturan el CO₂ disuelto y los nutrientes. Esta capacidad de biorremediación aumenta el valor potencial de la biomasa de macroalgas (Nikolaisen *et al.*, 2011).

Las macroalgas marinas no tienen que sostener el peso del talo pero tienen que hacer frente a las enormes fricciones del oleaje y las corrientes. Estas capacidades adaptativas se las confieren los distintos tipos de ficocoloides (hidrocoloides), exclusivos de las algas, que recubren sus paredes celulares (Nikolaisen *et al.*, 2011).

Existen cuatro tipos básicos de ficocoloides: agar y carragenatos (sólo en determinadas especies de rodofitas), alginatos (en ciertas feofitas y microalgas) y ulvanos (en clorofitas).

El ulvano oscila entre el 4 - 15% del peso seco de la *Ulva lactuca* en función de las especies, localidad y estación, es un polisacárido matricial polianiónico compuesto de ramnosa, ácido glucurónico e idurónico (poder quelante es superior al ácido glucurónico) y xilosas sulfatadas

Al igual que los demás ficocoloides, estos xiloramnoglucoromananos sulfatados son particularmente resistente a la biodegradación y, al igual que el alginato, capaz de formar geles en presencia de cationes divalentes y boro (Jegou y Lahaye, 1993).

Los polisacáridos formadores de gel añaden rigidez a la pared celular, además de proveer la elasticidad necesaria en un ambiente acuático. La fuerza de algunos geles depende de la unión de calcio entre las cadenas de polímeros. En *Ulva lactuca* los esteres de sulfato son los encargados de interferir con la unión de calcio para formar un gel más débil (Lobban y Harrison 1997, citado por Aldón 2008).

La capacidad de los ficocoloides de formar una red que retiene una gran cantidad de agua les confiere propiedades reológicas únicas, y explica su actuación como hidratantes de suelos. La gran higroscopicidad de estos coloides les permite captar agua en estado gaseoso de forma reiterada, motivo por el cual aumenta y mantiene la capacidad de campo de suelos, y permite reducir riesgos. Asimismo, sus propiedades viscosantes-gelificantes permiten crear una fina capa hidratante, tanto sobre el suelo como sobre las hojas de la planta (añadiendo un agente tensioactivo), lo que explica las propiedades antierosivas y estructuradoras de suelos y la actividad antitranspirante sobre la planta (Povolny, 1981).

Según Hughes *et al.* (2012) las macroalgas se pueden convertir en biocombustible mediante varios procesos incluyendo el tratamiento térmico y la fermentación, pero la ruta más directa a la obtención de biocombustibles es a través de la digestión anaerobia donde se obtiene un aproximado a 60% de metano, el cual puede ser usado para producir calor y electricidad o comprimido para uso como combustible de transportes.

Según Migliore *et al.* (2012) la digestión anaeróbica de algas es uno de los más importantes procesos biológicos para la conversión de biomasa en energía utilizable.

Para Gil *et al.* (2000), el uso potencial de la macroalga *Ulva lactuca* puede resultar importante desde el punto de vista socioeconómico y ambiental por lo que es recomendable estudiar sus posibilidades de uso.

2.1.1. LECHUGA DE MAR (*Ulva lactuca*)

Se les conoce como “algas verdes” debido a su pigmentación verde brillante muy similar al de las plantas superiores, debido a que en sus cromatóforos predominan las clorofilas a y b sobre el beta caroteno y la xantofila (Acleto y Zuñiga 1998, citado por Aldón 2008).

En las algas verdes, la pared celular está compuesta de celulosa, hemicelulosa y otras pectinas (Dawes, 1991).

De acuerdo a autores como (Jegou y Lahaye, 1993), los hidratos de carbono en las algas verdes están constituidos principalmente de ramnosa, xilosa, arabinosa, manano, galactano y glucano.

Del Informe de Macrozonificación Ecológica Económica de la Provincia Constitucional del Callao - 2011 elaborado por el Gobierno Regional del Callao (2011), se pone en conocimiento que la *Ulva lactuca* se ubica entre las especies más comunes del Callao, específicamente en las orillas marino rocoso, en el Cuadro 1 se dan a conocer además otras especies.

Cuadro 1. Tipos de algas presentes en el Callao

<i>Phyllum Tallophyta</i>	Nombre común
<i>Ulva sp.</i>	Lechuga de mar
<i>Chondracantus chamissoi</i>	yuyo
<i>Chaetomorpha sp.</i>	Alga
<i>Porphyra sp.</i>	Alga
<i>Macrocystis sp.</i>	Alga

Fuente: Gobierno Regional del Callao

En el Cuadro 2 se presenta la composición química proximal de la *Ulva sp.* de 78% de humedad en base seca (Mendo 2004, citado por Aldón 2008).

Cuadro 2. Composición de Macro y Micro elementos en *Ulva lactuca*.

Parámetros	Rango
Carbohidratos	42.3 – 47.1 %
Proteínas Totales	17.2 – 30.4 %
Cenizas	17.8 – 24.0 %
Fibra	3.9 – 7.8 %
Grasa	0.5 – 5.9 %
Nitrógeno	3.8 – 4.0 %
Sodio	0.06 – 3.18 %
Calcio	1.12 – 2.2 %
Potasio	0.73 – 1.6 %
Magnesio	0.6 – 1.50 %
Fósforo	0.09 – 0.7 %
Hierro	62 – 960 ppm
Zinc	25.6 – 64 ppm
Cobre	2.1 – 24 ppm

Fuente: Mendo. 2004

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis realizado por Aldón (2008) a una muestra de *Ulva lactuca* recogida en la Poza La Arenilla – La Punta.

Cuadro 3. Composición de Macronutrientes y Micronutrientes en la *Ulva lactuca*

Material Orgánico	Macronutrientes						Micronutrientes						Análisis Químico		
	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	S %	Na %	Zn ppm	Cu ppm	Mn ppm	Fe ppm	B ppm	M.O. %	C/N	M.S . %
<i>Ulva lactuca</i>	2.5	0.1	2.5	2.1	2.3	1.8	0.5	35	17	137	3072	88	45	10.4	7.02

Fuente: Aldón (2008)

a. Usos de la *Ulva lactuca*

El uso principal de la *Ulva lactuca* es en el campo de la alimentación humana. En china, Filipinas, Korea, Indochina, India y el Archipiélago de Oceanía, algunas poblaciones utilizan *Ulva lactuca* en preparaciones de ensaladas y sopas, también son apreciables por curar el escorbuto (Aldave 1989, citado por Aldón 2008).

En Japón la demanda de *Ulva sp.* se ha incrementado tanto que se cultiva en grandes volúmenes (Ohno y Critchley 1993, citado por Aldón 2008).

A pesar que en América del Sur el consumo humano de algas marinas al estado fresco y seco es escaso; se usan principalmente *Ulva lactuca* y otras especies de macroalgas del género *Gracilaria*, *Gigartina*, *Macrocystis* y *Lessonia* (Aldave 1989, citado por Aldón 2008).

Para Chapman (1980) citado por Aldón (2008), las algas contienen macro y micronutrientes en su composición, lo que hace posible su aprovechamiento como fuente de alimento animal y humano.

Para Booth (1996) citado por Aldón (2008), el valor fertilizante de las algas no está relacionado con el contenido de N, P o K, sino con las hormonas y micronutrientes contenidos en ellas.

Un estudio realizado en Perú sobre la utilización de la macroalga verde *Ulva lactuca* (clorophyta) como biofertilizante consistió en dejar al alga al aire libre expuesta al proceso de descomposición natural y luego fueron volteadas cada cierto tiempo para disminuir la humedad. Esta materia orgánica descompuesta fue probada pura y mezclada con tierra de chacra para evaluar el crecimiento de maíz. Las plantas que tuvieron como sustrato a las algas y a la mezcla de tierra de chacra más algas crecieron más que las plantas en tierra de chacra solamente (Mendo, 2004).

2.2. MICROORGANISMOS METANOGÉNICOS

Las bacterias metanogénicas forman parte del dominio de las Arqueobacterias, son organismos anaeróbicos estrictos, y requieren condiciones libres de oxígeno y potencial redox menor que -330 mV. La mayoría tiene tiempos de duplicación desde varias horas hasta varios días. Estos factores imposibilitaron el estudio de metanógenos en cultivos puros hasta mediados de la década del 70, cuando el desarrollo de técnicas anaeróbicas perfeccionadas y cámaras de anaerobiosis seguras, facilitaron el crecimiento, aislamiento y manipulación de las

bacterias metanogénicas. Otro impedimento para su estudio fue su débil crecimiento. El estudio de su nutrición, especialmente sus altos requerimientos de níquel, permitió el crecimiento suficiente para realizar estudios bioquímicos que demostraron vías metabólicas completamente nuevas (Sowers 1995 y Takahashy 2005, citado por Sosa *et al.* 2007).

Las bacterias metanogénicas se encuentran en ambientes naturales carentes de oxígeno, por ejemplo en sedimentos de pantanos, lagos, fosas sépticas así como en los digestores, en los cuales constituyen aproximadamente el 10% de la microflora total. También son parte de la flora intestinal de rumiantes e insectos como las termitas. El pH al cual pueden desarrollarse se encuentra entre 6.5 y 7.8 y pueden ser mesófilos (30-40°C) o termófilos (45-65°C). Pueden encontrarse en ambientes extremos de alta temperatura y salinidad como las fuentes termales y los cañones termales marinos (Setter *et al.* 1981, Jones *et al.* 1987, García 1990, citado por Fajardo, 1997).

El criterio para el agrupamiento esta también de acuerdo con el patrón establecido en base a características más tradicionales como la morfología, la reacción de Gram, la razón guanina/citosina y la composición de la pared celular. Aunque se cuente con una variedad de metanógenos disponibles, parece probable que existan muchos más de los que hasta ahora han sido cultivados. El reciente brote de interés por la metanogénesis ha conducido a un número creciente de nuevos aislamientos, en particular, los de metanógenos consumidores de acetato (Rivard y Smith 1982, Corder *et al.* 1982, citado por Bermudez *et al.* 1988).

En este contexto, el interés primordial está unido a los metanógenos consumidores de acetato, *Metanosarcina barkeri*, *Metanococcus mazei* y *Metannothrix soehngenii*, ya que aproximadamente dos tercios del carbono presente en la materia orgánica se transferirá finalmente a acetato.

Según Ferrer y Pérez (2010) taxonómicamente los metanógenos forman 5 órdenes y la mayoría de los metanógenos son capaces de producir CH₄ y CO₂:

- Methanosarcinales (9 géneros).
- Methanomicrobiales (8 géneros).
- Methanobacteriales (5 géneros).
- Methanococales (4 géneros).
- Methanopyrales (1 género).

2.2.1. USO E IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS METANOGÉNICOS

Las bacterias metanogénicas ofrecen una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas si se tiene en cuenta que degradan gran variedad de desechos (solos o en consorcios). También son de interés industrial ya que a partir de materiales de desecho se producen gas metano, útil porque genera energía al ser usado como combustible (Acuña *et al.*, 2008).

Es por ello la importancia de profundizar en las relaciones ecológicas de los microorganismos involucrados en las fermentaciones anaerobias y la necesidad de aislar metanógenos de altos rendimientos de metano, con el fin de confeccionar buenos inóculos que propicien una producción óptima de metano. Con ello se sentarían las bases para el diseño de tecnologías que consideren las particularidades de este complejo ecosistema y su impacto en la producción de biogás (Ferrer y Pérez, 2010).

El rendimiento de un sistema de digestión anaeróbica está ligado, principalmente, a la estructura de la comunidad microbiana presente en el digestor. Los parámetros ambientales y de operación del proceso afectan el comportamiento, rendimiento y, eventualmente, el destino de la comunidad microbiana en los digestores anaeróbicos. Es más, la naturaleza e influencia de los lodos usados para la inoculación también deben ser tomadas en cuenta (Demirel y Scherer, 2008).

2.3. INÓCULOS MICROBIALES

Se encuentran muchos tipos de inóculos microbiales en la naturaleza, más en esta investigación se tendrá en cuenta el siguiente:

2.3.1. CONTENIDO RUMINAL

El éxito ecológico que ocurre en los rumiantes se debe a la fermentación ocurrido en el rumen, el cual tiene forma de una cámara, manteniendo un ambiente favorable para que ocurra la fermentación anaerobia. El término fermentación se refiere al metabolismo microbiano en ausencia de oxígeno que convierte a los carbohidratos en productos orgánicos como los ácidos grasos volátiles (AGV's), ácido láctico y etanol (Angeles, 2000).

Un patrón adecuado de fermentación necesita algunas condiciones para desarrollarse en forma adecuada:

- Debe existir un aporte suficiente de sustratos.
- Se debe mantener un potencial de óxido-reducción entre -250 y -450 milivoltios (mV).
- La temperatura debe estar en un rango de 39 - 40°C.
- Una osmolaridad cercana a los 300 mosm.
- Un pH de 6-7.
- Remoción de los desechos no digeribles.
- Remoción de microorganismos congruente con la regeneración de los mismos.
- Remoción de ácidos grasos volátiles (AGV's), producidos durante la fermentación.

En ambientes como el rumen, suelo, agua y otros ambientes, la disponibilidad de los sustratos depende de la acción metabólica de otros microorganismos que degradan compuestos

orgánicos a acetato, formiato, metilamina, metanol y metilmercaptano entre otros. Estos son utilizados por las bacterias metanogénicas en la producción de metano (Scriban, 1985).

En el rumen el alimento y los productos de la fermentación se acomodan en tres capas dependiendo de su gravedad específica:

- Capa gaseosa.

Se localiza en la parte superior y en ella se encuentran los gases producidos durante la fermentación de los alimentos.

- Capa sólida.

Está formada principalmente por alimento y microorganismos flotantes. El alimento consumido más recientemente se establece en la parte superior de esta capa, debido a que posee partículas de gran tamaño (1-2 cm), las cuales atrapan a los gases producidos. El alimento consumido con anterioridad se localiza al fondo de la capa sólida, debido a que ya fue fermentado suficiente y se redujo su tamaño (2-3 mm).

- Capa líquida.

Se localiza ventralmente y contiene líquido con pequeñas partículas de alimento y microorganismos suspendidos.

Los microorganismos ruminales son clasificados en tres subpoblaciones de acuerdo a su interacción con partículas de alimento (Czerkawski y Cheng, 1988, citado por Angeles, 2000):

- Los microorganismos suspendidos en el líquido ruminal
- Los que se encuentran en las paredes del epitelio ruminal, y
- Los adheridos firmemente a las partículas de alimento.

Durante la fermentación, las partículas grandes de alimento se reducen constantemente a partículas más pequeñas y los microorganismos proliferan. La importancia de dichos microorganismos ruminales se puede argumentar en el hecho de que de cada 15 kg de materia seca consumidos por el animal, 10 kg son degradados y fermentados por los microorganismos ruminales (Angeles, 2000).

2.4. BIOGÁS

El biogás es el producto del metabolismo de bacterias metanogénicas que participan en la descomposición de materias orgánicas en ambientes húmedos y carentes de oxígeno, conocidos como biodigestores. A su vez, durante el proceso de descomposición, algunos compuestos orgánicos son transformados a minerales, los cuales pueden ser utilizados fácilmente como fertilizante para cultivos (Muñoz *et. al.*, 1987).

La producción de biogás va a depender, principalmente, de los materiales utilizados, de la temperatura y tiempo de descomposición. Existe una estrecha relación entre la temperatura y tiempo de descomposición del material en el biodigestor. A mayor temperatura, más rápido es el proceso de descomposición, esto significa que el material requiere menos tiempo dentro del fermentador (Scriban, 1985).

Toda materia orgánica susceptible de fermentación, puede ser tratada en biodigestores, convirtiéndose en la forma más barata de higienizar el medio ambiente, a la vez que proporciona beneficios en costos de producción: restos vegetales, basura orgánica, estiércol de la explotación agropecuaria, residuos o desechos de la agroindustria, etc.

La composición del biogás varía de acuerdo a la biomasa utilizada, su composición aproximada se muestra en el Cuadro 4. El metano constituye el componente económicamente más importante del biogás, ya que le confiere las características combustibles al mismo (Magañar, 2006).

Cuadro 4. Composición del biogás

Tipo de Gas	Porcentaje
Metano	40 – 70% volumen
Dióxido de carbono	30 – 60% volumen
Sulfuro de Hidrógeno	0 – 3% volumen
Hidrógeno	0-1% volumen

Fuente: Magaña. 2006.

2.5. BIOL

Además de generar gas combustible, la fermentación anaerobia de la materia orgánica produce un residuo orgánico de excelentes propiedades fertilizantes, evitando en esta forma la competencia que se podría presentar con el aprovechamiento tradicional de los residuos animales y agrícolas con fines fertilizantes o como combustibles. La composición del bioabono en promedio tiene 8.5% de materia orgánica, 2.6% de nitrógeno, 1.5% de fósforo, 1.0% de potasio y un pH de 7.5 (Botero y Thomas 1987, citado por Fregoso *et al.* 2001).

El bioabono en forma líquida puede aplicarse directamente al campo en cantidades recomendadas, no posee mal olor y no atrae moscas (Mc Caskey 1990, citado por Fregoso *et al.* 2001).

Investigaciones realizadas permiten comprobar que los bioles aplicados foliarmente a los cultivos (alfalfa, papa, hortalizas) en una concentración entre 20 y 50% estimulan su crecimiento, mejoran la calidad de los productos e incluso tienen cierto efecto repelente contra las plagas (Arévalo 1998, citado por Schlaefli 2010).

Los abonos orgánicos líquidos son ricos en nitrógeno amoniacal, en hormonas, vitaminas y aminoácidos. Estas sustancias permiten regular el metabolismo vegetal y además pueden ser un buen complemento a la fertilización integral aplicada al suelo (Vásquez 1999, citado por Schlaefli 2010).

2.6. DIGESTION ANAERÓBICA

La digestión anaeróbica es un proceso biológico degradativo en el cual, parte de la materia orgánica contenida en un sustrato es convertida en una mezcla de gases, principalmente metano y dióxido de carbono, mediante la acción de un conjunto de microorganismos en ausencia de aceptores de electrones de carácter inorgánico. Frente a los procesos aerobios, los tratamientos anaeróbicos presentan las ventajas de no necesitar aireación y generar un biogás que puede ser recuperado y utilizado en la misma planta con finalidades energéticas, permitiendo en muchos casos la autonomía o autosuficiencia de las plantas de tratamiento.

Los sistemas anaerobios desarrollan procesos fermentativos de los cuales se obtienen productos finales estables y una producción celular muy baja, alrededor del 3% de la materia orgánica presente en el agua residual es convertida en masa celular y el 97% restante es convertido por catabolismo en CH_4 y CO_2 como productos finales (Acuña *et al.*, 2008).

El comportamiento de los microorganismos metanogénicos en la digestión anaerobia está influenciado por la variedad de microorganismos que intervienen, sus actividades a la vez complementarias e inhibitoras unas de otras, la diversidad posible de los constituyentes de sustrato, hacen más difícil la conducta óptima de la fermentación metanogénica (Scriban, 1985).

Asimismo, se tienen en cuenta un grupo de parámetros internos y externos como son:

- Temperatura

La temperatura habitual en la que se desarrolla la digestión anaerobia es superior a $10\text{ }^\circ\text{C}$ e inferiores a $65\text{ }^\circ\text{C}$. Dentro de estos límites, parece que la producción de metano tiene dos puntos óptimos, uno en una zona mesofílica hacia los $40\text{ }^\circ\text{C}$, el otro en la zona termofílica entre $50 - 55\text{ }^\circ\text{C}$. Cabe resaltar que mediante vía mesofílica se favorece la baja producción de CO_2 , posibilidad de encontrar mayor cantidad de especies microbianas metanógenas,

mientras que la vía termofílica favorece el menor tiempo de retención ya que hay reactividad más grande, se disminuyen las cantidades de lodo al final del proceso, destrucción de los microorganismos patógenos y se obtiene más fácilmente las condiciones anaerobias. El mantenimiento del digestor a una temperatura constante es una de las condiciones para que se lleve a cabo una buena fermentación (Scriban, 1985).

- pH

En las diferentes fases de la digestión, el pH fluctúa entre los valores 6,5 y 8,0. La disminución de los valores de pH por debajo de 6,5 puede significar una concentración demasiado fuerte de ácidos grasos volátiles y por lo tanto una inhibición de la metanogénesis. Mientras que por encima de pH 8,0 se comprueba la formación de hidrógeno, de hidrógeno sulfurado y de amoníaco (Scriban, 1985). El equilibrio del pH está asegurado principalmente por los bicarbonatos disueltos. Para la cual su concentración debe ser 1,500 mg/L por lo menos, lo cual asegura un adecuado proceso de digestión.

