

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización funcional de consorcios microbianos metanogénicos presentes en un colector de desechos del camal ubicado en la parroquia de Pacto, Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología**

**MISHELL ALEJANDRA OSCULLO ENRÍQUEZ**

**Quito, 2018**

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la Srta. Mishell Alejandra Oscullo Enríquez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Diana Astorga García  
Directora de la Disertación  
Quito, 06 de junio de 2018

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado al dueño de toda mi existencia, al creador de todo y lo más sublime, desde lo más grande hasta incluso los más pequeños microorganismos que nadie ve, pero están presentes cumpliendo un papel importante.

Lo esencial es invisible a los ojos (El Principito)

## AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Diana Astorga, por toda su paciencia, tiempo, dedicación y energía empleados en el proyecto.

Al profesor David Chúquer por su colaboración, guía y ayuda en la parte química del proyecto.

A mi familia por su comprensión, amor incondicional, apoyo, confianza, abrazos reconfortantes, y consejos sabios, gracias por estar siempre a mi lado.

A mi amiga Carolina Bósquez por toda tu ayuda y amistad sincera.

A mi monito Jorge Baquero por todo su amor, compañía y complicidad, gracias por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva y motivarme a cumplir mis anhelos.

A la Parroquia de Pacto por su colaboración y apoyo en el proyecto.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar la realización de este proyecto.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BM:** Bosque Modelo

**MCA:** Mancomunidad del Chocó Andino

**CH<sub>4</sub>:** Metano

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**H<sub>2</sub>:** Hidrógeno

**H<sub>2</sub>S:** Ácido sulfhídrico

**CO:** Monóxido de carbono

**CH<sub>3</sub>COOH:** Ácido acético

**N:** Nitrógeno

**NH<sub>3</sub>:** Amoniaco

**RIABM:** Red Iberoamericana de Bosques Modelo

**DMQ:** Distrito Metropolitano de Quito

**TABLA DE CONTENIDOS**

1. Resumen .....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1Objetivos.....	9
3.1.1 Objetivo general.....	9
3.1.2 Objetivos específicos.....	9
4. Materiales y Métodos.....	10
4.1Población y muestra.....	10
4.2 Análisis de la actividad microbiana en los diferentes estratos.....	11
4.3Determinación de los estratos metabólicamente más activos.....	12
5. Resultados.....	14
5.1Análisis de la actividad microbiana en los diferentes estratos.....	14
5.2 Determinación de los estratos metabólicamente más activos.....	14
6. Discusión.....	15
7. Conclusiones.....	21
8. Referencias Bibliográficas.....	22
9. Figuras.....	28
10. Tablas.....	54
11. Anexos.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cisterna de desechos de camal de la parroquia Pacto.....	28
<b>Figura 2.</b> Dispositivo de muestreo diseñado para el efecto.....	29
<b>Figura 3.</b> Toma de muestra del fango residual para ensayos de funcionalidad.....	30
<b>Figura 4.</b> Ensayos de funcionalidad.....	31
<b>Figura 5.</b> Centrifugación de las muestras para posterior análisis.....	32
<b>Figura 6.</b> Toma de mediciones de absorbancia por espectrofotometría.....	33
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración para la glucosa: concentración vs. absorbancia.....	34
<b>Figura 8.</b> Curva de calibración para el acetato de sodio: concentración vs. absorbancia.....	35
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración para el propionato de calcio: concentración vs. absorbancia.....	36
<b>Figura 10.</b> Actividad hidrolítica: Curvas de evolución de la concentración de glucosa vs. tiempo, consumo promedio durante las nueve horas de experimento.....	37
<b>Figura 11.</b> Actividad acetogénica. Curvas de evolución de la concentración de propionato vs. tiempo, consumo promedio durante las nueve horas de experimento. ....	38
<b>Figura 12.</b> Actividad metanogénica. Curvas de evolución de la concentración de acetato vs tiempo, consumo promedio durante las nueve horas de experimento .....	39

<b>Figura 13.</b> Actividad hidrolítica: Análisis Post-Hoc. Comparaciones múltiples entre los nueve estratos.....	40
<b>Figura 14.</b> Actividad acetogénica: Análisis Post-Hoc. Comparaciones múltiples entre los nueve estratos.....	40
<b>Figura 15.</b> Actividad metanogénica: Análisis Post-Hoc. Comparaciones múltiples entre los nueve estratos .....	41
<b>Figura 16.</b> Concentración final de glucosa vs. temperatura del estrato de la cisterna.....	41
<b>Figura 17.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. temperatura del estrato de la cisterna.....	42
<b>Figura 18.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. temperatura del estrato de la cisterna.....	42
<b>Figura 19.</b> Concentración final de glucosa vs. humedad del estrato de la cisterna.....	43
<b>Figura 20.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. humedad del estrato de la cisterna.....	43
<b>Figura 21.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. humedad del estrato de la cisterna.....	44
<b>Figura 22.</b> Concentración final de glucosa vs. pH del estrato de la cisterna.....	44

<b>Figura 23.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. pH del estrato de la cisterna.....	45
<b>Figura 24.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. pH del estrato de la cisterna.....	45
<b>Figura 25.</b> Concentración final de glucosa vs. nitrógeno amoniacal del estrato de la cisterna.....	46
<b>Figura 26.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. nitrógeno amoniacal del estrato de la cisterna.....	46
<b>Figura 27.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. nitrógeno amoniacal del estrato de la cisterna.....	47
<b>Figura 28.</b> Concentración final de glucosa vs. DQO del estrato de la cisterna.....	47
<b>Figura 29.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. DQO del estrato de la cisterna.....	48
<b>Figura 30.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. DQO del estrato de la cisterna.....	48
<b>Figura 31.</b> Concentración final de glucosa vs. sulfatos del estrato de la cisterna.....	49
<b>Figura 32.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. sulfatos del estrato de la cisterna.....	49
<b>Figura 33.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. sulfatos del estrato de la cisterna.....	50