- Tiempo de permanencia de los sustratos por metanizar

Es la composición misma del sustrato y las condiciones de funcionamiento que se mantienen (tipo de procedimiento seleccionado, temperatura, entre otros) los que permiten determinar el tiempo de permanencia óptima de los desechos o de los efluentes en el digestor. En el proceso de biodigestión se busca la forma de hacer mínimo el tiempo de permanencia en el digestor en la medida en la que este parámetro es determinante de las dimensiones y por lo tanto del costo del digestor.

- El potencial redox

Los ensayos realizados en cultivos puros han demostrado que las bacterias metanogénicas sólo actúan a un bajo potencial redox: -300 a -330 mV (Scriban, 1985). Por

esto es conveniente evitar la introducción al digestor de elementos oxidantes y particularmente de asegurar una buena hermeticidad.

- Los nutrientes y los inhibidores

Habitualmente se admite como óptima una relación C/N de 35 y C/P de 150. El nitrógeno existe en cantidades suficientes en la mayor parte de los substratos metanizables, cabe indicar que mediante la metanogénesis no se consume cantidades importantes de este elemento. Bajo la forma de nitrato, si las cifras son superiores a 150 mg/L, el nitrógeno puede convertirse en inhibidor de la metanogénesis porque su poder oxidante podrá afectar elevando el potencial redox. Los sulfatos son inhibidores para cifras superiores a 100 o 200 mg/L (Scriban, 1985). Su presencia induce el desprendimiento de hidrógeno e hidrógeno sulfurado; son bien conocidos los efectos corrosivos de este último. Sin embargo, si son en cantidades bajas, estos desprendimientos de H₂ y de H₂S pueden tener un efecto benéfico, por un lado abaten el potencial redox y por otra precipitan los iones metálicos tóxicos en forma de sulfuro. Los iones de los metales pesados son, en efecto inhibidores y en concentraciones muy bajas son tóxicos.

- La agitación

La agitación permite mejorar la productividad asegurando una buena homogeneidad del contenido en el digestor y favorece los intercambios térmicos. Por otra parte, permite asegurar, en parte, la desgasificación de los lodos. Esta agitación se hará mecánicamente o por simple recirculación de gas o del efluente.

2.6.1. PROCESOS DE DIGESTIÓN ANAEROBIA

Según Martí (2006), el proceso se lleva a cabo en un reactor cerrado en ausencia de oxígeno, donde la degradación de materiales orgánicos ocurre a través de cuatro etapas

consecutivas: llamadas hidrólisis, acidogénesis, acetatogénesis y metanogénesis. A continuación se explicará cada una de las etapas mencionadas.

a. Hidrólisis

La hidrólisis es el primer paso necesario para la degradación de la materia orgánica compleja. En esta etapa, las bacterias hidrolíticas actúan sobre las macromoléculas orgánicas despolimerizándolas enzimáticamente en los correspondientes monómeros o fragmentos más sencillos (Cuesta *et al.*, 2009).

Un ejemplo es *Clostridium thermocellum* que transforma la celulosa en etanol, hidrógeno y gas carbónico y la celobiosa en ácido acético y ácido láctico. Esta es una etapa limitante ya que hay algunos residuos orgánicos naturales (desechos lignocelulósicos) son muy resistentes a la acción bacteriana. Es posible que la acción combinada de enzimas y bacterias permita optimizar esta fase (Scriban, 1985).

El proceso de hidrólisis es el que proporciona sustratos orgánicos para la digestión anaeróbica. La hidrólisis depende de la temperatura del proceso, del tiempo de retención hidráulico, de la composición del sustrato (porcentaje de lignina, carbohidratos, proteínas y grasas), del tamaño de las partículas, del pH, de la concentración de amonio y de la concentración de los productos de la hidrólisis (Speece, 1987).

b. Acidogénesis

Los compuestos solubles obtenidos en la etapa anterior son transformados por las bacterias acidogénicas en ácidos grasos de cadena corta (ácidos grasos volátiles), alcoholes, amoníaco, hidrógeno y dióxido de carbono. Los ácidos grasos volátiles son principalmente ácido acético, propiónico, butírico y valérico (Cuesta *et al.*, 2009). Esta fase pone en juego una población compleja de bacterias, en su mayoría anaerobias estrictas (*Bacteroides ruminicola*, *Clostridium*, *Bifido bacterium*) aislables en cultivos puros (Scriban, 1985).

c. Acetogénesis

En esta etapa las bacterias acetogénicas realizan la degradación de los ácidos orgánicos llevándolos al grupo acético $\text{CH}_3\text{-COOH}$ y liberando como productos, Hidrógeno y Dióxido de carbono. Esta reacción es endoenergética pues demanda energía para ser realizada y es posible gracias a la estrecha relación simbiótica con las bacterias metanogénicas que substraen los productos finales del medio minimizando la concentración de los estos en la cercanía de las bacterias acetogénicas (Cárdenas, 2009).

Estas reacciones permiten evitar una acumulación de ácidos grasos volátiles, diferentes al acético, los cuales a concentraciones muy elevadas se convierten en inhibidores de la metanogénesis. Algunas de las bacterias acetatogénicas identificadas son los organismos “S” o “BPOH (Bacteria productora de oxígeno)”, *Desulfovibrio*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, la mayor parte de este tipo de bacterias son poco conocidas. En esta etapa se ha podido notar que las bacterias viven en simbiosis con las bacterias metanógenas, consumidoras de hidrógeno (Scriban, 1985).

d. Metanogénesis

La metanogénesis es el último paso del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica. En esta etapa, la mayor parte de la energía química contenida en el sustrato es convertida en metano por la actuación de las Arqueas metanogénicas (Fernández, 2010).

Las bacterias metanógenas son organismos anaerobios estrictos como *Methanobacterium thermoautrophicum*, *Methanosarcina barkeri*, entre otras. Un ejemplo es que todos ellos poseen varias coenzimas especiales, siendo la coenzima M, la que participa en el paso final de la formación del metano (Scriban, 1985).

2.7. RESIDUOS ORGÁNICOS

Según Tchobanoglus (1994), la fracción orgánica de los residuos sólidos provenientes de zonas urbanas está compuesta típicamente por materiales como residuos de comida, papeles, cartones, cueros, textiles, residuos de jardinería, etc. Esta basura orgánica aporta muchos microorganismos que ayudan en los fenómenos de descomposición de la materia orgánica.

Los residuos orgánicos que se usan para el cargado de biodigestores en el proceso de biodigestión en su mayoría son biodegradables (es decir, que se descomponen en forma natural). Se pueden desintegrar o degradar rápidamente transformándose en otro tipo de materia orgánica. Ejemplo: los restos de comida, frutas y verduras, carne, huevos, residuos de cosechas, estiércoles, etcétera (Aguilar, 1999).

La digestión anaeróbica puede ser usado para convertir la materia orgánica en biogás para la recuperación de energía y lograr la estabilización de residuos y la reducción del olor. Una desventaja es que los residuos orgánicos tienen importantes limitaciones a su utilidad en la digestión anaeróbica debido a la rapidez con que se acidifica, tensionando e inhibiendo la actividad de los metanógenos (Kafle, 2013).

2.7.1. RESIDUOS ORGÁNICOS DEL COMEDOR UNIVERSITARIO UNALM

Schlaefli (2010) decidió utilizar en su investigación los desechos orgánicos del comedor universitario debido a que este genera 488,2 kg diarios de materia orgánica aprovechable, el cual representaba aproximadamente 7 veces la cantidad de residuos sólidos que generan el resto de comedores juntos de la UNALM, según lo calculado en el trabajo de investigación de Aramayo en el 2004.

El manejo de los residuos sólidos orgánicos del comedor de la UNALM, cuenta con la recolección de los residuos generados en la preparación de alimentos y los restos de los

alimentos consumidos en cilindros plásticos de 191 litros y al cierre del comedor son llevados al almacén, siendo estas recogidas por un camión intercambiando los cilindros por vacíos. Se sabe que los residuos recogidos son utilizados como alimento para cerdos, lo que induce a que estos residuos pueden generar impactos negativos al ambiente, animales y humanos (Aramayo, 2004). Según la investigación llevada a cabo por Aramayo (2004), el comedor universitario prepara aproximadamente un total de 1600 menús diarios.

Por otro lado el estudio de Salazar (2010) indica que la cantidad de raciones atendidas entre los años 2002 a 2008 se mantuvo casi lineal (entre 2200 a 2800 raciones aproximadamente), hasta que en el año 2009 hubo un descenso considerable (1900 raciones aproximadamente).

Asimismo según información proporcionada por la empresa concesionaria del comedor Universitario en la UNALM, el volumen de residuos orgánicos recolectados en el mes de agosto del 2013 fue de 1.5 a 2 cilindros diarios, cada cilindro tiene un volumen de 200 litros, es decir hubo un volumen de generación de residuos de 300 a 400 litros diariamente. Además indicaron que a partir de septiembre a diciembre se registró mayor volumen de residuos, de 2.5 a 3 cilindros.

La empresa concesionaria actual del comedor indica que a partir del mes de mayo del 2013 se preparan 250 desayunos, 1350 almuerzos y 200 cenas y que a partir de septiembre del mismo año aumentaron sus raciones a 350 desayunos, 1500 almuerzos y 250 cenas. El ciclo 2014 inició con 300 desayunos, 1350 almuerzos y 250 cenas.

2.8. PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGENICA (AME)

Los ensayos anaerobios permiten evaluar: a) La biodegradabilidad anaerobia de la muestra compuesta de contenido ruminal y la macroalga *Ulva lactuca*; b) La toxicidad de la muestra compuesta (de alguno de sus componentes) sobre los grupos microbianos responsables de cada una de las etapas del proceso anaerobio, que resultan fundamentales en la caracterización previa de la muestra.

El ensayo de actividad metanogénica específica (AME) es una importante herramienta para el monitoreo de la digestión anaerobia.

El ensayo de AME consiste en evaluar la capacidad de los microorganismos metanogénicos en convertir sustratos orgánicos en CH_4 y CO_2 . De esta forma, a partir de cantidades conocidas de biomasa (sólidos volátiles totales), bajo condiciones establecidas, se puede evaluar la producción de CH_4 a lo largo de un periodo de tiempo. El método utilizado para la medición de la producción de CH_4 en el ensayo de AME es el desplazamiento de líquido.

La AME puede definirse como la máxima capacidad de producción de metano por un grupo de microorganismos anaerobios, realizada en condiciones controladas de laboratorio que permita la máxima actividad bioquímica de conversión del sustrato orgánico a metano. Las unidades en las que se expresa son mg DQO/g SSV día, o ml CH_4 /g SSV día.

Para llevar a cabo el ensayo de AME se introduce en la botella el inóculo cuya AME se pretende conocer. El volumen de inóculo se calcula a partir del volumen total de reacción y la concentración de inóculo deseada. Resulta interesante conocer su concentración de Sólidos Volátiles (SV) con la finalidad de normalizar los resultados con respecto a dicho parámetro. Finalmente se mide la conductividad de la muestra puesto que será uno de los parámetros de estudio.

Se añade el tampón seguidamente, para mantener el pH dentro del intervalo óptimo para el crecimiento de las bacterias metanogénicas.

Se añade al frasco el sustrato necesario para el crecimiento de las bacterias metanogénicas. Por sustrato se utiliza acetato de sodio. La concentración de sustrato es un parámetro cuya influencia sobre la AME se pretende estudiar. Se debe tener precaución de añadir el sustrato justo antes de cerrar la botella puesto que después de ser añadido empezará a haber actividad bacteriana y se pretende que toda actividad sea registrada.

Justo después de añadir el acetato de sodio, se miden la temperatura y la conductividad de cada muestra, dado que resultarán de utilidad para realizar determinados cálculos y analizar los resultados. Posteriormente se cierra la botella. Para ello se usa una tapa roscada y encima silicona para evitar el posible ingreso de aire al reactor.

Cabe destacar también, que el mismo procedimiento se realiza para el ensayo de los blancos experimentales con los que se pretende conocer la AME debida al sustrato que pueda quedar en el fango, por lo que se sigue el mismo procedimiento pero con la diferencia de que a estos no se les añade ningún sustrato.

Este test se puede aplicar para determinar la actividad metanogénica y no metanogénica de un lodo seleccionado como inóculo o del lodo de un digestor en funcionamiento, de gran utilidad a la hora de realizar la puesta en marcha y optimizar el funcionamiento de un digestor anaerobio, respectivamente.

La degradación anaerobia de sustratos complejos, como es el caso de muchos efluentes residuales, transcurre en diferentes etapas secuenciales, siendo diferentes grupos tróficos microbianos los responsables de cada una de ellas. Por ello se debe contemplar separadamente los conceptos de actividad hidrolítica, acidogénica y metanogénica.

Este modelo sigue técnicas que permiten caracterizar la actividad por medio de un único parámetro, la actividad metanogénica máxima.

El test de actividad de un lodo se realiza habitualmente en experimentos en discontinuo en los que una determinada cantidad de sustratos (agua residual o sustrato sintético específico) sirve como alimentación de una determinada cantidad de lodo. Para la determinación de las actividades de las diferentes etapas se deben utilizar sustratos representativos de cada una de ellas (Soto et al., 1992).

2.9. PRUEBA DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

El objetivo de esta prueba es que los diversos residuos orgánicos disponibles en cantidades significativas sean utilizados como materia prima en la digestión anaerobia. El biogás como producto final representa una reducción en el impacto ambiental que representan estos residuos. Si bien es cierto no todos los productos de desecho son adecuados para la producción de biogás, o en otros casos puede que la producción de biogás no sea rentable, es entonces que la PBM es una prueba que evalúa la idoneidad y rentabilidad de las materias primas usadas para la generación de biogás (Drosg *et al.*, 2013).

Para lograr este objetivo es necesario hacer una evaluación teórica preliminar a la materia prima, indicando si esta puede ser adecuada, datos como disponibilidad de macro y micro nutrientes, posibilidad de sustancias inhibitorias (antibióticos, metales pesados, desinfectantes, etc). Así también datos como el contenido de agua, contenido de materia orgánica. Esta prueba requiere materias primas con considerable contenido de agua y una baja cantidad de materia orgánica o material fibroso ideales para la digestión anaerobia. Además, la prueba requiere la realización de análisis de laboratorio como se describe a continuación:

- Medición del pH

Se requiere que el valor del pH en la fermentación anaeróbica sea ligeramente por encima del pH neutro. Sin embargo, el rango de pH de las materias primas es muy amplio, estos valores muy altos o muy bajos pueden regularse, el pH recomendable es entre 6,8 y 7,5, si se produjera una ligera acidificación durante la digestión esta podría regularse mediante la adición de una base por ejemplo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , NaOH en el reactor (Bischofsberger, 2005 citado por Drosg *et al.*, 2013).

- Sólidos Totales (ST)/Materia Seca (MS)

Ambos parámetros representan lo mismo y están dados en las unidades % o en g/L. El análisis implica el secado de la muestra en una cámara a temperatura constante de 103 a 105 °C. Método basado en la norma (EN 12880, APHA 1998, 2540 B).

- Sólidos Volátiles (SV)/Materia Orgánica Seca (MOS)

Este análisis es realizado con la finalidad de determinar la cantidad de materia orgánica en una muestra, ambos parámetros representan lo mismo y se describen en unidades % o en g/L. Por lo general este análisis se lleva a cabo junto con la determinación de ST/MS descritos anteriormente. La muestra se seca a temperatura constante de 103 a 105 °C, seguidamente se pone en una mufla a temperatura constante de 550 °C. (EN 12879, APHA 1998, 2540E).

Esta prueba se utiliza principalmente para determinar el rendimiento de metano de un material de alimentación o residuo, además brinda información sobre la degradabilidad anaerobia de un material, y velocidad de degradación. Esta metodología está basada en la DIN 38 414 – S8 (Braun 1982 y Braun 2007 citados por Drosig *et al.* 2013).

Las condiciones de almacenamiento del inóculo que se usará para tiempos cortos son de 35 a 38 °C, se puede almacenar dentro de un recipiente de plástico que contenga las condiciones anaerobias y que permita que el gas producido escape. Un inóculo activo puede ser almacenado por alrededor de una semana antes de ser utilizado. Si el inóculo tiene que ser almacenado por un período más largo, se puede añadir pequeñas cantidades de material degradable con regularidad para mantener la actividad del inóculo, sin embargo los tiempos largos de almacenamiento no son preferibles.

2.9.1. CONDICIONES DE LA PRUEBA PBM

La prueba PBM tiene dos condiciones descritas a continuación:

- La relación sustrato/inóculo es un factor importante en las pruebas PBM, en particular en términos de material degradable es decir sólidos volátiles (SV) de sustratos e inóculos. La prueba estima que la relación SV muestra/SV inóculo debe ser $\leq 0,5$.
- El porcentaje de Sólidos Totales (ST) de la carga, es decir sustrato e inóculo debe ser $< 10\%$.

2.10. BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca Sativa L.*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición), prueba donde las soluciones y los organismos estudiados se colocan en cámaras y se mantienen allí todo lo que dura la prueba. Este tipo de ensayos con semillas de especies vegetales permiten evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento (Sobrero y Ronco, 2004).

Adicionalmente, los bioensayos aportan información complementaria del efecto del biol en la germinación, ya que permite ponderar el efecto en la elongación de las plántulas, lo que permite observar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no inhibe la germinación pero que sin embargo, puede inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocolito, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto; de este modo los bioensayos son indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales (Sobrero, 2004).

Una de las principales ventajas de usar la sensibilidad de la especie *L. sativa* en este bioensayo es el tiempo reducido de exposición de la prueba con semillas, bajos costos asociados y que no se requiere de equipamiento sofisticado para su desarrollo.

Finalmente, según Varnero *et al.* (2007), los efectos fitotóxicos de un material orgánico inmaduro se deben a diversos factores, entre los cuales destacan el contenido de amonio, ácidos volátiles orgánicos, metales pesados y de sales; que en elevadas concentraciones, pueden generar efectos perjudiciales en el desarrollo de las plantas inhibiendo la germinación de semillas o el crecimiento de raíces por lo que significa mucho riesgo su utilización en cultivos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ing. Ambiental de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2. CRONOGRAMA DE TRABAJO

La investigación se llevó a cabo en un período de 12 meses, de abril del 2013 a Marzo del 2014.

En el Cuadro 5 se describen las tres actividades llevadas a cabo en la presente investigación, mencionando a su vez las etapas que componen cada una de las actividades.

Cuadro 5. Duración de la investigación por etapas.

Actividad	Etapas	Fecha de Inicio	Fecha de Término	Duración (días)
Actividad 1: Determinación de la Actividad Metanogénica (AME)	Etapa 1: Toma de muestras materia prima	23/09/2013	25/09/2013	2 días
	Etapa 2: Elaboración de formulaciones de <i>Ulva lactuca</i> y contenido ruminal	07/10/2013	08/10/2013	1 día
	Etapa 3: Incubación de microorganismos metanogénicos.	08/10/2013	23/10/2013	15 días
	Análisis de Sólidos totales de las formulaciones	25/10/2013	27/10/2013	2 días
	Etapa 4: Armado de sistemas para determinación de Actividad Metanogénica	29/10/2013	31/10/2013	2 días
	Etapa 5 Determinación de la Actividad Metanogénica	01/11/2013	08/11/2013	7 días
Actividad 2: Determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	Etapa 1: Caracterización de los Residuos orgánicos del comedor Universitario. Análisis de Humedad, Carbono y Nitrógeno (residuos del comedor)	10/11/2013	17/11/2013	12 días
	Etapa 2: Armado del sistema Potencial Bioquímico de Metano	26/11/2013	27/11/2013	1 día
	Etapa 3: Fase experimental determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	27/11/2013	14/11/2013	17 días
Actividad 3: Prueba de Biogerminación	Etapa 1: Elaboración de la prueba de biogerminación	16/12/2013	16/12/2013	1 día
	Etapa 2: Fase experimental biogerminación	16/12/2013	21/12/2013	5 días
Redacción	Análisis de laboratorio y redacción de trabajo de investigación	25/01/2014	25/03/2014	60 días

Fuente: Elaboración propia.

Para cumplir con los objetivos de la presente investigación se planteó como se muestra en el Cuadro 5 el desarrollo de tres actividades las cuales se desarrollaron a escala laboratorio.

3.3. ACTIVIDAD 1: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD METANOGENICA (AME)

Esta etapa tuvo por objetivo obtener a partir de la mezcla de la macroalga *Ulva lactuca* y el contenido ruminal, un inóculo, con tales características que puedan usarse para la generación de metano en la prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM). Para lo cual se incubaron 4 mezclas por 15 días, finalizando este tiempo se plantearon 4 tratamientos a partir de las 4 mezclas previamente incubadas. La prueba de determinación de Actividad Metanogénica (AME) se aplicó con la finalidad de obtener el inóculo con las mejores resultados de velocidad de generación de metano (CH_4), es decir el inóculo que contenga los microorganismos metanogénicos con la mayor capacidad de convertir una cantidad conocida de substratos orgánicos en CH_4 a lo largo de un período de tiempo reportados en $\text{ml CH}_4/\text{g SSV día}$.

La presente actividad agrupó cinco etapas las cuales se describen a continuación:

3.3.1. ETAPA 1 – TOMA DE MUESTRA DE LA MATERIA PRIMA

Se tomaron muestras representativas de *Ulva lactuca* de la playa la Arenilla, ubicado en La Punta – Callao y contenido ruminal del Centro Camal Yerbateros, insumos que se utilizaron en la presente investigación.

a. Materiales

- Botas de jebe
- Guantes de jebe
- Bolsas de polietileno de densidad 20x14x4
- Frasco de vidrio 4 L

b. Procedimiento

Se tomó una muestra de 3 kg de la macroalga *Ulva lactuca* de la playa la Arenilla, ubicado en La Punta – Callao tal como se muestra en la Figura 1 y 2, la muestra se almacenó en bolsas herméticas y fueron trasladadas al laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UNALM. En el Anexo 1 se muestra el reporte de laboratorio de la *Ulva lactuca*.



Figura 1: Lugar de estudio La Punta – Callao



Figura 2: Extracción de *Ulva lactuca* en La Punta

De igual manera se tomó una muestra del contenido ruminal, el primer compartimiento y el más grande de estómago de la vaca, en un frasco de 4 litros del Centro Camal de Yerbateros ubicado en el distrito de San Luis como se muestra en la Figura 3. El frasco se cerró herméticamente y se almacenó para ser usado durante toda la etapa de investigación.

Adicionalmente, se recolectó contenido ruminal en un frasco de 1 L para ser enviada al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM para analizar la composición nutricional y fisicoquímica del contenido ruminal y de las algas. En el Anexo 2 se muestra el reporte del análisis Agronómico al contenido ruminal.



Figura 3. Colecta del contenido ruminal.

3.3.2. ETAPA 2 – ELABORACIÓN E INCUBACIÓN DE LAS MEZCLAS DE *Ulva lactuca* Y CONTENIDO RUMINAL

Esta etapa se trituraron *Ulva lactuca* y contenido ruminal para luego ser calentado y finalmente se incubó con la finalidad de obtener un inóculo, que sirvió de insumo en la siguiente etapa, prueba de Determinación de Actividad Metanogénica (AME).

a. Materiales

- *Ulva lactuca*
- Contenido ruminal
- Balanza electrónica
- Licuadora
- Vasos beaker 250 ml
- Mangas de material plástico
- Mandil de laboratorio
- Mascarilla descartable
- Frascos Winkler de 300 ml

b. Procedimiento

Se trituraron las muestras de *Ulva lactuca* con ayuda de una licuadora, luego fueron calentadas hasta llegar a una temperatura entre 80 y 90 °C durante 10 minutos, seguidamente se dejó enfriar, con el objetivo de que las macroalgas al ser sometidos al calor se encuentren estructuralmente biodisponible a la acción de los microorganismos presentes en el contenido ruminal, luego de alcanzar la temperatura mencionada se dejó enfriar la muestra de macroalga y seguidamente se almacenó hasta el momento de su uso (Ver la Figura 4).



Figura 4. Preparación de la muestra.

Experimentalmente se evaluó un volumen de contenido ruminal constante (150 ml) y 100 ml de *Ulva lactuca* en diferentes concentraciones, diluída al 20%, 30%, 50% con agua destilada, y una última concentración del 100% es decir “alga pura” las cantidades fueron tomadas en relación peso de alga y volumen de contenido ruminal gr/ml y se procedió al llenado de los frascos según el siguiente planteamiento:

- Blanco: Contenido ruminal
- Tratamiento 1: Mezcla de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 20%
- Tratamiento 2: Mezcla de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 30%
- Tratamiento 3: Mezcla de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 50%
- Tratamiento 4: Mezcla de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 100%

Cada tratamiento planteado analiza las condiciones de la mezcla de contenido ruminal y *Ulva lactuca* que favorece el crecimiento de microorganismos, responsables directos de la producción de metano.

Cada uno de estas formulaciones mostradas en la Figura 5 se prepararon por triplicado. Antes de cerrar los frascos se midió el pH y el potencial Redox de las muestras y se homogeneizó. Adicionalmente se colocó cada frasco en bolsas, creando condiciones anaerobias, propias de la metanogénesis. Los frascos se incubaron a una temperatura de 20 °C por 15 días (Acuña *et al.*, 2008). Pasado los 15 días se volvió a medir el pH y el potencial Redox.



Figura 5. Mezclas de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 20%, 30%, 50% y 100% de dilución.

c. Métodos de análisis

- Medición del pH

La medición del pH fue se realizó mediante el método potenciométrico, a través de la medición directa, introduciendo el electrodo del potenciómetro en la muestra. Considerándose como lectura válida al valor que se mantuvo por 10 segundo constante aproximadamente. El equipo previamente fue calibrado usando soluciones buffer de pH 4 y pH 7.

- Análisis agronómico

El análisis de la composición nutricional y fisicoquímica de las *Ulva lactuca* y el contenido ruminal fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas,

Aguas y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM donde se analizaron el pH, Conductividad Eléctrica (C.E.), el porcentaje de Materia Orgánica (M.O.), N, P₂O₅, K₂O, de CaO, y de MgO, Na y de humedad (Hd) y los ppm de Cu, Zn, Mn, Fe y B y finalmente los ppm de los metales Pb, Cd y Cr.

d. Cálculo de la etapa AME

Esta etapa se realizó en el laboratorio de Ingeniería Ambiental, dada la disponibilidad de los equipos que se necesitaban. Para realizar la formulación de las mezclas se utilizaron las muestras recolectadas las cuales fueron pesados en una balanza electrónica y distribuidas en vasos precipitados y finalmente vertidos en los frascos winkler.

El frasco usado fue de un volumen total de 300 ml de los cuales se usó para la mezcla un volumen de 250 ml dejándose el espacio restante para la acumulación de gas generados por la mezcla.

Se planteó usar 150 ml de contenido ruminal en la mezcla y los 100 ml restantes con *Ulva lactuca* diluidas con agua destilada al 20, 30, 50 y 100 %, como se describe a continuación:

Dilución de *Ulva lactuca* al 20%

$$X*(20 \text{ ml } Ulva \text{ lactuca} + 100 \text{ ml agua destilada}) = 100 \text{ ml}$$

$$X = 0.83$$

Por lo tanto el contenido de *Ulva lactuca* en la dilución al 20% será de:

$$20*0.83 = 16.7 \text{ ml } Ulva \text{ lactuca}$$

$$100* 0.83 = 83.3 \text{ ml agua destilada}$$

De la misma manera se calculó para las otras 3 concentraciones presentadas a continuación en el Cuadro 6:

Cuadro 6. Volúmenes de carga de materia prima

Tratamientos	Volumen de contenido ruminal	Volumen de <i>Ulva lactuca</i>		Volumen Total
		<i>Ulva lactuca</i>	Agua destilada	
Blanco: Sólo contenido ruminal	250 ml	0,0 ml	0,0 ml	250 ml
Tratamiento 1: <i>Ulva lactuca</i> 20%	150 ml	16,7 ml	83,3 ml	250 ml
Tratamiento 2: <i>Ulva lactuca</i> 30%	150 ml	23,1 ml	76,9 ml	250 ml
Tratamiento 3: <i>Ulva lactuca</i> 50%	150 ml	33,3 ml	66,7 ml	250 ml
Tratamiento 4: <i>Ulva lactuca</i> 100 %	150 ml	100 ml	0 ml	250 ml

Fuente: Elaboración propia

3.3.3. ETAPA 3 – ARMADO DEL SISTEMA DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGENICA (AME)

Para la determinación de la actividad metanogénica (AME) se requirió el armado de 5 sistemas.

a. Materiales

- Frascos de vidrio de 500 ml
- Mangueras delgadas de jebe
- Aguja de inyectables
- Soportes
- Probetas graduadas de 100 ml
- Cápsulas de porcelana

- Mufla Marca Darlish
- Estufa Marca Memmert
- Balanza Analítica Marca Sartorius
- Desecador Marca VWR-USA

b. Procedimiento

El montaje del sistema que sirvió para la determinación de la actividad metanogénica (AME) comenzó con la instalación del sistema de transporte de gas metano del reactor al frasco contenido de NaOH (2M) y del frasco con NaOH al frasco graduado donde se colectará el volumen de NaOH desplazado. Se consideró usar fenoftaleína como indicador de pH pues permitiría identificar la saturación de la preparación de NaOH evidenciando cambio al color rosado o magenta a un pH = 9,8.

Se taladraron las tapas de los frascos usados en la prueba y se les colocó el sistema de transporte de gases a presión en los agujeros de las tapas. Para la fabricación de estos sistemas colocados en las tapas de los frascos del reactor y del frasco conteniendo NaOH se utilizaron Agujas inyectables, mangueras de jebe, tapones de caucho y se procedió al armado tal como se muestra en la Figura 6. Como reactores se usaron frascos de PIREX de 500 ml.

Culminado los 15 días de incubación se realizó la determinación de Sólidos volátiles (SV) de los 4 tratamientos y el blanco.



Figura 6. Armado del sistema de Determinación de Actividad Metanogénica

c. Métodos de análisis

- Sólidos volátiles

Aquella porción de los sólidos que se volatiliza cuando se quema en una mufla a 550 °C, generalmente se determina en conjunto con los sólidos totales, puede estar dado en porcentaje (%) o mg/L, este método bajo la norma Standard methods N° 2540 D (APHA).

d. Cálculos

La determinación de los sólidos volátiles se realizó en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UNALM. Se tomó un peso de muestra homogeneizada en gramos de cada frasco. Se promediaron los resultados de las tres repeticiones por cada tratamiento. El Cuadro 7 muestra los valores de sólidos volátiles (SV) utilizados en la Determinación de Actividad metanogénica.

Cuadro 7. Cálculo de sólidos volátiles de los tratamientos

Tratamiento	Sólidos volátiles (g SV/L)
Blanco: Sólo contenido ruminal	33.2
Tratamiento 1: <i>Ulva lactuca</i> 20%	47.4
Tratamiento 2: <i>Ulva lactuca</i> 30%	32.6
Tratamiento 3: <i>Ulva lactuca</i> 50%	34.4
Tratamiento 4: <i>Ulva lactuca</i> 100%	34.1

Fuente: Elaboración propia

3.3.4. ETAPA 4 - DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD METANOGENICA (AME)

El objetivo de esta etapa fue hallar el tratamiento con las mejores características de actividad metanogénica, la cual también sirvió para las siguientes etapas.

a. Materiales

- Pipetas
- Bicarbonato de sodio (1 g/L)
- Sulfuro de sodio (100 mg/L)
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio
- Ácido acético
- Potenciómetro marca HANNA
- Termómetro Marca Boeco
- Balanza Analítica Marca Sartorius

b. Procedimiento

Luego de obtener los resultados de sólidos volátiles (SV) y de acuerdo a la adaptación del método propuesto por Soto *et al.* (1992), se logró calcular la cantidad de inóculo (ml) que se requiere adicionar en cada reactor para dar inicio a la determinación de la actividad metanogénica (AME).

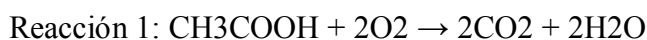
Se tomaron 4 muestras de los tratamientos incubados en la etapa 2 para ser usados en esta etapa como inóculos. También se realizó una prueba de sólo contenido ruminal, llamada blanco.

Los tratamientos se nombraron de la siguiente manera:

- Blanco: Sólo contenido ruminal
- Tratamiento 1: *Ulva lactuca* 20%
- Tratamiento 2: *Ulva lactuca* 30%
- Tratamiento 3: *Ulva lactuca* 50%
- Tratamiento 4: *Ulva lactuca* 100%

Para determinar la actividad metanogénica de cada tratamiento se usó un volumen de ácido acético, tal que, traducido en términos de DQO fuera de concentración 2 g DQO/L.

Así, se procedió a determinar la cantidad (en peso) que se necesita de ácido acético según la siguiente reacción.



Luego se utilizó la densidad del ácido acético para obtener el volumen necesario, resultando un valor de 0.9 ml de ácido acético al realizar la prueba con 500 ml de volumen del reactor.

La concentración de inóculo o biomasa inicial se expresa generalmente como la concentración en sólidos volátiles del lodo, debido a que no se puede determinar de una manera simple la concentración de microorganismos de un grupo bacteriano específico.

El digestor se conectó a un frasco de Mariotte que contenía una disolución de NaOH de 25 g/L. En el frasco se recoge el biogás producido en el digestor, el CO₂ del biogás reacciona con la solución de NaOH, formando carbonato. De esta forma sólo el metano alcanza el espacio libre de la botella de sosa, desplazando un volumen equivalente de líquido. El volumen desplazado fue colectado en una probeta calibrada a lo largo del tiempo tal como se muestra en la Figura 7.

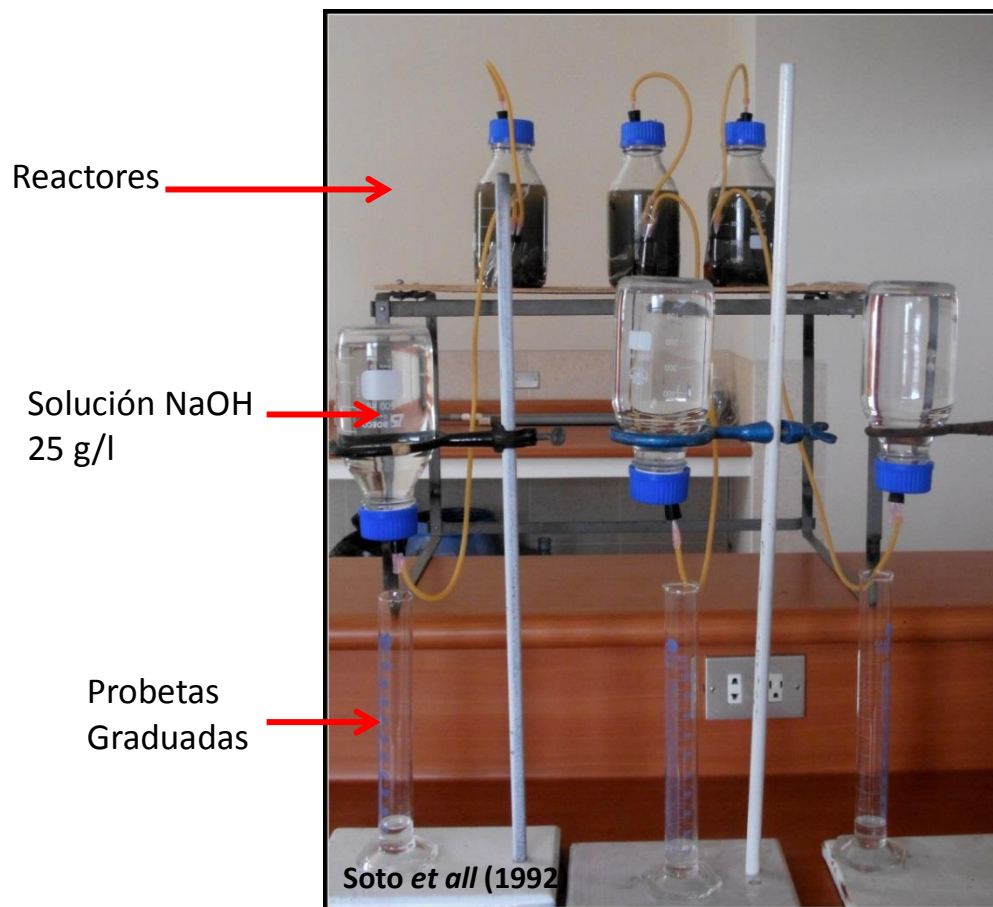


Figura 7. Sistema armado de Determinación Actividad Metanogénica (AME)

c. Métodos de análisis

La medición del pH fue a través del método potenciométrico. En esta etapa de la investigación se evaluó el pH al inicio y al final de la prueba.

d. Cálculos para determinación de la Actividad Metanogénica

Se realizó los siguientes cálculos

- Determinación del volumen de carga de inóculo (V2)

El sistema que usó Soto *et al.* (1992) se basó en un digestor de 500 ml y un lodo de 5 g SV/L, de manera que para la presente investigación primero se determinó el valor de sólidos volátiles (SV) el cual indicará la concentración C2 del lodo y a partir de la siguiente fórmula se determinó el volumen V2 del lodo que se necesita agregar al digestor para llevarse a cabo la prueba AME.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Dónde:

V1: Volumen del digestor (500 ml)

C1: Concentración del lodo usado por Soto (5 g SV/L)

V2: Volumen por hallar

C2: Concentración g SV/L del inóculo de la investigación.

Los valores C2 (g SV/L) mostrados en el Cuadro 8 fueron reemplazados en la ecuación anterior y se halló el valor V2 (ml) los cuales fueron cargados en los reactores para cada tratamiento planteado.

Cuadro 8. Cálculo del volumen de carga del reactor AME

Nº	Tratamiento	Concentración del inóculo (C2) g SV/L	Volumen de inóculo (V2) ml
1	Tratamiento 20%	47.44	52.70
2	Tratamiento 30%	32.63	76.62
3	Tratamiento 50%	34.43	72.61
4	Tratamiento 100%	34.12	73.27

Fuente: Elaboración propia

- Determinación de la Actividad Metanogénica (AME)

La Actividad Metanogénica se calculó a partir de la velocidad de producción de metano, según la ecuación (Soto et al., 1992):

$$\text{Ecuación 1: } (AME)_{CH_4} = (dV_{CH_4}/dt) / (X_o) (V_r \text{ ft}) \text{ g DQO}_{CH_4}/\text{g SSV.d}$$

Dónde:

$(AME)_{CH_4}$: Actividad Metanogénica

dV_{CH_4}/dt : Velocidad de producción de metano

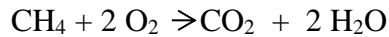
V_r : Volumen activo del reactor

X_o : Masa de Microorganismos, dado por los SSV del Lodo.

ft: Factor de conversión que representa la DQO por unidad de volumen de metano. Este factor depende de la temperatura y humedad del gas y toma los valores de (1/385) g DQO/ml CH_4 para metano húmedo a 20°C.

Para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

La equivalencia en DQO del CH_4 es como sigue:



De la ecuación: Por 1 mol de CH₄ (16 g) consumida, 2 moles de O₂ equivalente se consumen (64 g).

Es decir 0,0156 mol de CH₄ es equivalente a 1 g de O₂ (DQO).

Usando la ecuación de los gases ideales se calcula el volumen de CH₄ equivalente a 1 g DQO consumida, a las condiciones de 20 °C y 740 mmHg (0,97 atm) de presión:

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

Dónde:

P: presión 740 mmHg o 0.97 atm

V: volumen a hallar

n: 0.0156 mol

R: 0,082 L.atm/mol.K

T: 20 °C o 293 Kelvin

Por lo tanto:

$$0.97 \text{ atm} \cdot V = 0.0156 \text{ mol} \cdot 0.082 \text{ L.atm/mol.K} \cdot (20+273)\text{K}$$

$$V = 0.386 \text{ L} = 386 \text{ ml}$$

Finalmente la actividad se expresa en g DQO/ g SV.día y se calculó a partir de la velocidad de producción de metano para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = (X \text{ ml CH}_4/\text{h}) \cdot (24 \text{ h/día}) \cdot (1 \text{ g DQO}/386 \text{ ml CH}_4) \cdot (1/2.5 \text{ g SV})$$

e. Procesamiento de los datos

Durante la digestión por lotes, las tasas de producción de biogás y contenido de metano cambian considerablemente en el tiempo de digestión, una manera fácil de tener todo registrado y ordenado fue usando la herramienta Excel. En el Anexo 3 se muestra la base de datos recogida durante la realización de la prueba AME.

f. Análisis estadístico

La importancia de las diferencias en la actividad metanogénica en los 4 tratamientos se determinó mediante Análisis de factor único de varianza (ANOVA) en el software Minitab 16. Los resultados se muestran en el Anexo 4.