<b>Figura 34.</b> Concentración final de glucosa vs. sólidos volátiles del estrato de la cisterna.....	50
<b>Figura 35.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. sólidos volátiles del estrato de la cisterna.....	51
<b>Figura 36.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. sólidos volátiles del estrato de la cisterna.....	51
<b>Figura 37.</b> Concentración final de glucosa vs. sólidos totales del estrato de la cisterna.....	52
<b>Figura 38.</b> Concentración final de propionato de calcio vs. sólidos totales del estrato de la cisterna.....	52
<b>Figura 39.</b> Concentración final de acetato de sodio vs. sólidos totales del estrato de la cisterna.....	53

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Velocidad máxima de consumo por estrato y sustrato evaluado.....	54
<b>Tabla 2.</b> Actividad específica evaluada por estrato y sustrato evaluado.....	55
<b>Tabla 3.</b> Parámetros físico-químicos de la cisterna de camal de Pacto.....	56

**LISTA DE ANEXOS**

- Anexo 1.** Esquema de la ruta metabólica fermentativa de la metanogénesis.....57
- Anexo 2.** Biodigestor: dispositivo donde se lleva a cabo la digestión anaerobia.....58
- Anexo 3.** Mapa de la ubicación de la Mancomunidad del Chocó Andino.....58

## 1. RESUMEN

La digestión anaerobia es un bioproceso en que la materia orgánica produce metano, una fuente renovable de energía. En el proceso interviene una ruta metabólica fermentativa que involucra diferentes grupos funcionales microbianos en cascada. Se trata de microorganismos hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos que se deben caracterizar funcionalmente para conseguir un tratamiento sostenible y energéticamente aprovechable de residuos. Una cisterna anaerobia colmatada que acumula desechos de camal sin mezcla mecánica ni monitoreo, resulta un problema en un entorno natural vulnerable. Sin embargo, el análisis de la actividad microbiana en el ecosistema formado puede contribuir al aprovechamiento de estos desechos, mediante la determinación de los consorcios más activos en términos de degradación de los metabolitos intermedios, obtenidos de las fases más relevantes en la ruta metabólica de la metanogénesis: glucosa, correspondiente a la actividad hidrolítica; propionato, a la actividad acetogénica y acetato, a la actividad metanogénica. Así, mediante ensayos de funcionalidad, donde se evaluó la velocidad máxima de consumo de estos metabolitos por espectrofotometría, se determinaron por triplicado las actividades hidrolítica, acetogénica y metanogénica específicas del fango residual en la gradiente de profundidad de la cisterna, y se determinaron estadísticamente los estratos funcionalmente más activos. Los resultados evidenciaron la estratificación de la actividad funcional a lo largo de la gradiente de profundidad, donde la mayor actividad hidrolítica se localizó en los dos estratos más profundos, los potenciales acetogénicos más altos correspondieron a dos estratos intermedios y los metanogénicos, al central, exclusivamente. Por tanto, una combinación de consorcios provenientes de diferentes estratos con la mayor actividad funcional potenciaría el aprovechamiento energético de estos fangos residuales: una alternativa de gestión enfocada en la sostenibilidad socio-productiva.

*Palabras clave: comunidades metanogénicas, digestión anaerobia, estratificación, funcionalidad, metanogénesis.*

## 2. ABSTRACT

Anaerobic digestion is a bioprocess where organic matter produces methane, a renewable source of energy. This process involves a fermentative metabolic pathway that involves different microbial functional groups in a metabolic cascade. These are hydrolytic, acetogenic and methanogenic microorganisms that must be functionally characterized in order to achieve a sustainable waste management suitable for fuel and energy production. A clogged anaerobic cistern that accumulates slaughterhouse waste without mechanical mix and/or monitoring becomes a problem in a vulnerable natural environment. However, the analysis of the microbial activity in the ecosystem can contribute to the harnessing of wastes as energy resource, through the determination of the most active consortia in terms of degradation of the most relevant intermediate metabolites, obtained from the most relevant phases in the metabolic route of methanogenesis: glucose, corresponding to hydrolytic activity; propionate, to acetogenic activity and acetate, to methanogenic activity. Thus, by testing functionality, the consumption speed of these metabolites was evaluated by spectrophotometry, hydrolytic, acetogenic and methanogenic specific activities in sludge strata were determined by triplicate in the depth gradient, and the most functionally active strata were statistically identified. Results showed the stratification of the functional activity along the depth gradient, where the highest hydrolytic activity was found in the two deepest layers, the highest acetogenic potentials belonged to two intermediate layers and the central layer exclusively contributed with the most efficient methanogenic consortia. Therefore, a combination of effective consortia from different layers could promote the sustainable energetical use of these sludges as an alternative for slaughterhouse waste management.

*Keywords: methanogenic communities, anaerobic digestion, stratification, functionality, methanogenesis.*

### 3. INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia es un proceso biológico que se produce en ausencia de oxígeno, en donde la materia orgánica se descompone en biogás gracias a la acción de grupos de microorganismos específicos. Este proceso posibilita el tratamiento de desechos orgánicos como lodos o aguas residuales y genera beneficios sociales, económicos y ambientales (FAO, 2011; IDEA, 2007).

El biogás constituye una fuente de energía renovable de interés (FAO, 2011). Está constituido en un 50-70% de metano ( $\text{CH}_4$ ) y posee, además, compuestos considerados impurezas: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrógeno ( $\text{H}_2$ ), ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ), monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ) y compuestos orgánicos volátiles como hidrocarburos halogenados, siloxanos, entre otros (FAO, 2011; Ferrer & Pérez, 2010; IDEA, 2007).