3.4. ACTIVIDAD 2 – DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

Esta fue la parte principal de la investigación pues a partir los resultados obtenidos se pudo plantear realizar un tratamiento donde se compruebe que el inóculo a base de contenido ruminal y *Ulva lactuca* son aprovechables en la producción de metano.

3.4.1. ETAPA 1: ANALISIS DE HUMEDAD Y RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO DE LA MATERIA PRIMA

El análisis del Carbono, Nitrógeno y Humedad de la *Ulva lactuca*, contenido ruminal y los residuos orgánicos del comedor universitario se realizó con la finalidad de evaluar si esta materia prima tendría buenos resultados en la prueba de determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM). En el Cuadro 9 se muestran los resultados de este análisis.

a. Materiales

- *Ulva lactuca*
- Contenido ruminal
- Residuos orgánicos del comedor universitario UNALM

b. Procedimiento

Se tomó una muestra compuesta de los residuos orgánicos del comedor previamente recolectados por 7 días las cuales fueron enviadas al laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Asimismo, una muestra de contenido ruminal y *Ulva lactuca* fueron enviados al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF).

c. Métodos de análisis

- Sólidos totales

Aquella porción de sólidos que se quema en un horno de 103 – 105 °C. Este método bajo la norma Standard methods N° 2540 E (APHA).

- Sólidos volátiles

Aquella porción de los sólidos que se volatiliza cuando se quema en una mufla a 550 °C, generalmente se determina en conjunto con los sólidos totales, puede estar dado en porcentaje (%) o mg/L, este método bajo la norma Standard methods N° 2540 D (APHA).

- Relación carbono/nitrógeno y humedad

Estos valores se obtuvieron tanto de los laboratorios de Análisis Químico de la UNALM y en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF).

d. Cálculo del Potencial Bioquímico de Metano

- Parámetros químicos y sólidos totales y sólidos volátiles

De los análisis realizados los laboratorios de Análisis Químico de la UNALM y en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF) se obtuvieron los valores descritos en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Contenido de Humedad y Relación Carbono:Nitrógeno (C/N)

Muestra	% Humedad	% Carbono	% Nitrógeno	Relación C/N
<i>Ulva lactuca</i>	86,04	23.17	1.68	13.79
Contenido ruminal	93.52	25.0	2.0	12.5
Residuos Orgánicos del comedor UNALM	84.3	8.66	0.39	22.21

Fuente: Elaboración propia

Los volúmenes de carga en los reactores para la determinación del Potencial Bioquímico de Metano (PBM) se calcularon a partir de los datos de Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles (SV) del inóculo y sustrato, tal como se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Cálculo de Sólidos Totales y Sólidos Volátiles para prueba PBM

Muestra	% Sólidos Totales (ST)	% Sólidos Volátiles (SV)
Residuos Orgánicos comedor Universitario	16.58	15.66
Contenido ruminal	5.08	3.44
Contenido ruminal + <i>Ulva lactuca</i> 100%	4.81	3.41

Fuente: Elaboración propia

3.4.2. ETAPA 2: ARMADO DEL SISTEMA DE DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

Se llevaron a cabo tres repeticiones por el tratamiento planteado, asimismo se realizó un blanco por el tratamiento razón por la cual se armaron en total 6 sistemas para obtención de metano (CH_4) y 6 sistemas para obtención de biogás.

a. Materiales

- Equipo baño maría
- Frascos de vidrio PIREX de 500 ml
- Frascos PIREX de 1000 ml
- Vasos de precipitación PIREX de 1000 ml
- NaOH 2M
- Agua destilada
- Cánula de vidrio de 7 cm de diámetro
- Manguera negra de PVC de 5 ½
- Manguera acaramelada 7 ½
- Tapones de jebe y silicona
- Taladro y brocas
- Mechero
- Probeta graduada

b. Procedimiento

La construcción de los 12 sistemas comenzó con el armado del sistema de conducción del gas y líquido entre los reactores para lo cual se utilizaron tapones de jebes, cánulas de vidrio y mangueras unidas a presión, al finalizar y antes de poner en uso este sistema se probó para evitar problemas de fugas de gas o agua (Drosg *et al.* 2013).

Para la realización de este sistema se requirió un equipo de baño maría, con la cual se pudo controlar la temperatura constante de 35 °C durante los 17 días, tiempo que duró la prueba.

Se dispuso los 12 sistemas tal como se muestra en la Figura 8.

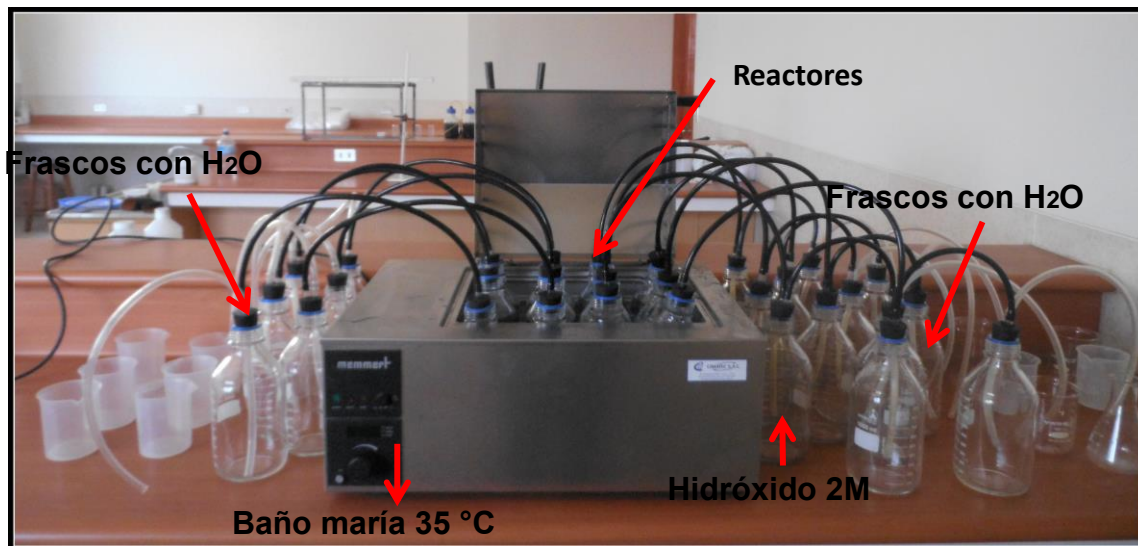


Figura 8. Sistema Armado Potencial Bioquímico de Metano

ETAPA 3: DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

La prueba de PBM por lote se llevó a cabo por triplicado. Los reactores consistían en botellas de vidrio de 500 ml las que contaban con un punto de salida para que el biogás fluya como se muestra en la Figura 8, este sistema estuvo dentro de un equipo de baño maría programado a 35 °C el cuál funcionó continuamente el tiempo de duración de la prueba. Asimismo se prepararon 3 muestras en blanco, es decir de sólo inóculo sin sustrato, los

resultados de esta prueba PBM se restaron de la curva de rendimiento de la producción de biogas y metano del tratamiento PBM que presenta el sustrato.

a. Materiales

- Tratamiento 4: Contenido ruminal + *Ulva lactuca* 100%
- Sustrato: Residuos Sólidos del comedor Universitario UNALM
- Potenciómetro

b. Procedimiento

A partir de los valores de Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles (SV) del inóculo (contenido ruminal + *Ulva lactuca* al 100 %) y el sustrato (residuos orgánicos del comedor UNALM) se realizaron los cálculos de volumen de carga para los reactores.

Se pesaron los volúmenes de muestra a cargar y se vertieron a los reactores, se midió el pH de cada reactor, se reguló a pH 7 y enseguida se taparon los reactores, luego se taparon los frascos contenidos con NaOH y por último los frascos con agua. A partir de ese momento comenzó la cuantificación de metano.

Los cálculos para determinar el volumen de carga se realizaron en base a la siguiente condición:

- Condición: la proporción de los sólidos volátiles del sustrato/Inóculo debe ser ≤ 0.5

Una vez con las cantidades correctas de inóculo y sustrato se pesó y se colocó finalmente en los reactores. Se ajustó el pH hacia valores adecuados de metanogénesis, luego se taparon y sellaron los frascos para evitar fugas.

c. Métodos de análisis

Se llevaron a cabo los siguientes análisis para que en la etapa 2 se obtengan buenos resultados.

- Medición del pH

La medición de pH fue a través del método potenciométrico a través de la medición directa.

- Medición del biogás y metano (CH₄)

Se obtuvieron ambos valores de la prueba de Potencial Bioquímico de Metano

- Análisis microbiológico

El análisis microbiológico al finalizar el tratamiento fue realizado en el Laboratorio de Ecología Microbiana Marino Tabusso, siguiendo la metodología de la ICMSF (1993), este análisis incluyó la enumeración de coliformes totales y coliformes fecales. La hoja de resultados se adjunta en el Anexo 5.

Con dichos ensayos microbiológicos se logró determinar las condiciones sanitarias del biol, producto de la Prueba de Potencial Bioquímico de metano.

- Análisis agronómico

El análisis de la composición nutricional y fisicoquímica de la parte líquida del bioabono (biol) fueron realizados en al LASPAF donde se evaluó el pH, conductividad eléctrica, sólidos totales, materia orgánica en solución; Nitrógeno total, fósforo total, Potasio total, Calcio total, Magnesio total, Sodio total, Hierro total, Cobre total, Zinc total, Manganeso total y Boro total, además se analizó los metales pesados Plomo total, Cadmio total y Cromo total. La hoja de resultados se muestra en el Anexo 6.

d. Cálculos

- Cálculo del volumen de carga de sustrato

Para determinar el volumen de carga se partió de 2 condición dadas por el método PBM Drog et al (2013).

Condición 1: la proporción de los sólidos volátiles del sustrato/Inóculo debe ser ≤ 0.5

Datos:

SV1: Porcentaje de Sólidos volátiles del sustrato: 15,6%

SV2: Porcentaje de Sólidos volátiles del inóculo: 3,4%

$$X \text{ (ml)} * \%SV1 \text{ sustrato} / 250 \text{ ml} * \%SV2 \text{ inóculo} \leq 0.5$$

$$V \text{ (ml) sustrato} * 15.65\% / 250 \text{ ml} * 3.4\% \leq 0.5 \text{ (máximo)}$$

$$\text{Volúmen de sustrato} \leq 27.15 \text{ (máximo)}$$

El máximo volumen de sustrato que se puede adicionar al reactor es 27,15 ml

Condición 2: La proporción de los Sólidos Totales de inóculo y sustrato no debe pasar el 10% partiendo de que el peso de inóculo que se debe agregar al reactor es la mitad de la capacidad total del reactor (ml).

Datos:

V inóculo: 250 ml

%ST inóculo: Sólidos totales sustrato: 16,5%

V sustrato: 25 ml

% ST sustrato: Sólidos totales inóculo: 4,8%

$$V(\text{ml})_{\text{inóculo}} * \%ST_{\text{inóculo}} + V(\text{ml})_{\text{sustrato}} * \%ST_{\text{sustrato}} = V(\text{ml})_{\text{mezcla}} * \%ST_{\text{mezcla}}$$

$$(250 \text{ ml} * 4.8\% + 25 \text{ ml} * 16.5\%) = 275 \text{ ml} * X$$

$$X = 5.86\%$$

- Cálculo de producción de metano (CH_4)

La producción de biogás y metano diaria de cada digestor en el ensayo de lote se determinó por el volumen de biogás y metano producido, que se calcula a partir del volumen y la presión en el espacio superior del digestor.

Los volúmenes de biogás y metano se ajustaron a los volúmenes a temperatura estándar (0°C) y presión (1 atm), como se describe a continuación:

$$V_{\text{STP}} = V_T * 273 * (760 - P_w) / (273 + T) * 760$$

Dónde:

V_{STP} : Volumen de gas medido a temperatura y presión estándar

V_T : Volumen de gas medido a temperatura T

T: Temperatura del gas de fermentación ($^\circ\text{C}$)

P_w : Presión de vapor del agua como una función de la temperatura (mmHg), la presión de vapor del agua a 35°C es 42, 175. En el anexo 7 se adjunta la tabla de presión de vapor a 35°C usados en la prueba.

e. Procesamiento de datos

Durante la digestión por lotes, las tasas de producción de biogás y contenido de metano cambian considerablemente en el tiempo de digestión, para registrar de manera clara y continua estos datos, se usó la herramienta Excel. El Anexo 8 se muestra la base de datos de la prueba PBM.

ACTIVIDAD 3: PRUEBA DEL EFECTO DEL BIOL EN SEMILLAS DE LECHUGA

Esta fue la última etapa de la investigación. Pasado el tiempo de digestión anaerobia de los Residuos Orgánicos del comedor Universitario UNALM, se filtró el contenido de los reactores encontrándose 2 residuos, uno sólidos (biosol) y otro líquido (biol). 500 ml de muestra de biol fueron enviados al Laboratorio de Suelos, Plantas, Aguas y Foliar (LASPAF), 250 ml al laboratorio de Microbiología. Con el restante del biol se hizo el bioensayo de germinación.

Se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) variedad tipo Butterhead de campo Crufia de Enza Zaden, obtenidas del Centro de Investigación de Hidroponía y Nutrición Mineral de la UNALM, semillas sin curar es decir sin fungicidas o plaguicidas, las que se caracterizan por ser un cultivo sensible a la concentración de sales y de rápida germinación

3.4.3. MATERIALES EMPLEADOS EN EL ENSAYO

- Semillas *Lactuca sativa L*
- Placas Petri de 10 cm de diámetro descartables esterilizados
- Pinzas
- Papel filtro
- Bolsa negra
- Bandeja
- Pipeta
- pHmetro
- Conductivímetro
- Tijeras y pizetas

3.4.4. PROCEDIMIENTO

Se realizó una prueba presuntiva del biol, utilizando las diluciones de 100/100, 10/100, 1/100, 0.1/100 y 0,01/100 (Sobrero y Ronco, 2004) y como control se usó agua de pozo de la UNALM al igual que en todas las diluciones mencionadas. Esto permitió establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 al 0 % de concentración, necesarios para calcular la concentración de inhibición media.

Las condiciones usadas para evaluar el efecto del fast biol fueron las recomendadas en las prueba de toxicidad con *Lactuca sativa L.* (Sobrero y Ronco, 2004) en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plántulas de lechuga en sus primeros estadios, estos fueron:

- Temperatura
- Calidad de luz, en oscuridad
- Tiempo de duración 120 h
- Efecto medido: Inhibición en elongación de la radícula e hipoclorito
- Inhibición en la germinación
- Resultado final: Inhibición media (CI) 50% y 0%
- Aceptabilidad de los resultados: germinación > 90%

Se usaron en total 420 semillas de lechuga *L. sativa L.* los cuales fueron distribuidas en 21 placas Petri con 20 semillas cada una, se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos ensayados tuvieron diferentes dosis de biol diluidos en agua de pozo de la UNALM, además de un control, solamente con agua de pozo y otro con biol puro, sin diluir. Ver la Figura 9.

Para evaluar el efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo se midieron dichas partes de las plántulas de lechuga utilizando una hoja de papel milimetrado, para cada una de las

plántulas correspondiente a cada tratamiento y control, la Figura 10 muestra el trabajo realizado. Así, para la medida de elongación de radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular.

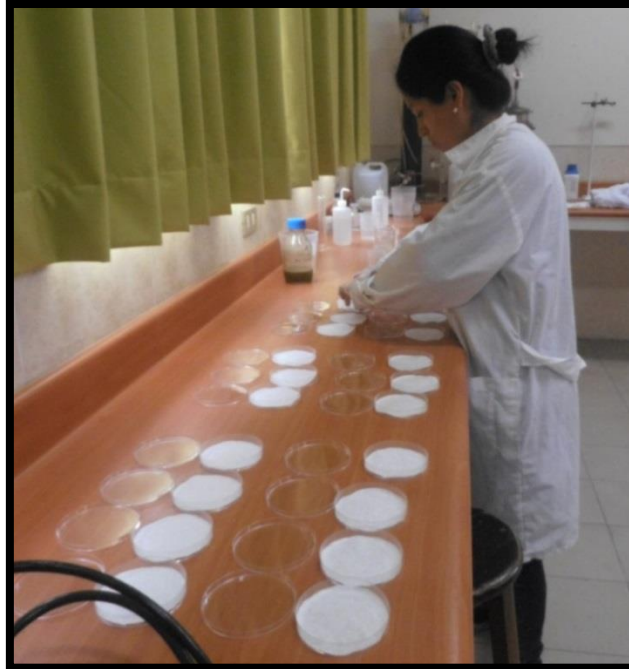


Figura 9. Preparación de la prueba de biogerminación



Figura 10. Realización del Bioensayo de Germinación de plantas de lechuga

Luego de realizadas las mediciones se procedió a los cálculos del índice de germinación de cada tratamiento teniendo como base al tratamiento control. La base de datos del Bioensayo de germinación se muestra en el Anexo 9.

3.4.5. METODOS DE ANÁLISIS

- Medición del pH y conductividad eléctrica

La medida de ambos parámetros se realizó con un potenciómetro

- Conteo de semillas germinadas

Para el conteo de semillas germinadas se usó una pinza y una hoja milimetrada.

3.4.6. CALCULO DEL INDICE DE GERMINACIÓN (IG)

Según la metodología descrita por Tiquia (2000) citado por Varnero *et al.*, 2007 se calculan previamente dos índices: el porcentaje de germinación relativo (PGR) y el crecimiento de radícula relativo (CRR) de cada tratamiento teniendo al tratamiento control como testigo.

$$\text{PGR} = (\# \text{ de semillas germinadas en extracto} / \# \text{ de semillas germinadas en testigo}) * 100$$

$$\text{CRR} = (\text{Elongación de radícula en el extracto} / \text{Elongación de radícula en el testigo}) * 100$$

$$\text{IG} = (\text{PGR} * \text{CRR}) / 100$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS DE LOS MATERIALES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL INÓCULO METANOGÉNICO

Se realizaron análisis a las materias primas usadas en la investigación, también a los productos.

a. Análisis químico de la *Ulva lactuca*

En el Cuadro 11 se tienen los datos de pH y conductividad eléctrica (C.E.) de la *Ulva lactuca* y del contenido ruminal ambos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la UNALM (LASPAF) para la presente investigación.

Cuadro 11. Análisis de pH y C.E.

Material	pH	C.E. (mS/cm)
<i>Ulva lactuca</i>	6.66	23.7
Contenido ruminal	8.05	14.5

Fuente: Elaboración propia

El valor del pH del contenido ruminal es alto, debido a su procedencia. El valor del pH en ambos casos resulta adecuado para la realización de la investigación. La conductividad en la *Ulva lactuca* es alta en comparación con el contenido ruminal. Según (Mendo, 2004) la conductividad alta de la *Ulva lactuca* hace que el bioabono obtenido tenga que ser diluido antes de su aplicación para evitar toxicidad por sales en la planta.

b. Análisis Carbono, Nitrógeno y Humedad a la *Ulva lactuca* y contenido ruminal

Se enviaron las muestras de *Ulva lactuca* y contenido ruminal recién extraídas al LASPAF para su respectivo análisis, los resultados son mostrados en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Análisis a la *Ulva lactuca* Humedad, C, N, C/N

Material	Humedad %	C %	N %	C/N
<i>Ulva lactuca</i>	86	23.17	1.68	13.79
Contenido ruminal	93.52	-	2.0	-

Fuente: Elaboración propia

Del cuadro 12 se tiene que la relación C/N de la *Ulva lactuca* se encuentra entre 10.4 y 13.79, lo cual nos indica que es de fácil descomposición. En referencia al nitrógeno, presenta valores altos, entre 1.68 y 2.52. Asimismo se aprecia un alto contenido de humedad entre 86 y 95%.

c. Análisis físico-químico del contenido ruminal

En el cuadro 13 se presenta el análisis del contenido ruminal reportado por el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la UNALM donde se refleja la presencia de metales pesados en el contenido ruminal, cabe mencionar que la toxicidad de los metales pesados aumenta a menor concentración, afectando de esta manera el desarrollo óptimo de la metanogénesis. En el Anexo 2 se presenta el registro de este análisis.