Debido a esto, su aplicabilidad energética depende de su purificación (IDEA, 2007). En efecto, el metano, por sí solo, es un gas aprovechable, debido a su capacidad para generar electricidad, calor y movimiento, lo que lo hace un buen biocombustible (FAO, 2011). De hecho, surge como una alternativa al consumo de combustibles fósiles (Zheng et al., 2012).

En el proceso de digestión anaerobia interviene la metanogénesis (Anexo 1), una ruta metabólica fermentativa compleja, conformada por varias etapas consecutivas diferenciadas, con velocidades de reacción propias de acuerdo a la composición del sustrato y en cuyas reacciones bioquímicas, muchas de ellas simultáneas, intervienen diversos microorganismos que actúan en cascada: se trata de microorganismos hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos (IDEA, 2007; Ito, Yoshiguchi, Ariesyady, & Okabe, 2012; Regueiro et al., 2012). Los microorganismos metanogénicos cumplen la función de enzimas respiratorias, mientras que los no metanogénicos conforman una cadena alimentaria (FAO, 2011).

En la primera etapa conocida como hidrólisis, proceso enzimático cuya velocidad depende de la superficie de las partículas, los microorganismos acidogénicos o fermentativos utilizan enzimas hidrolíticas extracelulares para reducir moléculas complejas como carbohidratos, lípidos y proteínas a partículas y compuestos sencillos solubles (Abassi, Tauseef

& Abassi, 2012). Esta etapa depende de la temperatura, el pH y la composición bioquímica del sustrato (FAO, 2011). Por esto, ésta tiende a ser la fase limitante de la biodigestión, sobre todo cuando se trata residuos con alto contenido de sólidos (IDEA, 2007). Sin embargo, la tasa de hidrólisis, en general, aumenta con la temperatura (Abassi et al., 2012; FAO, 2011). Los géneros destacados en esta etapa son: *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Sporobacterium*, *Megasphaera* y *Bifidobacterium* (IDEA, 2007; Ito et al., 2012; Regueiro et al., 2012).

En segunda instancia, los productos obtenidos son asimilados por microorganismos acidogénicos que los transformarán en ácidos grasos, alcoholes, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y productos intermedios. Estos a su vez, dan lugar a ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH), H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, por la intervención de microorganismos acetogénicos importantes como: *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophobacter wolini*, *Acetobacter woodii* y *Clostridium aceticum* (IDEA, 2007; Ito et al., 2012). Es decir, en esta etapa se lleva a cabo la fermentación de las moléculas orgánicas solubles a compuestos que pueden ser empleados directamente por microorganismos metanogénicos y compuestos orgánicos que deben ser oxidados por microorganismos acetogénicos en la etapa siguiente del proceso (IDEA, 2007). La importancia de la presencia de este grupo funcional radica en la producción de alimento para los grupos de microorganismos que actúan posteriormente, además de que se encarga de eliminar cualquier traza del oxígeno disuelto del sistema (Abassi et al., 2012). Este grupo se compone de microorganismos facultativos y anaerobios obligados conocidos como formadores de ácidos (IDEA, 2007; Ito et al., 2012; Regueiro et al., 2012). Entre los géneros que se destacan en esta etapa se encuentran: *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Ruminococcus*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Bacteroides* (FAO, 2011).

Por último, los microorganismos metanogénicos producen metano a partir de CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Se debe destacar que la mayor parte de metano se obtiene mediante fermentación anaeróbica donde el acetato actúa como proporcionador y receptor de electrones (Abassi & Abassi, 2012; FAO, 2011). Esta vía es conocida comúnmente como metanogénesis acetotrófica y es responsable del 70% del metano producido en los reactores anaeróbicos que se forma a partir de la decarboxilación del ácido acético. Los dos géneros que tienen especies acetotróficas son *Methanosarcina* y *Methanothrix* (IDEA, 2007; Ito et al., 2012; Regueiro et al.,

2012). Sin embargo, para que sean posibles algunas reacciones, se requiere de una asociación sintrófica entre grupos acetogénicos y metanogénicos, generando agregados con diferentes poblaciones (IDEA, 2007).

Los microorganismos metanogénicos pueden ser considerados como los más importantes dentro del consorcio de microorganismos anaerobios, pues son los encargados de la formación de metano y la eliminación del medio de los productos de los grupos anteriores, siendo, además, los que dan nombre al proceso general de biometanización (FAO, 2011). A lo largo de todo el proceso, los metabolitos intermedios de mayor interés de la digestión anaerobia son la glucosa, el propionato y el acetato, lo que realza la importancia de los grupos funcionales responsables de la asimilación de estos sustratos (Ito et al., 2012), sobre todo si lo que se busca es aprovechar energéticamente desechos orgánicos a través de biodigestores.

Los biodigestores anaerobios (Anexo 2) son dispositivos que permiten producir biogás a la vez que proporcionan tratamiento a los desechos orgánicos (Young et al., 2016). Se trata de un tanque hermético anaerobio, que posee un sistema de alimentación de la materia orgánica, una salida del digestado y un sistema de colección del gas producido. Dentro del dispositivo ocurre el proceso de fermentación gracias a la acción de consorcios microbianos, que actúan en cascada sobre diferentes metabolitos resultantes de la degradación de la materia orgánica para obtener, principalmente, dos productos finales útiles: biogás y biol (Chavarría, 2014; Erreyes & Pérez, 2015; FAO, 2011; Garzón, 2011). Los diseños de los biodigestores pueden variar dependiendo del sustrato a utilizar y el producto final que se desee obtener, y se clasifican en función de su capacidad para mantener concentraciones altas de microorganismos en el reactor, siendo el reactor de mezcla completa el más utilizado para residuos (IDEA, 2007). En la actualidad, los biodigestores son construidos en forma cilíndrica, con cubiertas fijas y flotantes, que permiten mantener control de la presión, la temperatura, el pH y la humedad (Erreyes & Pérez, 2015; FAO, 2011).