Cuadro 13. Resultado del Análisis Físico-Químico al contenido ruminal

Muestra	M.O. %	P2O5 %	K2O %	CaO %	MgO %	Na %	Fe ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	B ppm	Pb ppm	Cd ppm	Cr ppm
Contenido ruminal	68.7	2.64	1.21	1.50	0.25	1.66	1376	35	105	187	87	4.75	1.03	1.75

Fuente: Elaboración propia

Se tiene conocimiento que la presencia de nutrientes traza son esenciales para los microorganismos anaeróbicos. Los metales traza como hierro, calcio, magnesio, boro a niveles traza benefician la producción de metano. Por ejemplo concentraciones de sodio entre 0.1 y

0.2 son considerados estimulantes de la metanogénesis, mientras que concentraciones entre 3.5 y 5.5 son considerados inhibitorios, es decir que las concentraciones de los metales encontrados en la *Ulva lactuca* y contenido ruminal no son considerados inhibitorios de la etapa metanogénica.

4.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DIARIA DE METANO DURANTE LA PRIMERA FASE EXPERIMENTAL - AME

A continuación se presentan los valores de actividad metanogénica determinada para las concentraciones del contenido ruminal y *Ulva lactuca* diluida al 20, 30, 50 y 100 %, las cuales presentan una evolución diferente a través del tiempo. Asimismo, se realizó una prueba con contenido ruminal el cual se comparó con los otros 4 tratamientos.

Según la Figura 11 los valores significativos de actividad metanogénica se obtuvieron pasadas las 48 horas (2 días). A partir de la hora 61 hasta la hora 86 se da una producción de CH₄ constante y similar en los tratamientos al 20, 30, 50 y 100% quienes presentan valores de producción de metano (CH₄) entre 23 y 25 ml de CH₄.

A partir de la hora 71 se empezó a notar el despegue en la producción de metano en el tiempo en el tratamiento 4 tal como se muestra en la Figura 11 y lo demuestra la pendiente de producción de CH₄ mostrada en la Figura 15, estos gráficos corresponde a la muestra de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 100%, quien de tener 15.8 ml de CH₄ a la hora 71 aumentó hasta 81 ml de CH₄ a la hora 182.

Desde la hora 250 hasta la hora en que culminó la prueba, hora 298, se registró crecimiento muy lento en los tratamientos de 20, 30, 50 y 100%.

El volumen final de CH₄ del tratamiento 1 (contenido ruminal y *Ulva lactuca* diluida al 20%) fue de 38 ml, asimismo del tratamiento 2 (*Ulva lactuca* diluida al 30%) fue de 39.5 ml, del tratamiento 3 (*Ulva lactuca* diluida al 50%) fue de 48.3 ml y finalmente del tratamiento 4 (*Ulva lactuca* al 100%) fue de 91.8 ml.

Finalmente, el tratamiento realizado sólo con contenido ruminal generó un volumen total de 10 ml de CH₄, el proceso de actividad metanogénica se detuvo a las 168 horas, pasada esta hora no hubo producción de CH₄ en ninguna de las 3 repeticiones representadas en las Figuras 11 y Figura 16, donde se muestra una producción muy pobre de metano a través del tiempo. Este resultado se debe a que hay una gran cantidad de microorganismos metanogénicos que no tienen suficiente cantidad de sustrato para degradar, por lo cual no hay generación de CH₄.

En el Anexo 8 se presenta el registro de los valores de metano (CH₄) para los 5 tratamientos y sus respectivas repeticiones.

En relación a la velocidad de producción de metano, se puede decir que:

Las Figuras 12, 14 y 16 que representan a los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente, presentan una velocidad de producción de metano muy parecidas, sus valores oscilan entre 0.3326 y 0.3969 ml CH₄/h.

El tratamiento 4 presenta una velocidad de producción de metano de 0.4814 ml CH₄/h. Este valor fue el mejor de los 4 tratamientos.

Cabe mencionar que al finalizar la prueba se midió del pH de cada reactor, estando estos dentro del rango de 6.8 y 7.2, lo que indica que el proceso se llevó a cabo de una manera normal, favorable para el desarrollo del proceso metanogénico.

El análisis de actividad metanogénica se llevó a cabo a una temperatura de 20 °C, temperatura promedio del interior del laboratorio de Ingeniería Ambiental.

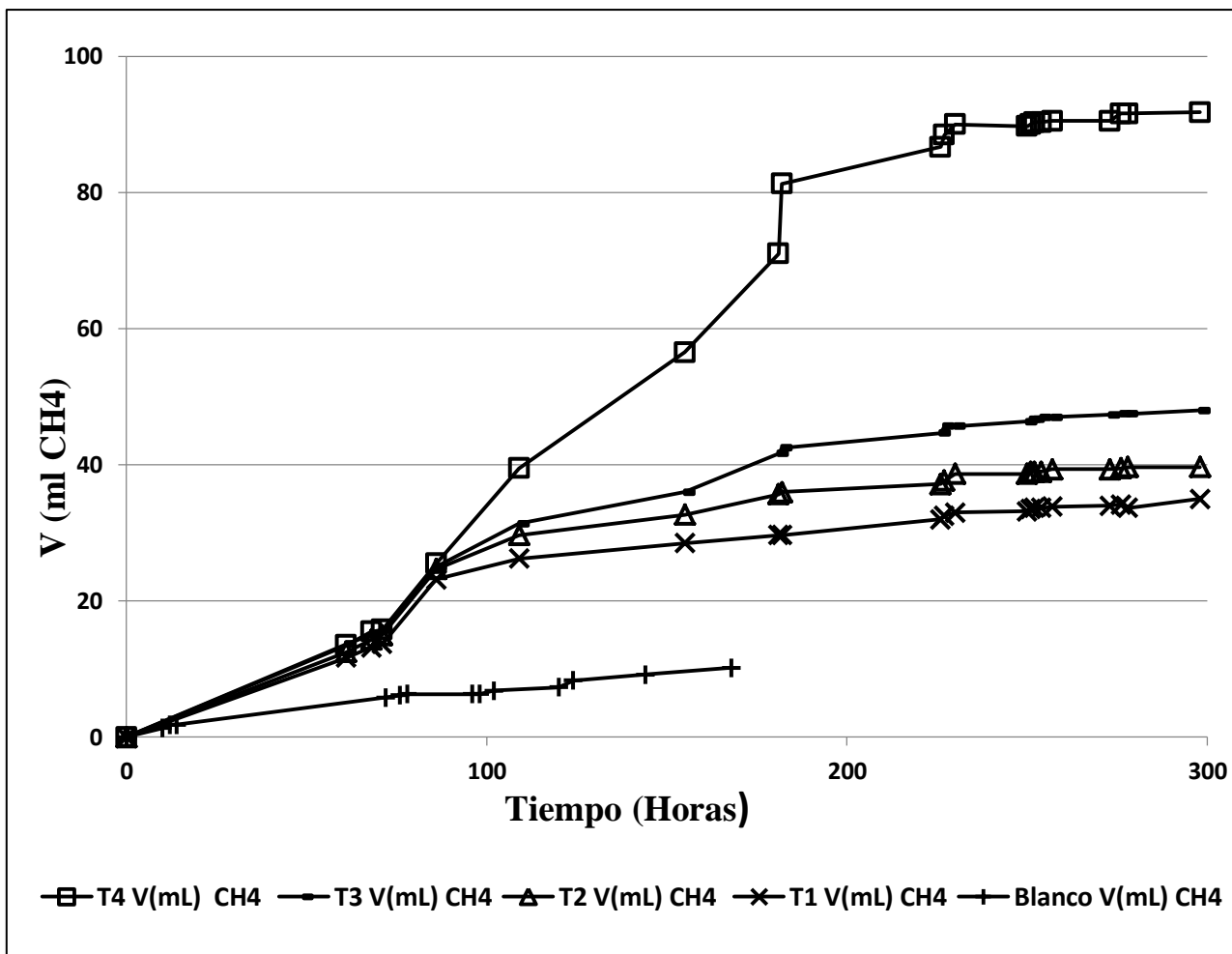


Figura 11. Comportamiento de la Actividad Metanogénica- 20%, 30%, 50%, 100% y Blanco

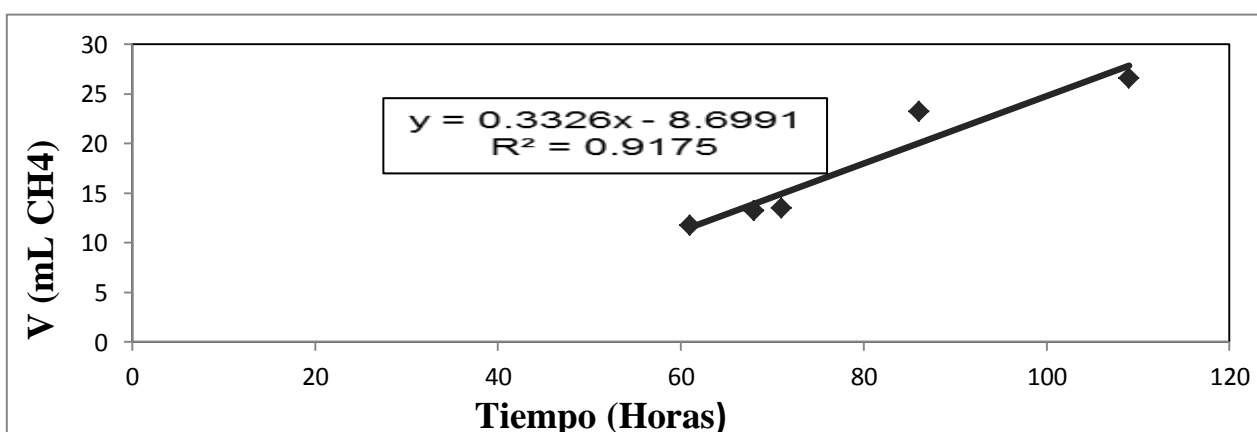


Figura 12. Velocidad de Producción de Metano - 20%

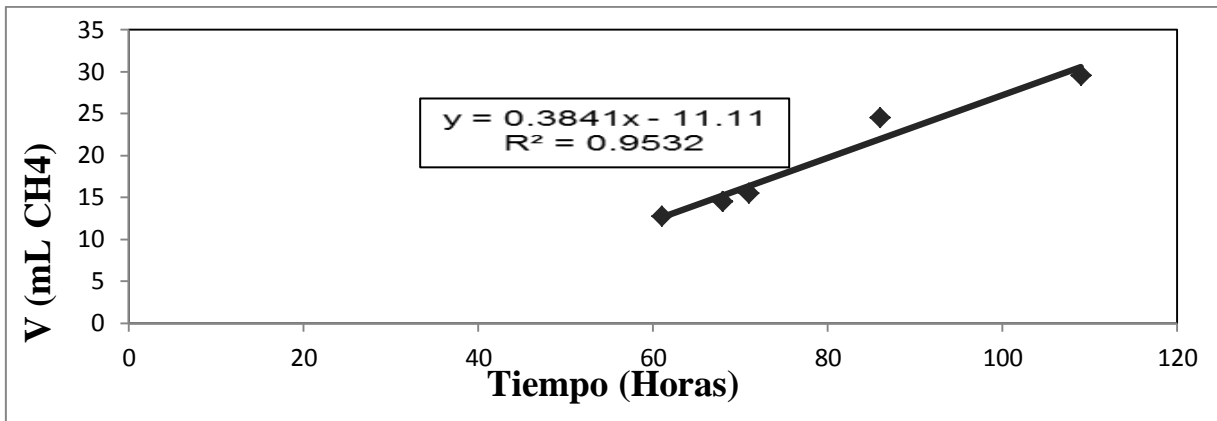


Figura 13. Velocidad de Producción de Metano – 30%

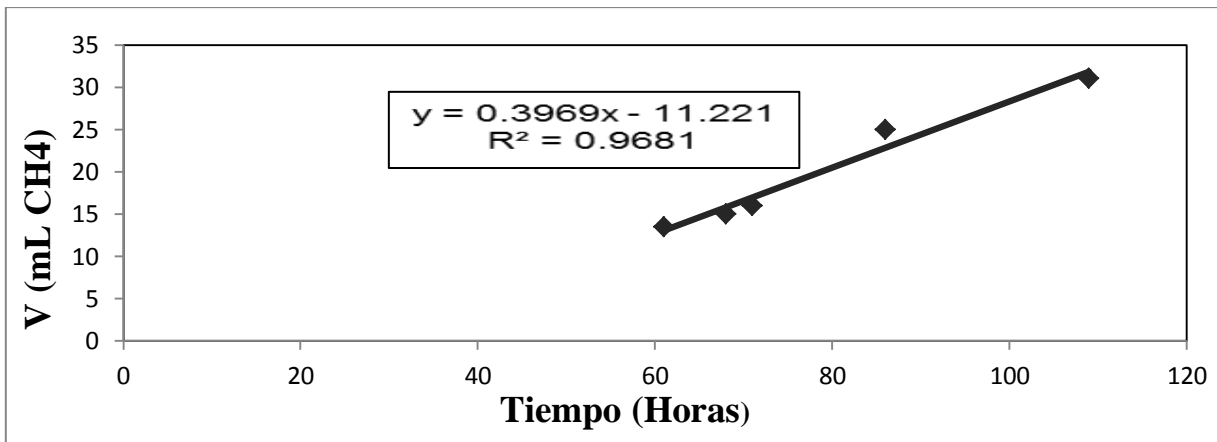


Figura 14. Velocidad de Producción de Metano – 50%

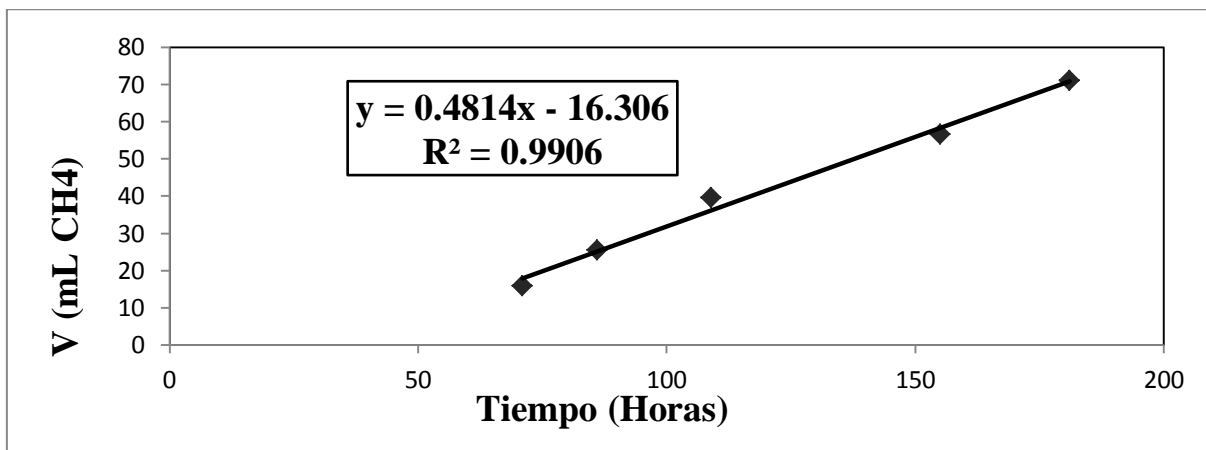


Figura 15. Velocidad de Producción de Metano – 100%

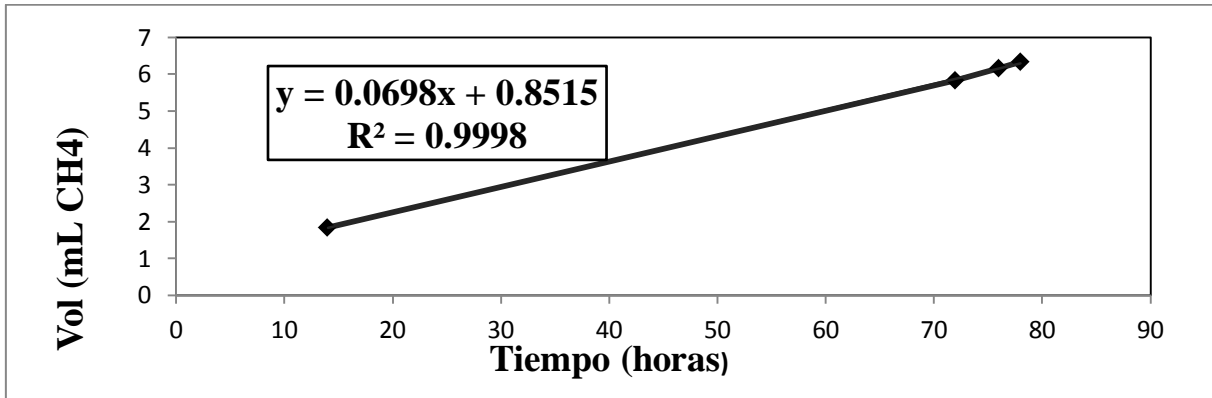


Figura 16. Velocidad de Producción de Metano – contenido ruminal

a. Análisis estadístico de la actividad metanogénica (AME)

Luego de analizar los valores de Actividad Metanogénica mostrados en el Cuadro 14, se puede afirmar que el Tratamiento 4 (*Ulva lactuca* 100%) es el que presenta mejores características para usarse como inóculo, debido a que presentó mayor índice de actividad 0.3426 g DQO/ g SV.día. Si comparamos con la investigación de Torres *et al.* (2002), donde se obtuvieron valores de índice de actividad de entre 0.143 y 0.193 g DQO/ g SV.día de la digestión a partir de un agua residual de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca, podemos resaltar que se obtuvo mejor resultado que todos los tratamientos descrito por Torres *et al.* (2002). Asimismo según la investigación de Lorenzo *et al.* (2013) producto de la actividad metanogénica usando como inóculo un lodo ya estabilizado procedente de un biodigestor y como sustrato vinaza de destilerías a partir de la fermentación de mieles finales de caña, se obtuvo 1.7 g DQO/ g SV.día como resultado de su mejor tratamiento y 0.46 g DQO/ g SV.día

Para complementar los resultados obtenidos por la prueba AME se realizó la prueba estadística mediante el software MINITAB 16 y según la prueba de medias de Tukey existe diferencia significativa entre el T4 y los demás tratamientos con respecto a la actividad metanogénica (Ver Anexo 4), afianzando nuestra elección.

Cuadro 14. Calculo de Actividad Metanogénica

N°	Concentración	Velocidad de producción de metano (ml CH ₄ / h)	Actividad (g DQO/ g SV. día)
T0	Contenido ruminal	0.0698	0.028
T1	<i>Ulva lactuca</i> 20%	0.3326	0,1384 ^b
T2	<i>Ulva lactuca</i> 30%	0,3841	0,1724 ^b
T3	<i>Ulva lactuca</i> 50%	0,3969	0,1616 ^b
T4	<i>Ulva lactuca</i> 100%	0,4814	0,3426 ^a

Nota: Las letras de superíndice corresponden a los resultados de la Prueba de Tukey. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia

4.3. EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO

Se cargó un tratamiento a base de, contenido ruminal y 100% de *Ulva lactuca* (R+100%UL), usado como inóculo, y los residuos orgánicos del comedor universitario UNALM (ROCUU), usado como sustrato. Se realizó un tratamiento con tres repeticiones, para obtener biogás y metano por separado. Adicionalmente se cargó un tratamiento en blanco, requerido por la prueba, es decir que se cargó el reactor con sólo inóculo, sin sustrato.

Los resultados de la caracterización de la materia prima se resumen en el Cuadro 15. El porcentaje de sólidos totales (ST) del sustrato (ROCUU) fue de aproximadamente 3.4 veces mayor que los ST del inóculo (R+100%UL). De igual forma, el porcentaje de sólidos volátiles (SV) del sustrato fue 4.6 veces mayor que los SV del inóculo.

La relación de SV/ST del sustrato fue de 0.94 y la del inóculo fue 0.7, lo que indica que el sustrato contenía materia orgánica más digerible que el inóculo. Se evaluó el pH obteniéndose lo siguiente; el sustrato resultó ácido (pH=5.4) en comparación con el inóculo (pH=6.9). Para contrarrestar la acidez (condición desfavorable para ocurrir metanogénesis) se adicionó Carbonato de calcio hasta obtener un pH adecuado de 7 a 7.2.

Se replicó el sistema de generación de biogás para evaluar la producción de metano.

Cuadro 15. Caracterización de la materia prima

Muestra	% Sólidos Volátiles (SV)	% Sólidos Totales (ST)	pH
Inóculo	3.4	4.8	6.9
sustrato	15.6	16.5	5,1

Fuente: Elaboración propia

De las pruebas mencionadas se obtuvieron los siguientes resultados:

La producción de biogás acumulado (ml/g SV añadido), la producción diaria de biogás (ml/g SV.día) y el contenido de metano en el biogás producido durante la digestión de los ROCUU con R+100%UL, bajo condiciones mesófilas se muestran en las Figuras 17, 18 y 19 respectivamente.

La producción de gas se inició de inmediato en el primer día de digestión en los digestores con sustrato y sin sustrato mostrado.

En la Figura 17, la curva de producción de biogás de la prueba que utiliza sustrato presentó una creciente producción de biogás hasta aproximadamente el tiempo 100 horas luego de haberse iniciado la prueba. A partir del tiempo 104 h, la producción de gas se mantuvo constante, con algunas fluctuaciones (crecimiento) en el tiempo 170 h y 200 h. Después de la hora 400 disminuyó lentamente la producción de biogás hasta cesar, la prueba se dio por terminada en la hora 408. La Figura 18 muestra la prueba dada con residuos dónde la tasa de producción aumenta bruscamente hasta la hora 8 iniciada la digestión y luego presentó una baja hasta la hora 26, volvió a crecer la producción hasta la hora 32 y bajó seguidamente hasta la hora 50. El valor máximo de la tasa de producción de biogás fue 75.3 ml/SV.hora en la hora 56, en adelante, hasta la hora 220 aproximadamente, se vio una tasa de producción de biogás que iba disminuyendo lentamente, se produjo un aumento a la hora 80 y después de eso, se redujo hasta cesar la tasa de producción de biogás, luego de 200 horas.

En cuanto a los digestores sin sustrato, mostraron diferentes patrones de producción de biogás a comparación de la prueba con sustrato. En este caso, la prueba sin el sustrato, se obtuvo 104 ml hasta la hora 100, pasando esta hora se mantuvo constante la producción hasta cesar, dándose por terminada la prueba.

Asimismo la Figura 19 se muestra el contenido de metano en el biogás producido a partir de biodigestores con sustrato y sin sustrato. Es así que el contenido de metano a partir de digestores con sustrato fue de 40% a la hora 8, así fue aumentando en la hora 26 del biogás producido el 46% era CH₄. El crecimiento siguió hasta la hora 76, donde ya registraba un porcentaje de metano de 76%, después de lo cual se mantuvo constante hasta la hora 176 donde se registra una ligera caída del porcentaje de CH₄ (72%) en el biogás hasta la hora 200 con 67% de CH₄. En adelante hasta la hora 338 se produce un ligero aumento del porcentaje de metano (78%) después de lo cual se mantuvo constante por segunda vez pero esta vez durante el resto del período de ensayo.

Cabe resaltar que investigaciones en Dinamarca (Nikolaisen *et al.*, 2011) obtuvo 56% de CH₄ a partir de la biodigestión de *Ulva lactuca* y un inóculo estabilizado. Asimismo en Irlanda según investigaciones de (Allen *et al.*, 2013) se obtuvo 56% de CH₄ de la biodigestión de *Ulva lactuca* y lodo estabilizado de ganado como inóculo. De la misma manera, según (Migliore *et al.*, 2012) usando *Ulva lactuca* y lodo estabilizado de un digestor en funcionamiento en diferentes concentraciones se obtuvo valores entre 20 y 70% de CH₄.

Finalmente cabe resaltar que los resultados de la presente investigación son compatibles con los resultados obtenidos por los autores mencionados en el párrafo anterior.

Los digestores sin sustrato presentaron un comportamiento parecido en relación al porcentaje de CH₄. En tales se obtuvo un porcentaje de 40% a la 8 horas en relación al biogás que produjo, tuvo esta tendencia al crecimiento hasta la hora 104 donde presenta 62% de contenido de metano en el biogás, en adelante permaneció constante el % CH₄ hasta cesar la producción a partir de la hora 200 aproximadamente. El contenido promedio de metano del

biogás producido fue de 68.2% en el digestor con sustrato y de 69.1% en el digestor sin sustrato

Si se toma en cuenta que los reactores que no contenían sustrato tuvieron un porcentaje de metano de hasta 67%, entonces podemos decir que la capacidad de producción de metano del inóculo a base de contenido ruminal y *Ulva lactuca* al 100% es buena.

Asimismo se piensa que el digestor con sustrato ROCUU haya sufrido acidificación, eso explicaría la baja actividad metanogénica durante el período de puesta en marcha del digestor. Cabe indicar que el sistema usado en la prueba PBM no permitía realizar monitoreo permanente, se realizaron 2 únicas evaluaciones, al inicio y al final de la prueba. Según Raposo *et al.* (2006) y Raposo *et al.* (2008) algunas veces una solución buffer puede ser adicionada para disminuir la probabilidad de acidificación en la muestra.

Asimismo para Cabrera *et al.* (2010) esta acidificación del sistema es una de las principales causas de falla operacional en los reactores anaerobios, para lo cual recomienda que los ensayos de digestión anaerobia se realicen con el agregado de buffer fosfato en forma de mantener el pH bajo control durante el tiempo que dure el sistema.

Finalmente, los valores de biogás y metano acumulados a condiciones estándar después de 17 días de digestión fueron analizados.

Según la Norma DIN 38414-S8 (Método estándar Alemán para la examinación de agua, agua residual y lodos, lodos y sedimentos (grupo S); determinación de la susceptibilidad para digestión anaerobia (S8), la metodología usada está diseñada para la medida de metano, si se va medir el biogás (incluido otros gases) se deberá remover la botella con la solución alcalina del sistema. Asimismo, el agua en la botella de desplazamiento debe ser acidificada para evitar la formación de carbonato y de esa manera tener una medida de gases representativa.

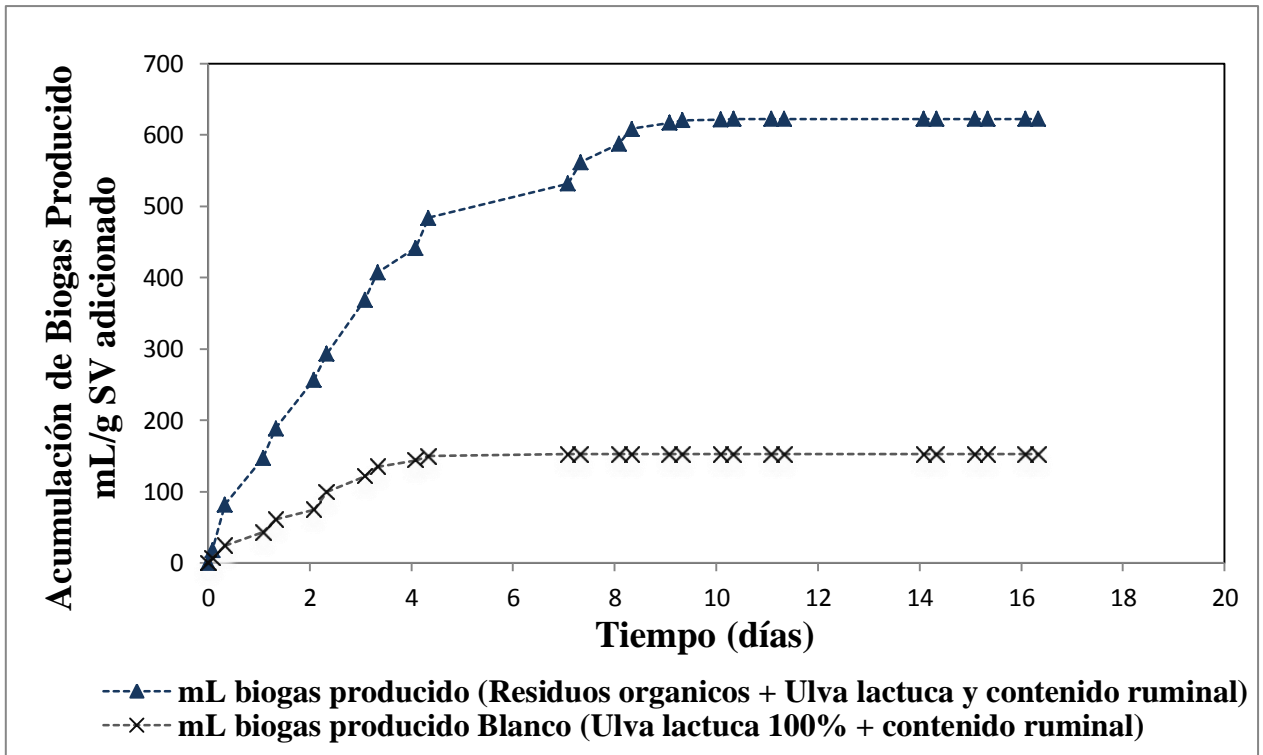


Figura 17. Volumen (ml) de Biogás producido por g de SV adicionado al reactor

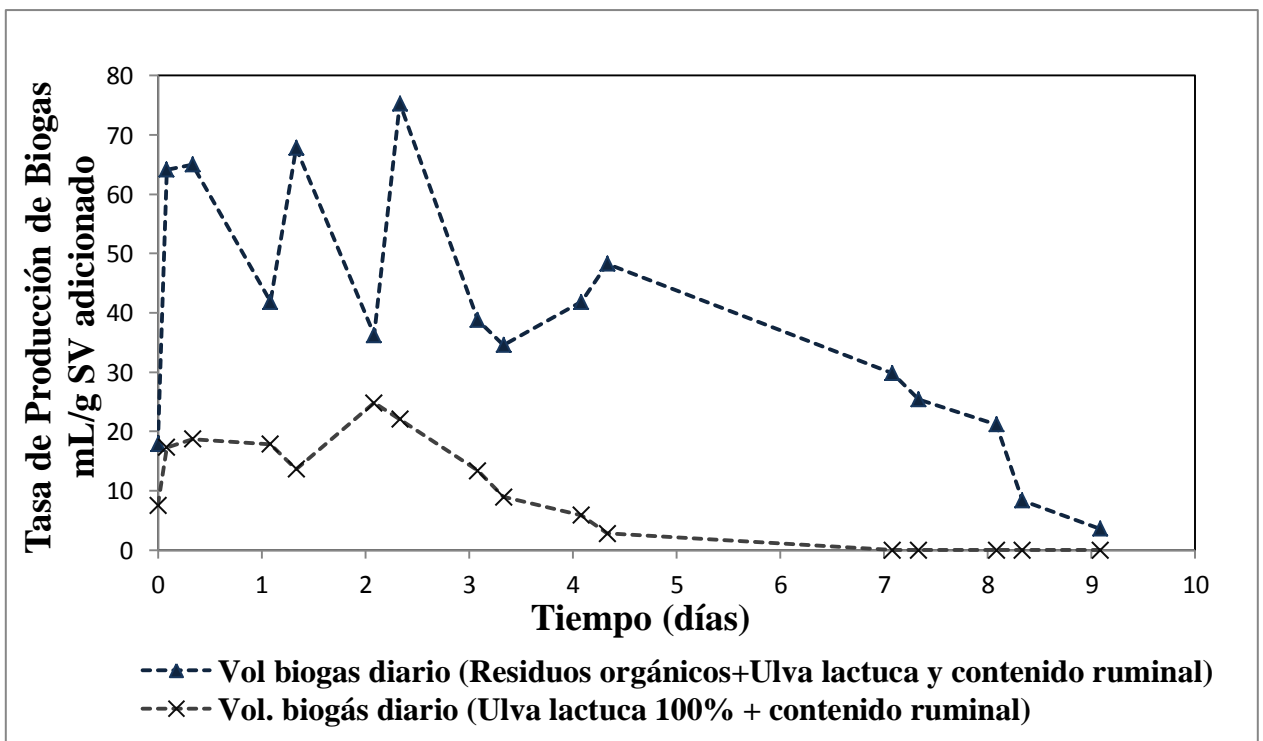


Figura 18. Tasa de producción (ml) de biogás por g SV adicionado

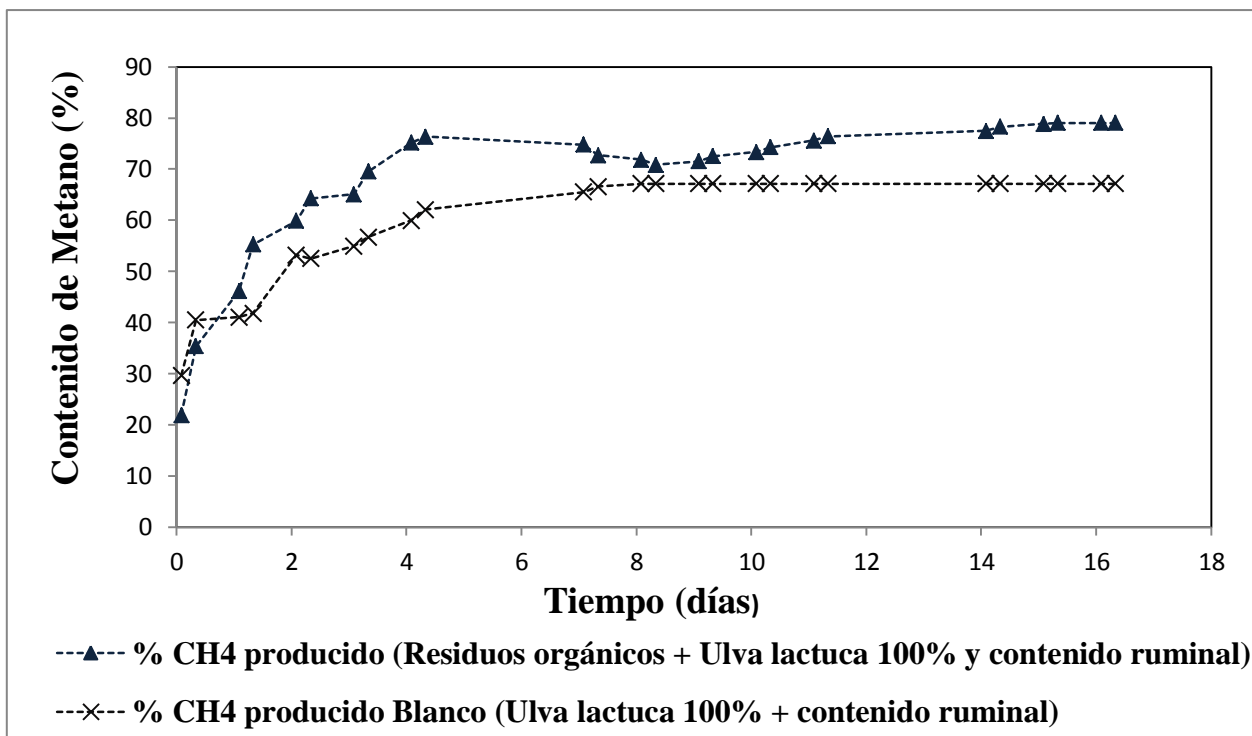


Figura 19. Porcentaje de Metano producido por g SV adicionado al reactor

4.4. CARACTERIZACIÓN DEL BIOL

Una vez finalizado la prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), se filtró el contenido de los reactores. De la filtración se obtuvieron dos productos; la parte sólida, biosol; se descartó debido a que se obtuvo una cantidad menor a 50 g luego de filtrarse el biofertilizante. La parte líquida (biol) se mandó al laboratorio de microbiología Marino Tabusso y el laboratorio de suelos LASPAF para la realización de los análisis microbiológico y físico-químico respectivamente. A continuación se presentan los resultados y análisis de los mismos.

4.4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL BIOL

Se mandó realizar la Enumeración de Coliformes Totales y Fecales de la muestra de Biol producto de la digestión anaerobia de los residuos orgánicos del comedor universitario

UNALM al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM, los resultados verifican la presencia de microorganismos patógenos, ver el Cuadro 16. Cabe resaltar que Aldón (2008) obtuvo valores 9 para de coliformes fecales y 4 para coliformes fecales para la *Ulva lactuca*, lo cual explicaría los valores finales en el biol.

Cuadro 16. Resultado del Análisis Microbiológico del Biol

Análisis Microbiológico	NMP/ml
Enumeración de coliformes totales	8
Enumeración de coliformes fecales	8

Fuente: Elaboración propia

A continuación en el Cuadro 17 se comparan los resultados de este estudio con otras que usan diversas materias primas investigadas por diferentes autores, los resultados a continuación:

Cuadro 17. Comparativa de Resultados Finales Microbiológicos

Autores	Sustrato	Coliformes Totales NMP/ml	Coliformes Fecales NMP/ml
Estudio actual Capcha 2014	Residuo Orgánico	8	8
Cárdenas, 2012	Residuo Orgánico	< 3*	< 3*
	Estiércol de vaca	5	5
	RO + Estiércol de vaca	< 3*	< 3*
Castillo, 2012	Gallinaza	20	< 3*
	Codornaza	1.8 x 10	< 3*
	Mezcla	1.6 x 10	< 3*
ECA Agua ⁽¹⁾		50	10

(1) Estándar de Calidad de Agua Clase III para bebidas de animales y riego de vegetales

(*) El valor < 3 indica ausencia de microorganismos en el ensayo

Fuente: Elaboración propia

La presencia de Coliformes Totales presentes en el biol de la presente investigación resultó ser mayor al que obtuvo Cárdenas, 2012, pero menor a los obtenidos por Castillo, 2012. Asimismo el valor de Coliformes Fecales resultó mayor a los valores obtenidos por Castillo, 2012 y Cárdenas, 2012, cabe resaltar que en la investigación de Cárdenas, 2012, se usó

Microorganismos Efectivos en el tratamiento, lo que asegura disminución de estos microorganismos patógenos.

De tal manera, el valor de Coliformes Totales de este estudio resulta menor que los obtenidos por Castillo. Por el contrario, los Coliformes Fecales son menores en comparación con los resultados de (Castillo, 2012)

Al comparar nuestros resultados con el Estándar de Calidad Ambiental para Agua D.S.002-2008-MINAM de la legislación peruana para el uso de agua Clase 3 para fines de riego, el cual indica que la presencia de Coliformes Totales como máximo puede llegar a ser 5000 NMP/100 ml y que los Coliformes Fecales como máximo pueden ser 1000 NMP/100 ml, por lo que se concluye que nuestros resultados se encuentran por debajo de estos límites, haciéndolas idóneas para su aplicación como fertilizante natural.

4.4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL BIOL

En el Cuadro 18 podemos apreciar los resultados del análisis realizado al biol obtenido al finalizar la Prueba Potencial Bioquímica de Metano. Los parámetros evaluados son pH, conductividad eléctrica, sólidos totales, materia orgánica, N total, P total, K total, Ca total, Mg total, Na total Carbono orgánico, Fe total, Cu total, Zn total, Mn total, B total.

El análisis fue realizado en el (LASPAF). En el Anexo 6 se presenta el reporte de laboratorio.

Cuadro 18. Resultados del análisis Físico-Químico del biol

Muestra	Biol
pH	4.92
C.E. dS/m	26.3
Sólidos Totales g/L	47.54
M.O. en solución g/L	22.52
N total mg/L	1176
P Total mg/L	663.97
K Total mg/L	1807.5
Ca Total mg/L	841.7
Mg Total mg/L	2150.1
Na Total mg/L	5075
Fe Total mg/L	49.79
Cu Total mg/L	0.7
Zn Total mg/L	4.1
Mn Total mg/L	27.29
B Total mg/L	3.25
Pb Total mg/L	0.945
Cd Total mg/L	0.043
Cr Total mg/L	0.519

Fuente: Elaboración propia

A continuación en el Cuadro 19 se compara los resultados de los macronutrientes encontrados en el biol con los resultados obtenidos por otros autores.

Cuadro 19. Comparación de los Análisis de Biol con otros Autores

Autores	Sustratos	pH	C.E. dS/m	M.O. en solución g/L	N Total mg/L	P Total mg/L	K Total mg/L	Ca Total mg/L	Mg Total mg/L	Na Total mg/L
Investigación Actual Capcha, 2012	Residuos orgánicos	4.92	26.3	22.52	1176	664	1808	841.7	2150	5075
Cárdenas, 2012	Residuos Orgánicos	6.25	23.67	15.1	1013	43.73	1344	4400	198	144
	Estiércol de vacuno	6.78	9.45	6.7	676.7	50.5	676.7	765.3	278.7	436
	Residuos Orgánicos + estiércol de vacuno	6.69	16.03	8.83	814.3	26.06	814.3	1773	224.7	841.3
Schlaefli, 2010	Residuos Orgánicos	5.28	11.3	65.56	1176	144	692	-	-	-
	Residuos Orgánicos	5.29	12.2	13.41	1176	177	648	-	-	-
Palomino, 2007	R. O. domésticos + papel higiénico	4.9	8.25	23.88	805	268	2056	-	-	-
Avibiol	Gallinaza	7.2	21.3	17.2	1700	3800	5200	3500	1200	-
Casa Blanca	Estiércol de cuy	8.2	15.3	72.5	980	121	6760	220.4	53.4	542

Cárdenas, 2012 usó como sustrato los Residuos Orgánicos del comedor UNALM y Estiércol de vacuno en 3 diferentes tratamiento.