Existen estudios a nivel internacional que utilizan biodigestores anaerobios para la producción de biogás a través del tratamiento de desechos orgánicos, lodos y aguas residuales (Regueiro et al., 2012; Rivero, Solero, & Pérez, 2013; Young et al., 2016; Zheng et al., 2012). En Ecuador, se han construido varios biodigestores para el tratamiento de diferentes residuos orgánicos con un rendimiento de biogás poco apto como para suplir a cabalidad necesidades

energéticas (Dillon, 2016; El Telégrafo, 31 de enero del 2014; Garzón, Ochoa, & Peñafiel, 2015; MAGAP, 2016). No obstante, los estudios realizados se enfocan en el diseño e ingeniería del dispositivo de biodigestión (Arce, 2011; El Diario, 22 de diciembre del 2012; Erreyes, & Pérez, 2015; La Hora, 19 de enero del 2017), más no en los principios biológicos desencadenados en su interior, que son los que permiten la generación de biogás de forma eficiente (Regueiro et al., 2012).

Por tanto, la información que dispone el país en cuanto a biodiversidad microbiana en biodigestores y cómo aprovecharla para generar energía es limitada. De esta manera cualquier evidencia científica que pueda proporcionarse con respecto a los consorcios microbianos que intervienen en la producción de biogás, puede delinear alternativas más eficientes para la gestión de desechos. De hecho, este tipo de enfoque investigativo resulta de vital importancia, pues la clave para optimizar tiempo y recursos en el tratamiento de desechos orgánicos es el correcto establecimiento de la metanogénesis en el biodigestor (Ito et al., 2012).

Como se ha mencionado, dicho proceso es llevado a cabo por diferentes consorcios microbianos que deben caracterizarse funcionalmente para conseguir un tratamiento eficaz y sostenible de desechos humanos, a la vez que una producción de biogás energéticamente aprovechable (Ito et al., 2012; Regueiro et al., 2012; Rivero et al, 2013). Precisamente, se trata de un requerimiento urgente de parroquias rurales del noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) de un enclave particular (Anexo 3) como es el Bosque Modelo (BM) de la Mancomunidad del Chocó Andino (MCA) (Registro Oficial, diciembre del 2015; RIABM, 2016).

En efecto, por un lado, las parroquias que conforman la MCA comparten fuertes condicionantes de la ruralidad como la deficiencia de servicios básicos de alcantarillado y recolección de residuos, para las que se requiere de alternativas de manejo que reduzcan los riesgos de contaminación y enfermedad para su población y no amenacen la biodiversidad circundante (Instituto de la Ciudad, 2012; SENPLADES, 2013). Por otro lado, la MCA se constituye como el primer Bosque Modelo del Ecuador, al incluir dos puntos calientes de biodiversidad: la cadena montañosa Tumbes-Chocó-Darién y los Andes Tropicales, abarcar además 11 sistemas ecológicos y mantener más del 60% del territorio bajo alguna categoría de manejo direccionada a la conservación y al uso sustentable de recursos (RIABM, 2016). Por tanto, se busca compaginar en el territorio desarrollo humano y conservación mediante el

establecimiento y promoción de alternativas productivas sostenibles, lo que resalta la necesidad primordial de una adecuada gestión de desechos humanos y su aprovechamiento.

En este contexto, se identifica a la acumulación de desechos humanos y su descarga como el problema más acuciante de la MCA. En lo que se refiere a servicios higiénicos en la parroquia de Pacto, específicamente, un 7% de la población aún carece de los mismos, más del 60% acumulan los desechos derivados en pozos ciegos y cerca del 3% aún los desfoga directamente hacia ríos y quebradas (INEC, 2010; Massa, 2015). No obstante, el problema principal de la parroquia constituye la cisterna del camal (Figura 1). Se trata de una cisterna anaerobia en la que se han depositado heces, sangre, vísceras y demás productos de la matanza de las reses para consumo de la comunidad, más desechos humanos provenientes de las letrinas inmediatas. Estos desechos se han acumulado por más de seis años, sin mezcla mecánica ni monitoreo.

Esto ha ocasionado no solo la acumulación de desechos orgánicos sin tratamiento sino, muy posiblemente, la estratificación de las comunidades microbianas presentes (Salminen, Einola, & Rintala, 2001; Yu, Shao, & He, 2008), y la liberación incontrolada de biogás hacia la atmósfera. Adicionalmente, la cisterna se colmató en julio de 2016, plateándose su demolición y la construcción de un nuevo depósito anaerobio para no detener las actividades del camal (Presidente de la Junta Parroquial de Pacto, comunicación personal, 11 de octubre de 2016). Sin embargo, no se ha tomado en consideración que dichos desechos aún constituyen potenciales fuentes de nutrientes y biocombustibles si se consigue explotarlos sosteniblemente (FAO, 2011; Young et al., 2016; Zheng et al., 2010). Por tanto, se busca aprovechar un recurso que normalmente genera un impacto negativo a nivel de salud humana y ambiental, al constituir una fuente de patógenos y nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, con el potencial de contaminar aguas superficiales y subterráneas, además de suelos y aire, al emitir gases de efecto invernadero como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  y otros contaminantes como el amoníaco (Erreyes & Pérez, 2015; Nielsen, Seadi, & Popiel, 2009).

La mayoría de los residuos sólidos generados en mataderos son biodegradables. Estos residuos tienen una elevada carga orgánica, son ricos en proteínas y grasas, y poseen un alto contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio (Ruiz, 2011). Cabe mencionar que los contenidos estomacales procedentes del ganado generan varios compuestos como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ),  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  (Erreyes & Pérez, 2015). Además, la digestión de residuos de camal sin

mecanismos de mezcla es óptima para la producción de biogás, pues dichos residuos tienen una tendencia a la estratificación, lo que genera gradientes verticales que pueden representar diferencias importantes en cuanto a eficiencia en la actividad metabólica de las comunidades microbianas (Ong, Greenfield, & Pullammanappallil, 2002; Salminen et al., 2001).

Por tanto, existen suficientes evidencias de que los desechos acumulados en la cisterna de camal de Pacto podrían utilizarse como sustratos para la producción de biogás, aplicable a la satisfacción de necesidades energéticas puntuales como proporcionar la energía calórica para realizar actividades básicas como cocinar y hervir agua (FAO, 2011), siempre y cuando se potencie la actividad metabólica de los consorcios microbianos implicados y se depure adecuadamente el biogás generado (IDEA, 2017; Regueiro et al., 2012). Se requiere, por ende, de la optimización del proceso de biodigestión para obtener una producción significativa de biogás, ligada directamente al mantenimiento de alta actividad microbiana a nivel de consorcios hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos (Ito et al., 2012; Regueiro et al., 2012; Rivero et al., 2013). De esta manera, se generaría una alternativa al tratamiento de residuos orgánicos que fomentaría el reciclaje de nutrientes, la producción de energía renovable, la posibilidad de aplicación a sistemas de digestión caseros en zonas rurales de escasos recursos y deficiente manejo de desechos (Sing & Gu, 2010), así como a sistemas de mayor escala (Nielsen et al., 2009),

Esto delimita las acciones a emprender dentro de la línea de investigación planteada por este proyecto y que se traduce en la pregunta de investigación que se plantea a continuación: ¿Cómo evaluar la eficiencia de la microbiota involucrada en la producción de biogás dentro del colector estratificado, de manera que pueda determinarse el o los estratos que contienen los microorganismos hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos metabólicamente más activos?

### **3.1 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad hidrolítica, acetogénica y metanogénica de los consorcios microbianos metanogénicos en la gradiente de profundidad del colector de desechos de camal de la parroquia de Pacto.

#### **3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Analizar el consumo de los diferentes sustratos requeridos por los microorganismos hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos en la gradiente de profundidad del colector bajo condiciones controladas.
- 2.** Identificar estadísticamente el o los estratos más idóneos para la obtención de consorcios microbianos metanogénicos con mayor potencialidad para la optimización de procesos de biodigestión.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 POBLACIÓN Y TOMA DE MUESTRA

La población blanco de esta investigación es la comunidad microbiana metanogénica contenida en la cisterna colectora de desechos de camal de la parroquia de Pacto, comprendiéndose con esto a los microorganismos participantes en las reacciones bioquímicas correspondientes a tres procesos metabólicos principales: la hidrólisis, la acetogénesis y la metanogénesis propiamente dicha. Sin embargo, debido al tiempo de acumulación sin mezcla, se considera un proceso de estratificación vertical que requiere de un muestreo por estrato, debido a que diferencias físico-químicas pueden traducirse en diferencias de eficiencia en la actividad metabólica de los consorcios microbianos implicados (Ong et al., 2002; Salminen et al., 2001).

La toma de muestras del fango residual a lo largo del gradiente de profundidad se realizó mediante un dispositivo de muestreo diseñado específicamente para el efecto (Figura 2), inspirado en la acción de un equipo tipo roseta para el muestreo vertical de aguas oceánicas (Pallud, Meile, Laverman, Abell, & Van Cappellen, 2007).

Un volumen de 75 ml de cada estrato de 15 cm de espesor (Figura 3), 25 ml para cada actividad metabólica (hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis), en una profundidad total de 135 cm (nueve estratos en total establecidos en base a estudios ecológicos similares en comunidades metanogénicas [Jian, Zheng, Chen, Xiao, & Wang, 2011; Chen & Yin, 2013]), se colectó por triplicado mediante recipientes herméticos. Es decir, se colectaron 27 muestras para cada actividad a evaluar, con un total de 81 muestras para ensayo. Las muestras obtenidas se transportaron en condiciones de temperatura de 4 a 8°C y fueron procesadas en el laboratorio, en un lapso máximo de 24 horas (INECC-CCA, 2012; Regueiro et al., 2012).

## 4.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN LOS DIFERENTES ESTRATOS

El análisis de la actividad microbiana se centró en las poblaciones responsables de la degradación de los metabolitos intermedios más importantes de la metanogénesis: glucosa, propionato y acetato (Ito et al., 2012). Por tanto, se realizaron ensayos por triplicado para determinar la capacidad hidrolítica, acetogénica y metanogénica de la microbiota presente en los estratos muestreados de acuerdo a un protocolo elaborado en base a los propuestos por Regueiro et al. (2012) e Ito et al. (2012).

Los ensayos de funcionalidad se realizaron en frascos herméticos de cristal con tapón perforable de goma de 40 ml (Figura 4). Previo a los ensayos, los 25 ml de fango de cada estrato fueron centrifugados a 2500 rpm por 5 min (Figura 5) y un volumen de 20 ml del sobrenadante fue reemplazado por 20 ml del sustrato a evaluar (Ito et al., 2012). Así, para medir la actividad hidrolítica específica se empleó glucosa (Regueiro et al, 2012), con una concentración inicial 60 mM, es decir, 10,8 g l<sup>-1</sup>. Ácido propiónico con una concentración inicial de 60 mM (11,16 g l<sup>-1</sup>) fue utilizado para evaluar la actividad acetogénica específica y acetato de amonio con una concentración inicial de 60 mM (4,92 g l<sup>-1</sup>) para determinar la actividad metanogénica específica.