Schlaefli, 2010 usó como sustrato: residuos de comida del comedor de la UNALM. BD1=Biodigestor1 BD2=Biodigestor 2

Palomino, 2007 usó como sustrato: residuos orgánicos domésticos y papel higiénico.TB1=Tesis Biodigestor 1

Román, 2012 biol Casa Blanca de estiércol de cuy,

Medina, 2013 Avibiol (Salam- La Calera) biol de gallinaza,

Fuente: Elaboración Propia.

El pH del biol obtenido en la presente investigación, así como por Schlaefli, 2010 y Palomino, 2007, resultaron ácidos en comparación a los valores obtenidos en el biol de Cárdenas, 2012, el avibiol a base de gallinaza y el biol obtenido en Casa blanca. Siendo el biol un producto de la digestión anaerobia el pH debería estar dentro de rango de 6.8 a 7.5, valores de pH por debajo de este rango inhiben la acción de las bacterias metanogénicas y con ella la producción de biogás.

El alto valor de la C.E. están relacionados a la cantidad de iones disueltos presentes en la *Ulva lactuca* y en el contenido ruminal, elementos usados para la preparación del inóculo quienes presentan elevada concentración de Na, K, Ca y Mg. Cabe resaltar que aproximadamente la novena parte del volumen de carga del biodigestor fue inóculo. Asimismo en comparación con la C.E. de los demás bioles, el nuestro obtuvo valores más altos, lo cual nos indica que el biol de este experimento posee una buena cantidad de sales en solución.

Los resultados antes descritos permitieron evaluar el potencial del biol como abono orgánico líquido, al ser comparados con otros productos similares. Como se muestra en el Cuadro 19 el contenido de M.O. es alto al igual que el obtenido por Palomino, en comparación con los demás estudios, este resultado es importante ya que la materia orgánica en relación con el suelo tiene importancia en varios factores como los son; la aportación de nutrientes, activación biológica del suelo, mejora estructural y física de las raíces y circulación de agua y aire, evitando la compactación y favoreciendo la labranza, aumento de la capacidad de retención hídrica, aumento de la temperatura del suelo, estabilización del pH y reducción de la erosión hídrica y eólica (Guerrero, 1993).

En general las concentraciones de macronutrientes encontradas en este estudio son superiores a las demás concentraciones descritas por otros autores mostrados en el Cuadro 19, a excepción del valor de Potasio, proveniente del biol estudiado por Palomino, 2007 que presenta mayor concentración.

El análisis de Nitrógeno muestra similar valor al obtenido por Schlaefli, (2010) así mismo presenta mayor valor en comparación a los demás experimentos, esto debido a que el porcentaje de nitrógeno presente en la *Ulva lactuca* es alto como se muestra en el Cuadro 12.

La concentración de Fósforo en el biol se encuentra en segundo lugar con 664 mg/L, en primer lugar el Avibiol con 3800 mg/L. Además en comparación a los demás presentados supera en 24 veces al menor valor presentado por Cárdenas, 2012.

La concentración del Potasio obtenidos por Palomino, 2007, en el Avibiol y en Casa blanca resultaron mucho mayores a la concentración del biol de la presente investigación, asimismo se superó a las concentraciones obtenidas por Cárdenas, 2012 y Schlaefli, 2010.

Para Gonzales *et al.* (1982), citado por Montero *et al.* (1999) citado por Aldón (2008), las algas aportan al suelo similares cantidades de nitrógeno, mayores de potasio y menos de fósforo en comparación a un estiércol de granja. Por lo tanto el biol de este estudio es adecuado para suelos pobres en potasio o para cultivos exigentes en este nutriente.

Con respecto a los micronutrientes, el hierro es el que se encuentra en mayor cantidad seguido del manganeso, zinc, boro y finalmente el cobre.

El contenido de metales pesados en el biol obtenido en este estudio presenta mayor cantidad de plomo seguido del cromo y finalmente el cadmio.

La presencia de metales pesados en el biol es justificable según los análisis realizados al inicio de la realización de la prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM). Las condiciones iniciales de la muestra del contenido ruminal determinó la presencia de metales pesados.

Al no existir normatividad en Perú con respecto al contenido de metales pesados en bioles, se realizó la comparación con la normativa para biofertilizantes líquidos planteados por el Real Decreto 506/2013 de España quienes plantean los límites máximos permisibles para fertilizantes elaborados a partir de materias primas de origen vegetal y animal (Ver Cuadro 20). Como se puede observar, las concentraciones de cadmio, cromo y plomo

presentes en el biol, se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles establecidos por el Decreto mencionado, razón por la cual, el biol pertenece a la Categoría A.

Cuadro 20. Límites máximos permisibles de metales pesados en fertilizantes

Metal Pesado	Biofertilizante (mg/kg)	Límite máximo permisible Líquido (mg/kg) ⁽¹⁾		
		Clase A (mg/kg)	Clase B (mg/kg)	Clase C (mg/kg)
Plomo	0.945	45	150	200
Cadmio	0.043	0.7	2	3
Cromo	0.519	70	250	300

Fuente: ⁽¹⁾ Real Decreto 506/2013 de España sobre productos fertilizantes Anexo V.

Cabe resaltar que al finalizar la prueba PBM se obtuvo un valor de 50 g de biosol luego de prensar el fertilizante, razón por la que no se tomó en cuenta hacer un análisis físico-químico al biosol.

4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BIOL EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LECHUGA

Para evaluar el efecto del biol en la germinación de semillas de lechuga se empleó el biol producto de la digestión anaerobia de los residuos orgánicos del comedor universitario UNALM. Cabe resaltar que el bioensayo desarrollado ha sido una adaptación de la prueba de bioensayo de fitotoxicidad aguda con semillas de lechuga, siendo las condiciones para evaluar, recomendadas por (Sobrero y Ronco, 2004). En el Cuadro 21 se muestran las características físico-químicas de los tratamientos evaluados (diluciones preparadas) en cuanto a los parámetros de pH y conductividad eléctrica (C.E.).

Como se puede observar, el tratamiento control (T0) presentó mayor pH y menor conductividad eléctrica, debido a que se trata de agua de pozo de la UNALM.

Se usó agua de pozo como diluyente de los 5 tratamientos ya que en el presente ensayo se quiso dar condiciones semejantes a las que se usarían en una prueba en campo. En el Cuadro 21 se muestra que el valor de pH del agua de pozo obtenido de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) la cual se encuentra dentro del rango neutro de (6.5 a 7.5).

Si bien es cierto la conductividad eléctrica es de 3 mS /cm, se debería usar evitar agua con este valor, para no alterar la prueba. La C.E. se ubica al extremo del rango de 0.7 a 3 mS/cm, lo que indica que existe un riesgo ligero a moderado por concentración de sales, según la clasificación FAO para agua de riego (Aldón, 2008).

Se puede observar también que el pH de los tratamientos aumenta conforme las diluciones disminuyen su concentración de biol, variando de 4.9 (T1) a 6.85 (T2); mientras que la conductividad eléctrica tuvo comportamiento inverso, disminuyendo de 25 (T1) a 3 (T4), presentándose una caída abrupta de T1 a T2.

En la Figura 20, se presenta el porcentaje de semillas de lechuga germinadas para cada tratamiento. Se aprecia que el único tratamiento en los que ninguna semilla germinó durante los cinco días fue el T1 (biol puro), además en T1 se observó el cambio de color en las semillas, se pusieron oscuras, además hubo presencia de hongos.

Cuadro 21. Características físico-químicas de los tratamientos evaluados

Tratamiento	pH	C.E. (mS/cm)
T0: Agua de pozo	7	3
T1: Biol puro	4.9	25
T2: 10:100 (10%)	5.33	5
T3: 1:100 (1%)	6.35	3
T4: 0.1:100 (0.1%)	6.65	3
T5: 0.01:100 (0.01%)	6.85	3

Fuente: Elaboración propia

4.5.1. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE GERMINACIÓN

En el Cuadro 22 se presentan los valores del Porcentaje de Germinación Relativo (PGR), Crecimiento de Radícula Relativo (CRR) e Índice de Germinación (IG), para cada tratamiento evaluado.

Como se observa, el PGR fue de 0 para el biol puro, el tratamiento 10:100 obtuvo 85% y las demás diluciones obtuvieron un PGR de 100%, esto debido a que el número de semillas germinadas fue el mismo en el control y en las diluciones 1:100, 0.1:100 y 0.01:100.

El mayor % CRR lo obtuvo el T3 (dilución 1:100) de 152.55%, seguido de la dilución 0.1:100 y 0.01:100 con 121.39 % y 101.86% respectivamente, mientras que el menor valor fue de 0% para el biol puro, debido a que ninguna semilla logró germinar en dicha dilución. Estos resultados guardan relación con la elongación de radícula obtenido para cada dilución, ya que como se observa en el Cuadro 22, a mayor elongación de radícula, mayor es el valor del CRR.

Zucconi *et al.* (1981) citado por Varnero *et al* (2007) señala que valores de $IG \geq 80\%$ indicarían que no hay sustancias fitotóxicas o que de haber, estarían en bajas concentraciones. Si analizamos el biol de la presente investigación, dichas diluciones pueden ser consideradas como concentraciones óptimas para el normal desarrollo de las plántulas de lechuga (Peralta, 2010).

La mayor elongación de la radícula la obtuvo la dilución 1:100 superando incluso al control, obteniendo un porcentaje de crecimiento de radícula relativo (CRR) de 152.56 y un índice de germinación (IG) 152.56, lo cual indica que no hay presencia de sustancias fitotóxicas en la solución y que los nutrientes presentes han propiciado un mejor crecimiento en las plantas. De igual manera los resultados obtenidos en las diluciones 0.1:100 y 0.01:100 resultaron con valores de $IG > 100$, pero menores a la dilución 1:100.

El IG de la disolución 10:100 fue de 65.6% lo cual indica que las condiciones del medio ni la sustancias fitotóxicas han inhibido las condiciones de crecimiento de las semillas presentes,

pero que sin embargo el valor de elongación de radícula es menor que la obtenida en el control.

Finalmente, se evidencia como ya se mencionó que no existe sustancias fitotóxicas en las 3 diluciones 1:100, 0.1:100 y en 0.01:100.

Cuadro 22. Índice de germinación de las semillas de lechuga - Biol

Tratamiento	N° de semillas germinadas	PGR (%)	Elongación de la radícula (mm)	CRR (%)	IG (%)
T0: control	20	-	21.5	-	-
T1: biol puro	0	0	0	0	0
T2: 10:100 *	17	85	16.6	77.21	65.63
T3: 1:100 *	20	100	32.8	152.56	152.56
T4: 0.1:100 *	20	100	26.1	121.39	121.39
T5: 0.01:100 *	20	100	21.9	101.86	101.86

Fuente: Elaboración propia

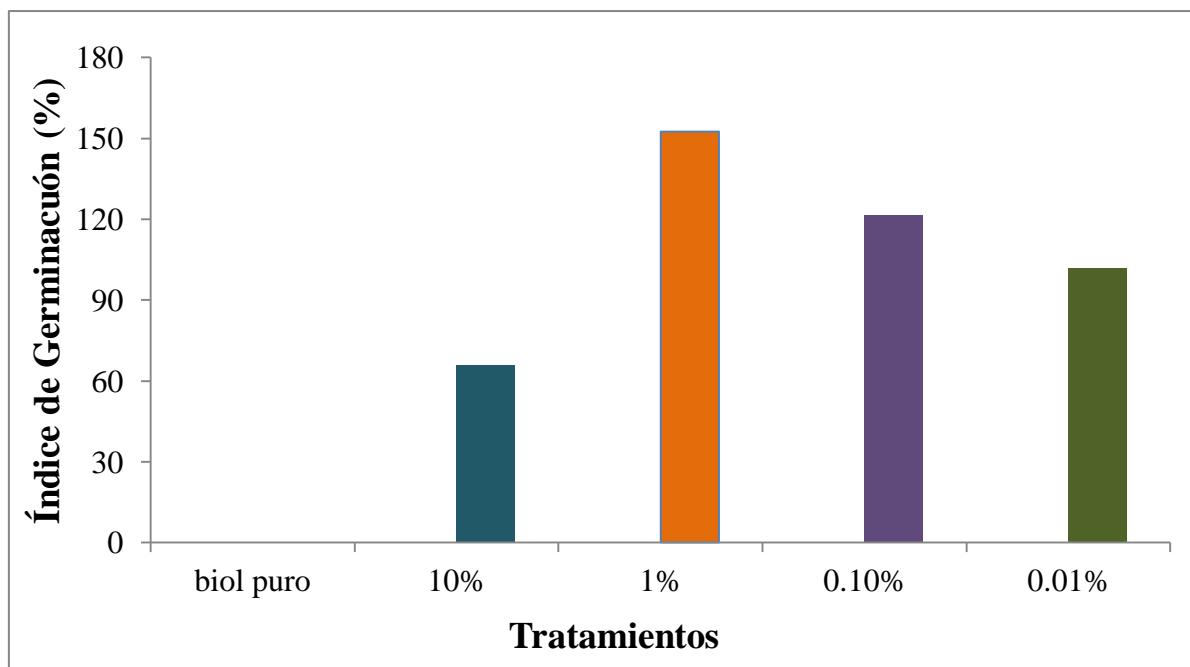


Figura 20. Índice de germinación de las semillas de lechuga – Biol

V. CONCLUSIONES

- El aporte de nutrientes de la *Ulva lactuca* al 100% al contenido ruminal (inóculo metanogénico) obtuvo el mejor resultado en la generación de metano (ml/SV adicionado) mediante el batch test Potencial Bioquímico de Metano (PBM) usando como sustrato los residuos orgánicos del comedor universitario de la UNALM.
- Se obtuvo 622.3 ml de biogás con una tasa de producción promedio de 34.4. ml de CH₄/g SV adicionado.
- El porcentaje de metano producido mediante el batch test PBM fue de 68.2%. Asimismo, el porcentaje de metano de la prueba en blanco (sólo inóculo) fue 69.1% evidenciando buenas condiciones metanogénicas.
- Se determinó que el tiempo de retención en la PBM fue de 17 días, luego de los cuales, se detuvo la producción de metano, dándose por culminada la prueba, no hubo desplazamiento en al menos 24 horas.
- La concentración de los metales pesados en el biol no sobrepasan los valores máximos dados en la norma Real Decreto 506/2013 de España sobre productos fertilizantes -Anexo V. Además, los resultados del análisis microbiológico al biol resultaron por debajo de la norma para calidad de Aguas para riego Clase III. Lo cual indica que su uso como biofertilizante es apto.
- Cabe resaltar que producto de la presente investigación se obtuvo una cantidad de 50 g, por lo cual se le consideró como “volumen despreciable” razón por la cual no se llevó a cabo el análisis del biosol.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda mezclar los Residuos Orgánicos del Comedor Universitario de la UNALM con otro sustrato que aporte alcalinidad a la muestra y permita que se realice adecuadamente la metanogénesis, ya que la falta de un agente tamponante que equilibre la acidez producida por la fermentación rápida de los residuos orgánicos, cabe mencionar que el estiércol puede ser una buena alternativa para el tratamiento eficaz de los materiales altamente biodegradables.
- Se recomienda realizar pruebas a escala piloto para validar la información obtenida en la prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) realizado en laboratorio.
- Se recomienda que durante la realización de la prueba a escala piloto se evalúe constantemente el pH para determinar el tiempo en que ocurren variaciones de este parámetro, así se podrá evitar una posible acidificación de la muestra.
- Se recomienda usar buffers en los reactores de la prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), con lo cual se evitará que ocurra variación del pH dentro del reactor.
- Se recomienda realizar una prueba microbiológica inicial a la *Ulva lactuca*, esto servirá para comparar los resultados microbiológicos finales.

VII. BIBLIOGRAFIA

- **ACUÑA, G. P., ÁNGEL, G. L., BORRAY, M. E., CORRALES, L., SÁNCHEZ, L. 2008.** Aislamiento e identificación de microorganismos del género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá D. C. ISSN 1974-2470 VOL. 6 N° 10
- **AGUILAR, M. 1999.** Reciclamiento de Basura: Una Opción Ambiental Comunitaria – México: Trillas.
- **ALDÓN, D. 2008.** Estrategia Ambiental de Aprovechamiento de la Macroalga *Ulva lactuca* (lechuga de mar) a través del proceso de ensilaje. Tesis para optar el Título de Ingeniero Ambiental. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias.
- **ALLEN, E., et al. 2013.** The potential of algae blooms to produce renewable gaseous fuel. Waste Management.
- **ÁNGELES, S. 2000.** Fermentación ruminal, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica. FMVZ Universidad Autónoma de México.
- **ARAMAYO, A. 2004.** Diagnósticos y alternativas de manejo de los residuos sólidos de cafetería y comedores del campus UNALM. Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias.
- **BERMUDEZ, J., CANOVAS, M., MANJON, IBORRA, J. y HOWELL, J. 1988.** La digestión Anaerobia. Universidad de Murcia. Secretariado de Publicaciones, ed. 75 pp.
- **CABRERA, N., GARCÍA, F., y BORZOCCONI, L. 2010.** Digestión Anaerobia de Lodos de la Industria de Pulpa de Celulosa. Universidad de la República de Uruguay.

- **CÁRDENAS, G. 2009.** Aislamiento térmico de biodigestor en planta de tratamiento de aguas servidas Osorno. Tesis Ing. Mecánico. Universidad Austral de Chile. 132 p.
- **CÁRDENAS, J. 2012:** Evaluación de la calidad de biogás y biol en digestores utilizando estiércol de vaca y residuos orgánicos del comedor pre-tratados con la técnica del bocashi en la UNALM. Tesis. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- **CASTILLO, G. 2012.** Evaluación de codornaza y gallinaza de granjas avícolas para la producción de biogás y bioabono mediante digestión anaeróbica. Tesis. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- **CUESTA, J., MARTIN, F., VICENTE, G. y VILLAR, S. 2009?.** Informe de Vigilancia Tecnológica Madrid. Situación actual de la producción de biogás y de su aprovechamiento. Velázquez Madrid. ISBN 978-84-612-9487-9.
- **DAWES, E.Y. 1991.** Botánica marina. Limusa, México, 658 pp.
- **DEMIREL, B., SCHERER, P. 2008.** The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. Rev Environ Sci Biotechnol. 7,173–190.
- **DÍAZ, R. 2010.** Obtención de gas combustible mediante la bioconversión del alga marina *Ulva lactuca*.
- **DROSG, B., BRAUN, R., BOCHMANN, G., 2013.** Analysis and Characterisation of biogas feedstocks. University of Natural Resources and Life Sciences, Austria and Teodorita al saedi, Biosantech, Denmark.
- **FAJARDO, M. 1997.** Producción de inóculos para reactores anaerobios. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana IZTAPALAPA. México, D.F.

- **FERNÁNDEZ, J. 2010.** Optimización de la digestión anaerobia seca de la Fracción Orgánica de los Residuos sólidos Urbanos (FORSU) en reactores en fases de temperatura. Tesis Dr. Ciencias Ambientales. España. Universidad de Cádiz. 373p.
- **FERRER, Y. y PÉREZ, H. 2010.** Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás. Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el rendimiento ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, Vol. 43, num 1 pp. 9-20. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba.
- **FREGOSO, M., FERRERA-CERRATO, R., BARRA, J., GONZÁLEZ, G., SANTOS, J., GÓMEZ, L., PÉREZ, G. 2001.** Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. Terra, vol. 19, no 4, p. 353-362.
- **GAO, K. y K. McKINLEY. 1993.** Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. J. of App. Phycology, vol. 6, no 45 – 60.
- **GUERRERO, J. 1993.** Abonos Orgánicos. Tecnologías para el manejo ecológico de los suelos. RAAA. Lima-Perú. pp 9-23; 81-83.
- **GIL, P., MENDO, J., FERNANDEZ, E., YSLA, L. y PINILLA, F. 2000.** Estudio de las praderas de macroalgas de importancia comercial como base para su manejo en la Reserva Nacional de Paracas. Lima, Perú. Proyecto UNALM-INRENA/GTZ. Informe final. 108 p.
- **GOBIERNO REGIONAL DEL CALLAO. 2011.** Actualización de la Microzonificación Ecológica Económica de la Provincia Constitucional del Callao.
- **HUGHES, A., BLACK, K., CAMPBELL, I., DAVIDSON, K., KELLY, M. 2012.** Does seaweed offer a solution for bioenergy with biological carbon capture and storage?. Greenhouse Gases: Science and Technology, 2(6), 402-407.