La biomasa a la que se incorporó el sustrato correspondiente fue incubada en condiciones anaerobias, agitación suave de 30 rpm y una temperatura de 37°C por 10 horas (Ito et al, 2012). Cada hora, se centrifugaron 2,5 ml de la biomasa de ensayo a 2500 rpm por 5 min y se tomó 1 ml del sobrenadante para el análisis del consumo del sustrato respectivo (Ito et al, 2012). El primer valor obtenido correspondió a la cantidad de sustrato inicial tras el periodo de acondicionamiento procurado a la microbiota bajo ensayo.

La concentración de los diferentes sustratos se analizó mediante espectrofotometría (Figura 8), uno de los métodos más sencillos, accesibles y útiles, además de ser sensibles y requerir de mínimas cantidades de muestra (Arena & López, 2004). Por tanto, en base al análisis

previo del espectro de absorción de los distintos analitos implicados en los sustratos a evaluar, la absorbancia de cada muestra correspondiente a la actividad hidrolítica fue leída a 202 nm, mientras que a 225 nm y 230 nm fueron leídas las actividades acetogénica y metanogénica, respectivamente. Para ello, se utilizaron celdas de cuarzo. Con las absorbancias obtenidas para cada ensayo a lo largo del tiempo, se construyó una base de datos en Excel y se las transformó a concentración del sustrato bajo análisis, en base a las curvas de calibración respectivas (Figuras 7 a 9). La evolución de la concentración de cada sustrato fue expresada en concentración vs. tiempo.

#### 4.3 DETERMINACIÓN DE LOS ESTRATOS METABÓLICAMENTE MÁS ACTIVOS

Para cada ensayo de funcionalidad, se calcularon la actividad hidrolítica, acetogénica y metanogénica específica, cada una calculada como la relación entre la pendiente máxima de desaparición del sustrato y la concentración de biomasa empleada, es decir, la concentración inicial que se empleó para cada ensayo (5 ml). Las actividades específicas fueron calculadas por resolución de las ecuaciones (1), (2), (3) y (4) (Soto, Méndez, & Lema, 1993).

$$(1) \quad r_x = \frac{dx}{dt} = U_m x \frac{S}{(K_s + S)} \text{ con}$$

$r_x$  = rango de crecimiento

$x$  = concentración microbiana

$U_m$  = rango máximo específico de crecimiento

$S$  = Concentración limitante de sustrato

$$(2) \quad Y_{xs} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{-(X_o - X)}{(S_o - S)} \text{ con}$$

$Y_{xs}$  = Relación entre rango de crecimiento microbiano y rango de remoción de sustrato

$X_o$  = Concentración inicial de sustrato

$S_o$  = Sustrato inicial

$$r_s = \frac{-ds}{dt} = U_m S \left( \frac{S_o + X_o}{Y_{xs} - S} \right) \div (K_s + S) \text{ con}$$

rs = Rango de desaparición del sustrato

$$(3) \mathbf{Ac} = \left(\frac{1}{X_0}\right) \left(\frac{-ds}{dt}\right)$$

$$\mathbf{Ac} = \left(\frac{Acm}{X_0}\right) S \frac{[X_0 + Y_{xs}(S_0 - S)]}{(K_s + S)} \text{ con}$$

Ac = Actividad o rango específico del consumo de sustrato

$$(4) \mathbf{Acm} = \frac{Um}{Y_{xs}} \text{ con}$$

Acm = Actividad específica máxima o rango máximo específico del consumo de sustrato

Se confeccionaron gráficas de dispersión, con promedios y desviaciones estándar de los datos obtenidos para hacer visibles posibles diferencias entre las réplicas manejadas durante los ensayos.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa SPSS Statistical Software 2020. Previo al análisis de varianza de las matrices confeccionadas, se procedió a comprobar el cumplimiento de los supuestos del ANOVA. Al no respetarse los supuestos de normalidad, igualdad de varianzas y homogeneidad ni mediante las transformaciones de datos aplicables, se procedió a estudiar los resultados mediante análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. De encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos, se realizaron comparaciones múltiples.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN LOS DIFERENTES ESTRATOS

La estratificación de la actividad funcional a lo largo de la gradiente de profundidad resultó evidente (Figuras 10 a 12). Los resultados obtenidos demostraron una mínima desviación estándar entre las réplicas de cada estrato tanto para la velocidad máxima de consumo del sustrato (Tabla 1) como para la actividad específica respectiva (Tabla 2).

Se registraron velocidades promedio entre 0,64 y 2,84 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para la glucosa, 0,46 y 2,71 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para el propionato, y 0,45 y 1,45 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de acetato (Tabla 1). En cuanto a la actividad metabólica específica, se encontró un consumo de sustrato por unidad de biomasa y tiempo (g<sub>sustrato</sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) de entre 0,32 y 1,42 para la hidrólisis, 0,23 y 1,36 para la acetogénesis y 0,22 y 0,73 para la metanogénesis (Tabla 2).

### 5.2. DETERMINACIÓN DE LOS ESTRATOS METABÓLICAMENTE MÁS ACTIVOS

El análisis estadístico de los resultados de la actividad metabólica específica arrojó diferencias significativas de eficiencia microbiana entre estratos (hidrólisis:  $\chi^2 = 25,098$ ; gl = 8; p = 0,001; acetogénesis:  $\chi^2 = 24,847$ ; gl = 8; 0,001 < p < 0,01; metanogénesis:  $\chi^2 = 23,281$ ; gl = 8; 0,001 < p < 0,01). El consorcio hidrolítico más efectivo se localizó en los dos estratos más profundos, 1 y 2, es decir, entre los 105 y los 135 cm de profundidad (Figura 13). El más eficiente en términos de acetogénesis se encontró en los estratos intermedios 5 y 6, entre los 45 y los 75 cm de profundidad (Figura 14). Por último, el consorcio metanogénico más activo perteneció al estrato 5, entre los 60 y los 75 cm de profundidad (Figura 15).

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados corroboraron la hipótesis en torno a la estratificación del fango residual tras la acumulación de desechos de la matanza sin tratamiento ni mezcla mecánica. Las diferencias metabólicas detectadas entre los estratos pueden deberse a diversos factores. Uno de ellos es el tipo de desechos que se encuentran en la cisterna. Como se menciona en los estudios de Ong et al. (2002) y de Salminen et al. (2001), los desechos provenientes de ganado sin ningún tipo de mezcla mecánica tienden a la estratificación.

Esto genera gradientes verticales que se traducen en diferencias en la actividad metabólica entre las comunidades microbianas provenientes de los diferentes estratos. Cabe mencionar que en el estudio de Regueiro et al. (2012), se concluyó que el tipo de sustrato y las condiciones operacionales que se manejen son los que determinan el desarrollo de las poblaciones microbianas que intervienen en la metanogénesis. Por otro lado, el tipo de sustrato determina la comunidad microbiana que se desarrolle en un determinado ecosistema (Young et al., 2016) y Donoso, Retamal, Carballa, Ruiz y Chamy (2000) determinaron que, si se emplean sustratos complejos, la hidrólisis puede llegar a convertirse rápidamente en el paso limitante.

Por tanto, el tipo de desechos contenido en la cisterna predispone el medio para que las condiciones ambientales no sean uniformes a lo largo del gradiente vertical (Ong et al., 2002), es decir, que existan ciertos factores físico-químicos que sean determinantes no solo para la funcionalidad metabólica de los consorcios microbianos sino para la presencia o ausencia de los diferentes grupos funcionales implicados a lo largo de dicho gradiente. Por ende, el análisis de los factores físico-químicos característicos de la cisterna colectora de desechos de camal de donde provienen las muestras analizadas (Tabla 3), realizado simultáneamente por López (2018) en base a metodologías estándar, podría aportar argumentos para explicar los resultados obtenidos.

En efecto, uno de los factores físico-químicos importantes resulta la presencia de oxígeno, debida a la falta de hermeticidad y porosidad de la cisterna, en vista de que en un proceso de digestión anaerobia el aire debe ser excluido (Álvarez, Otero, & Lema, 2010). Esto

concuera con los resultados obtenidos: mayor actividad de los grupos funcionales metanogénicos en seis estratos más profundos (Figuras 10 a 12), debida a las condiciones de anaerobiosis que facilitan la supervivencia de los grupos funcionales implicados en la metanogénesis. En contraste, la actividad encontrada en los estratos superficiales fue menor a la de los estratos más profundos, debido a que estos están expuestos al oxígeno y bastan mínimas cantidades del mismo para perjudicar el desempeño metanogénico microbiano. Cabe mencionar también que los microorganismos metanogénicos crecen más lento que los microorganismos aerobios. Por tanto, requieren de más tiempo para adaptarse a cambios en la carga orgánica, temperatura u otra condición ambiental que varíe a lo largo del gradiente (Abassi et al., 2012).

La temperatura es otro factor físico-químico que, en varios estudios, ha sido determinante para llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia. En efecto, Donoso et al. (2000) estudiaron el efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos involucrados en las principales reacciones de la digestión anaerobia, obteniendo como resultado que el proceso se ve fuertemente influenciado por la temperatura, con la actividad hidrolítica ejerciendo el mayor efecto (Abassi et al., 2012; Sánchez et al., 2001). Durante la digestión anaeróbica de desechos orgánicos, la cinética general del proceso se encuentra limitada por la cinética del paso más lento, que usualmente es la etapa de la metanogénesis propiamente dicha. Por el contrario, cuando se trata de materia orgánica compleja o el tratamiento anaeróbico es conducido a baja temperatura, la hidrólisis constituye el paso limitante (Vavilin, Fernandez, Falatsi, & Flotats, 2008).

Normalmente, el proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo a temperaturas en un rango mesofílico de 35 a 37° C. Sin embargo, a lo largo del gradiente vertical de la cisterna, la temperatura se mantuvo relativamente estable entre los 23,0 y 23,6°C (López, 2018). Al comparar la concentración final de los sustratos evaluados con la temperatura de cada estrato en la cisterna (Figuras 16 a 18), se consigue identificar a este factor como influyente en la actividad metabólica de los consorcios metanogénicos en el gradiente vertical. La temperatura tendría la capacidad de definir los grupos funcionales más activos dentro de cada estrato del fango residual, debido a que las diferencias en temperatura que se observan entre los estratos son coherentes con las actividades específicas priorizadas (Tabla 3). En efecto, los dos estratos más profundos de la cisterna (105-135 cm de profundidad) con una temperatura en un rango de 23,3

a 23,5°C, superados únicamente por el estrato superficial localizado entre los 30 y los 45 cm de profundidad, fueron los estratos con mayor actividad hidrolítica. Los dos estratos intermedios (45-75 cm de profundidad) registraron la menor temperatura en la gradiente de profundidad (23°C) y concentraron la actividad acetogénica más eficiente. Por último, la actividad metanogénica se limitó al estrato medio (60-75 cm de profundidad) que también registró la menor temperatura de la cisterna (Tablas 2 y 3).