- **HUGHES, A., KELLY, M., BLACK, K., y STANLEY, M. 2012.** Biogas from Macroalgae: is it time to revisit the idea?. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1-7.
- **IMARPE. 2007.** Prospección biológica ambiental de las principales praderas de macroalgas. Bahía Paracas, Pisco.
- **ICMSF (International Commission on Microbiological for Food). 1993.** Segunda Edición. Vol.1 Part II. Editorial Acribia
- **JEGOU, D. y LAHAYE, M. 1993.** Chemical characteristics of insoluble dietary fibre from sea-lettuce (*Uva lactuca*). *Proc. Nutrition Soc.*, 52(2): 122A.
- **KAFLE, G. K., & Kim, S. H. (2013).** Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production: Batch and continuous operation. *Applied Energy*, , 61-72.
- **LORENZO, Y., CHANFÓN, J., PEREDA, I. 2013.** Estudio de la digestión anaerobia mediante el ensayo de actividad metanogénica empleando vinazas con diferentes contenidos de sulfatos. Sobre los derivados de la caña de azúcar, vol. 47 N°. 1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) La Habana, Cuba.
- **MAGAÑAR, 2006.** Producción de Biogás a Nivel Laboratorio Utilizando Estiércol de Cabras.
- **MARTÍ ORTEGA N. 2006.** “Phosphorus Precipitation in Anaerobic Digestion Process”.
- **MENDO, T. 2004.** Aprovechamiento del alga *Ulva sp.* en la elaboración del compost como una estrategia de Gestión Ambiental en la Bahía de Paracas. Trabajo de titulación

para optar el Título de Ingeniero Ambiental. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias.

- **MIGLIORE, G., ALISI, C., SPROCATI, A. R., MASSI, E., CICCOLI, R., LENZI, M., & CREMISINI, C. 2012.** Anaerobic digestion of macroalgal biomass and sediments sourced from the Orbetello lagoon, Italy. *Biomass and Bioenergy*, 42, 69-77.
- **MUÑOZ, J., ORTIZ-CAÑAVATE, J. y VASQUEZ, J. 1987.** Técnica y Aplicaciones Agrícolas de la Biometanización – Madrid.
- **NIKOLAISEN, L., DAUGBJERG, P., BECH, K., DAHL, J., BUSK, J., BRODSGAARD, T., RASMUSSEN, M., BRUHN, A., BJERRE, A., NIELSEN, H., ALBERT, K., AMBUS, P., KADAR, Z., HEISKE, S., SANDER, B. y SCHMIDT E. 2011.** Energy Production from Marine Biomass (*Ulva lactuca*). Danish Technological Institute.
- **PALOMINO, V. 2007.** Tratamiento de Residuos Sólidos Domésticos mediante Biodigestores para la obtención de Biogás y Bioabonos. Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- **PERALTA, R. 2010.** Determinación de parámetros óptimos en la producción de fast biol usando las excretas del ganado lechero del establo de la UNALM.
- **POVOLNY, M. 1981.** The effect of the steeping of peat-cellulose jiffypots in extracts of seaweeds on the quality of tomato seedlings. En *Proceedings of the International Seaweed Symposium*. Pergamon Press; Paris (8, 730-733)

- **RAPOSO F., BANKS CJ., SIEGERT I., HEAVEN S., BORJA R. 2006** Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry* 41, 1444-1450.
- **RAPOSO F., BORJA R., RINCON B., JIMENEZ AM. 2008** Assessment of process control parameters in the biochemical methane potential of sunflower oil cake. *Biomass and Bioenergy* 32, 1235-1244.
- **SALAZAR, M. 2010.** Diseño de mejora en el servicio del comedor universitario de la UNALM con proyección al 2011. Tesis de Ingeniero en Gestión Empresarial. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
- **SCHLAEFLI, F. 2010.** Tratamiento de Residuos Orgánicos del comedor universitario de la UNALM en un biodigestor semi-continuo para la producción de biogás y biol. . Tesis de Ingeniero Ambiental. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
- **SCRIBAN, R. 1985.** Biotecnología. Traducción de la segunda edición por Dra. M. Hidalgo y Mondragón. París. Editorial El Manual Moderno, S.A. p. 543-582.
- **SOBRERO, M. y RONCO, A. 2004.** Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga. pp: 71-79. In: Castillo, G. (Ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, IMPTA. Ottawa, Canadá. 202p.
- **SOSA, A., GALINDO, J. y BOCOURT, R. 2007.** "Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control". *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41, n° 2.
- **SOTO, M., MÉNDEZ, R. y LEMA, J. 1992.** Determinación de Toxicidad y biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales. *Tecnología del Agua* 92, 70-81.

- **SPEECE, R. 1987.** “Nutrient Requirements en Anaerobic Digestion of Biomass”.
- **TCHOBANOGLUS, G. 1994.** Gestión Integral de Residuos Sólidos, Vol. 1. España, McGraw-Hill. Pp 607.
- **TORRES, P., RODRIGUEZ, J., CAJIGAS, A. y PEREZ, A. 2002.** La Actividad Metanogénica como herramientas para optimizar el proceso anaerobio en el tratamiento de aguas residuales fácilmente acidificables. AIDIS Cali – Valle – Colombia.
- **VARNERO, M., ROJAS, C. y ORELLANA, R. 2007.** Índices de ftotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. Revista de Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal. 7 (1) (28-37).

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Reporte de laboratorio de la *Ulva lactuca*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN FOLIAR

SOLICITANTE : MELISSA CAPCHA EULOGIO
PROCEDENCIA : LIMA/ CALLAO/ LA PUNTA
MUESTRA : ULVA
REFERENCIA : H.R. 39583
BOLETA : 9773
FECHA : 27/03/13

Nº LAB	CLAVES	N %	C %	Relación C/N
1633		1.68	23.17	13.79



Ing. Braulio La Torre Martínez
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Anexo 2. Reporte del análisis Agronómico al contenido ruminal



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : LIZ MELISSA CAPCHA EULOGIO
 PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ SAN LUIS/ CAMAL DE YERBATEROS
 MUESTRA DE : MATERIA ORGANICA (CONTENIDO RUMINAL)
 REFERENCIA : H.R. 42411
 FACTURA : 10380
 FECHA : 24/10/13

Nº LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	M.O. %	N %	P ₂ O ₅ %	K ₂ O %
715		8.05	14.50	68.69	2.00	2.64	1.21

Nº LAB	CLAVES	CaO %	MgO %	Hd %	Na %
715		1.50	0.25	93.52	1.66

Nº LAB	CLAVES	Fe ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	B ppm
715		1376	35	105	187	87

Nº LAB	CLAVES	Pb ppm	Cd ppm	Cr ppm
715		4.75	1.03	1.75



Dr. Sady García Bendejú
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
 Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622
 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Anexo 3. Base de datos de la prueba AME

T (horas)	Vol (ml) Tratamiento "rumen" R1	Vol (ml) Tratamiento "rumen" R2	Vol (ml) Tratamiento "rumen" R3	Vol (ml) Tratamiento 20% R1	Vol (ml) Tratamiento 20% R2	Vol (ml) Tratamiento 20% R3	Vol (ml) Tratamiento 30% R1	Vol (ml) Tratamiento 30% R2	Vol (ml) Tratamiento 30% R3	Vol (ml) Tratamiento 50% R1	Vol (ml) Tratamiento 50% R2	Vol (ml) Tratamiento 50% R3	Vol (ml) Tratamiento 100% R1	Vol (ml) Tratamiento 100% R2	Vol (ml) Tratamiento 100% R3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	1.5	1	1.5	12.5	11	11.5	14.5	11	12	15	12	14	13	14	13.5
68	2	1.5	2	14	12.5	13	16	13	14	17	13	15	15	16	15.5
71	2	1.5	2	14	13	14	18	13	14	19	13	15	15	16.5	15.8
86	8	4.5	5	24	22.5	23	26	23	25	27	23	25	25	26	25.5
109	8	5	5.5	28.4	24.8	25.5	31	28	30	32	30	32	41.5	37.5	39.5
155	8	5	6	32.5	26	27	33	32	33	38	34	36	55	58	56.5
181	8	5	6	35	26.5	27.5	34	36	37	43	40	42	70	72	71
182	8	5	6	35	26.5	27.5	35	36	37	43.5	41	43	81	81.5	81.3
226	8	6	6.5	41	27	28	36.5	37	38	46	43	45	84	89.5	86.6
227	8.5	6.0	7.5	41.5	27.5	28.5	37	37.5	38.5	47	44	46	85	92	88.4
230	9	8	8	42	28	29	39	38	39	47	44	46	86.5	93.5	90
250	9.5	9.0	9.0	42.5	28	29	39	38	39	49	44	46	87	92.5	89.6
251	10.5	10	10	43.5	28	29	39	38.5	39.5	49	44.5	46.5	87.5	92.5	90
252	10.5	10	10	44	28	29	39	38.5	39.5	49	44.5	46.5	87.5	93	90.4
254	10.5	10	10	44	28	29	39	38.5	39.5	49	45	47	87.5	93	90.4
257	10.5	10	10	44.5	28	29	39	39	40	49	45	47	88	93	90.5
273	10.5	10	10	45	28	29	39	39	40	50	45	47	88	93	90.5
276	10.5	10	10	45.5	28	29	39.5	39	40	50.5	45	47	89	94	91.7
278	10.5	10	10	44	28	29	40	39	40	50.5	45	47	89	94	91.7
298	10.5	10	10	48	28	29	40	39	40	51	45.5	47.5	89	94.5	91.8
303	10.5	10	10	49	28.5	29.5	40	39	40	51	45.5	47.5	89.5	94.5	92.1
322	10.5	10	10	50	28.5	29.5	40	39	40	52	45.5	47.5	90	94.5	92.3

Anexo 4. Resultado de la prueba estadística

Análisis de Varianza (ANOVA) de %AL para la velocidad producción de metano CH4

Fuente	GL	SC	MC	F	P	α	P < α
Factor	3	0.0000075	0.0000025	6.35	0.016	0.05	alta significancia
Error	8	0.0000031	0.0000004				
Total	11	0.0000106					

S = 0.0006272 R-cuad. = 70.43% R-cuad.(ajustado) = 59.34%

Desviación Estandar agrupada = 0.000627

Método de Tukey, Agrupación de Información

	N	Media	Agrupación
T1 100%	3	0.0246873	A
T2 50%	3	0.0238251	A B
T3 30%	3	0.0228783	B
T4 20%	3	0.0227250	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 98.74%

Anexo 5. Análisis Microbiológico al biol



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO 1312458 - LMT

SOLICITANTE : MELISSA CAPCHA EULOGICO

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : BIOL

1312458)

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástico
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 150 mL aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2013 - 12 - 12
FECHA DE RECEPCIÓN : 2013 - 12 - 12
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2013 - 12 - 16
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2013 - 12 - 20

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1312458
¹ Enumeración de coliformes totales (NMP/mL)	8
¹ Enumeración de coliformes fecales (NMP/mL)	8

Método:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.



La Molina, 23 de Diciembre del 2013

f. Doris Zúñiga Dávila

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina
Teléfono: 6147800 anexo 274
E-mail: lmt@lamolina.edu.pe

LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

☐ (511 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

Anexo 6. Reporte del análisis Agronómico del biol



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : LIZ MELISSA CAPCHA EULOGIO
PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
MUESTRA DE : BIOL
REFERENCIA : H.R. 43312
BOLETA : 10656
FECHA : 30/12/13

Nº LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	Sólidos Totales g/L	M.O. en Solución g/L	N Total mg/L	P Total mg/L	K Total mg/L
975		4.92	26.30	47.54	22.52	1176.00	663.97	1807.50

Nº LAB	CLAVES	Ca Total mg/L	Mg Total mg/L	Na Total mg/L
975		841.70	2150.10	5075.00

LAB	CLAVES	Fe Total mg/L	Cu Total mg/L	Zn Total mg/L	Mn Total mg/L	B Total mg/L
975		49.79	0.70	4.10	27.29	3.25

LAB	CLAVES	Pb Total mg/L	Cd Total mg/L	Cr Total mg/L
975		0.945	0.043	0.519



Dr. Sady García Bendezu
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Anexo 7. Tabla de presión de vapor del agua para 35 °C usados en la prueba PBM

Presión de vapor del agua a varias temperaturas					
<i>T</i> °C	<i>P</i> mmHg	<i>T</i> °C	<i>P</i> mmHg	<i>T</i> °C	<i>P</i> mmHg
-15	1,436	38	49,692	91	546,05
-14	1,560	39	52,442	92	566,99
-13	1,691	40	55,324	93	588,60
-12	1,834	41	58,345	94	610,90
-11	1,987	42	61,504	95	633,90
-10	2,149	43	64,80	96	657,62
-9	2,326	44	68,26	97	682,07
-8	2,514	45	71,882	98	707,27
-7	2,715	46	75,65	99	733,24
-6	2,931	47	79,60	100	760,00
-5	3,163	48	83,71	101	787,57
-4	3,410	49	88,02	102	815,86
-3	3,673	50	92,511	103	845,12
-2	3,956	51	97,20	104	875,06
-1	4,258	52	102,09	105	906,07
0	4,579	53	107,20	106	937,92
1	4,926	54	112,51	107	970,60
2	5,294	55	118,04	108	1 004,42
3	5,685	56	123,80	109	1 038,92
4	6,101	57	129,82	110	1074,56
5	6,543	58	136,08	111	1111,20
6	7,013	59	142,60	112	1148,74
7	7,513	60	149,38	113	1187,42
8	8,045	61	156,43	114	1227,25
9	8,609	62	163,77	115	1267,98
10	9,209	63	171,38	120	1 489,14
11	9,844	64	179,31	125	1 740,93
12	10,518	65	187,54	130	2 026,10
13	11,231	66	196,09	135	2 347,26
14	11,987	67	204,96	140	2 710,92
15	12,788	68	214,17	145	3 116,76
16	13,634	69	223,73	150	3 570,48
17	14,530	70	233,71	175	6 694,08
18	15,477	71	243,9	200	11 659,16
19	16,477	72	254,6	225	19 123,12
20	17,535	73	265,7	250	29 817,84
21	18,650	74	277,2	275	44 580,84
22	19,827	75	289,10	300	64 432,8
23	21,068	76	301,4	325	90 447,6
24	22,377	77	314,1	350	124 001,6
25	23,756	78	327,3	360	139 893,2
26	25,209	79	341,0	365	148 519,2
27	26,739	80	355,11	366	150 320,4
28	28,349	81	369,7	367	152 129,2
29	30,043	82	384,9	368	153 960,8
30	31,824	83	400,6	369	155 815,2
31	33,695	84	416,8	370	157 692,4
32	35,663	85	433,62	371	159 584,8
33	37,729	86	450,9	372	161 507,6
34	39,898	87	468,7	373	163 468,4
35	42,175	88	487,1	374	165 467,2
36	44,563	89	506,1	374,11	165 808,0
37	47,067	90	525,76		

Anexo 8. Base de datos de la prueba PBM

Tiempo (horas)	PRODUCCIÓN DE METANO						PRODUCCIÓN DE BIOGÁS					
	Tratamiento con residuo			Tratamiento en blanco			Tratamiento con residuo			Tratamiento en blanco		
	TR1	TR2	T23	BR1	BR2	BR3	TR1	TR2	T23	BR1	BR2	BR3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	5	5	3	3	2	21	22	21	9	8	10
8	35	34	35	12	13	11	98	99	97	30	29	30
26	81	82	80	21	20	23	178	175	174	50	54	52
32	125	124	125	31	31	30	226	227	224	72	73	75
50	183	183	185	46	48	49	307	305	308	89	89	91
56	226	224	225	61	65	62	338	358	354	120	120	118
74	286	287	286	79	81	80	427	448	445	147	145	145
80	339	338	337	90	94	91	487	485	487	160	162	163
98	396	396	398	101	104	105	527	529	527	173	171	173
104	440	442	441	111	113	110	579	576	578	179	179	180
170	474	476	475	120	119	120	634	635	637	182	182	184
176	489	488	487	122	121	122	670	672	671	182	182	184
194	505	502	504	123	122	123	700	702	702	182	182	184
200	515	513	516	123	122	123	728	725	727	182	182	184
218	528	526	527	123	122	123	737	735	738	182	182	184
224	536	539	537	123	122	123	740	741	742	182	182	184
242	544	546	543	123	122	123	742	743	742	182	182	184
248	551	551	554	123	122	123	743	745	742	182	182	184
266	561	563	562	123	122	123	743	745	742	182	182	184
272	569	567	568	123	122	123	743	745	742	182	182	184
338	577	577	574	123	122	123	743	745	742	182	182	184
344	583	582	581	123	122	123	743	745	742	182	182	184
362	587	587	584	123	122	123	743	745	742	182	182	184
368	588	589	585	123	122	123	743	745	742	182	182	184
386	588	589	586	123	122	123	743	745	742	182	182	184
392	588	589	586	123	122	123	743	745	742	182	182	184

Anexo 9. Base de datos del Bioensayo de germinación

N°	biol puro			10/100			1/100								
	R1 hipocol radicula R2	hipocol radicula R3	hipocol radicula R3	R1 hipocol radicula R2	hipocol radicula R3	hipocol radicula R3	R1 hipocol radicula R2	hipocol radicula R3	hipocol radicula R3						
1	-	-	-	8	10	16	20	29	10	33	41	39	28	40	35
2	-	-	-	12	10	13	21	28	14	36	41	40	25	33	31
3	-	-	-	8	9	3	9	6	12	25	33	36	38	30	22
4	-	-	-	15	18	6	22	9	7	27	29	40	37	37	41
5	-	-	-	29	45	4	11	29	9	29	28	34	34	37	37
6	-	-	-	8	10	16	20	22	18	39	22	28	30	40	31
7	-	-	-	14	16	13	21	10	8	31	42	31	22	15	32
8	-	-	-	11	9	7	21	8	7	25	24	39	24	37	43
9	-	-	-	8	10	16	20	28	15	27	29	40	37	37	41
10	0	-	-	11	9	16	20	10	10	29	28	34	34	37	37
11	-	-	-	15	18	13	21	6	12	33	40	28	30	29	22
12	-	-	-	29	45	14	21	9	7	28	27	32	21	15	32
13	-	-	-	8	10	16	21	6	13	27	29	31	22	40	35
14	-	-	-	9	10	12	20	23	17	29	28	28	29	33	31
15	-	-	-	14	16	8	22	26	15	24	23	34	33	14	33
16	-	-	-	11	9	-	-	10	8	33	41	27	34	25	17
17	-	-	-	8	10	-	-	29	10	26	28	31	22	14	21
18	-	-	-	-	-	-	-	6	12	27	29	40	37	15	32
19	-	-	-	-	-	-	-	9	7	29	28	34	34	40	35
20	-	-	-	-	-	-	-	9	7	33	41	28	30	33	31

0,1/100			0,01/100			Agua de pozo											
R1	hipocol	radicula	R2	hipocol	radicula	R3	hipocol	radicula	R2	hipocol	radicula	R3	hipocol	radicula			
40	27	36	22	37	17	39	17	36	19	36	26	32	30	34	15	26	22
36	27	33	22	14	9	36	23	38	28	38	28	37	21	30	21	37	18
37	33	39	22	35	26	36	22	34	26	17	11	37	18	41	21	36	21
36	28	30	28	39	33	31	25	39	27	17	12	36	22	30	21	35	17
42	35	36	25	38	32	33	22	37	21	40	25	33	23	37	26	31	25
28	25	24	25	35	27	25	15	34	27	38	19	34	21	40	20	32	21
37	30	38	32	37	24	31	21	34	22	35	20	34	20	41	21	25	26
28	25	32	23	16	11	37	28	36	19	17	14	37	18	30	21	31	16
29	26	36	32	30	22	31	25	37	21	14	12	36	22	30	11	23	25
36	28	39	22	14	9	33	22	34	27	35	20	33	23	30	21	30	12
42	35	30	28	35	26	36	23	32	20	38	28	34	21	42	22	31	25
35	28	26	27	39	33	31	25	39	27	17	11	35	16	37	26	32	21
35	28	39	22	35	27	33	22	30	28	17	12	33	21	41	21	25	26
36	28	30	28	37	24	33	20	37	21	35	25	35	25	29	20	30	24
42	35	24	25	14	9	36	23	34	27	36	26	37	18	41	21	26	22
30	25	38	32	35	26	35	23	35	19	15	13	36	22	30	21	36	17
28	25	25	25	39	33	30	24	36	19	38	28	33	31	30	21	22	23
40	27	36	22	15	10	35	21	37	21	17	11	39	25	41	21	31	25
36	27	33	22	10	5	31	25	34	27	17	12	33	23	30	21	32	21
37	33	39	22	38	33	33	22	38	26	35	20	34	21	30	21	25	26