Justamente, las variaciones de temperatura pueden no tener el mismo efecto en las diferentes etapas de la digestión anaeróbica. En efecto, Donoso et al. (2000) concluyeron que la temperatura óptima para la acetogénesis es menor que la temperatura óptima para la actividad hidrolítica y que la temperatura óptima para la metanogénesis es menor a la de las actividades tanto hidrolítica como acetogénica. Cabe mencionar que los ensayos de funcionalidad fueron llevados a cabo a una temperatura de 35°C y a esa temperatura se registraron tanto la actividad hidrolítica, como la acetogénica y la metanogénica a lo largo de todo el gradiente de profundidad. En efecto, Donoso et al. (2000) concluyeron que la temperatura óptima para la fase de metanogénesis se encontraba entre los 34,8 y los 35°C, lo que fue corroborado también por la evaluación adicional de la evolución del ácido acético. Sin embargo, para optimizar las actividades hidrolítica y acetogénica, la temperatura debía ser mayor (Donoso et al., 2000). Por otro lado, en los ensayos de funcionalidad a 35°C temperatura sí se evidenciaron tanto actividad hidrolítica como acetogénica óptimas en el gradiente vertical. Esto puede deberse a la naturaleza del sustrato empleado en la evaluación de las diferentes actividades específicas, ya que no se utilizaron sustancias complejas (Donoso et al., 2000). No obstante, esta actividad óptima fue limitada a los estratos más profundos en la temperatura de experimentación evaluada.

Los resultados también pueden contrastarse con otros parámetros físico-químicos medidos por López (2018): nitrógeno amoniacal, sólidos volátiles, sólidos totales y demanda bioquímica de oxígeno. La mayor cantidad de sólidos (Figuras 34 a 39) y la mayor demanda química de oxígeno (Figuras 28 a 30), por ejemplo, se encontraron en los estratos más profundos, decrecieron hacia los estratos intermedios y fueron casi nulos en los estratos superficiales. Esto se concatena con los resultados de porcentaje de humedad o contenido de agua en los distintos estratos en función de la profundidad (Tabla 3): el menor contenido de agua correspondió a los estratos profundos y aumentó de manera significativa hacia los estratos

intermedios, llegando a tener casi 100% de agua en los estratos superficiales (Figuras 19 a 21). Es decir, la mayor cantidad de sólidos se encontró en los estratos donde se ubicaron tanto la mayor actividad hidrolítica como las mayores actividades acetogénica y metanogénica. Esto concuerda con lo registrado por Regueiro et al. (2012), donde la mayor concentración de sólidos se acumuló en las capas profundas, traduciéndose en mayor cantidad de agregados microbianos activos de comunidades metanogénicas y en mayor disponibilidad de materia orgánica biodegradable por parte de las comunidades microbianas. Por tanto, la mayor disponibilidad de biomasa y materia orgánica en los estratos más profundos resultó determinante para una mayor actividad metanogénica.

Las mediciones de sulfatos a lo largo del gradiente de profundidad coinciden con las encontradas en Chen (2013). La mayor concentración de los mismos se localizó en los estratos más profundos y disminuyó ligeramente hacia los estratos intermedios y superficiales (Tabla 3), lo cual según Chen (2013), refleja influencias de mezcla de la columna de fango (Figuras 31 a 33). Sin embargo, la presencia de elevadas concentraciones de sulfato en el sustrato ( $50000 \text{ mg l}^{-1}$ ) puede producir la inhibición del proceso anaeróbico, especialmente de la metanogénesis (Tobón, 2017). En efecto, en presencia de altas concentraciones de sulfato, las bacterias metanogénicas compiten con las sulfato-reductoras por los mismos sustratos y el resultado de esta competencia va a determinar la proporción de ácido sulfhídrico y metano en el biogás producido (FAO, 2011). No obstante, la mayor concentración de sulfato de la cisterna es varios órdenes de magnitud más baja que la limitante (Tabla 3) como para poner en riesgo la metanogénesis.

En cuanto al factor pH a lo largo del gradiente vertical (Figuras 22 a 24), este se mantuvo entre 6,9 a 7 (Tabla 3), lo que concuerda con lo que menciona Donoso et al. (2000): el tratamiento anaerobio es adecuado en un pH de 6,6 a 7,6, con un rango óptimo de alrededor de 7,0 a 7,2. Más allá de estos límites, la digestión anaerobia puede darse, pero con menor eficiencia a valores de pH por debajo de 6,2 (Álvarez et al., 2010). La eficiencia decae rápidamente y las condiciones pueden resultar bastante tóxicas para las bacterias que intervienen en el proceso de la metanogénesis. Por tanto, las condiciones de la cisterna no limitarían la cascada metabólica de la metanogénesis.

Otro de los factores físico-químicos evaluados fue el nitrógeno amoniacal, que se encontró en mayor cantidad en los estratos profundos, y en menor cantidad en los estratos

intermedios a superficiales (Figuras 25 a 27). Esto indica que es un factor determinante para una actividad microbiana eficiente en los estratos porque, al encontrarse en cantidades óptimas de entre 50 hasta 1000 mg l<sup>-1</sup>, es un nutriente que aporta al desarrollo microbiano como estimulador del proceso de biodigestión (FAO, 2011). Sin embargo, a pesar de ser un nutriente de importancia para el crecimiento bacteriano, una concentración excesiva del mismo de 1500 a 3000 mg l<sup>-1</sup> puede llegar a limitar su crecimiento porque actuaría como un agente de toxicidad (FAO, 2011). No obstante, la concentración de nitrógeno amoniacal en los cinco estratos más profundos de la cisterna, es decir, entre los 60 y los 135 cm de profundidad de la cisterna resulta óptima para el desempeño metabólico de microorganismos metanogénicos (Tabla 3).

Tras el análisis general de los parámetros físico-químicos de los diferentes estratos presentes en el gradiente vertical de la cisterna colectora de desechos de camal (López, 2018) y su influencia sobre la capacidad metabólica de los consorcios hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos implicados, destacan especialmente la temperatura, el pH, la demanda química de oxígeno, la concentración de sulfatos y de nitrógeno amoniacal, el contenido de agua y de los sólidos totales y volátiles. Diferencias significativas en términos de variabilidad físico-química se tradujeron en marcadas diferencias en eficiencia metabólica de los consorcios microbianos a lo largo del gradiente de profundidad (López, 2018). Sin embargo, a excepción de la presencia de oxígeno en los estratos superiores y de una temperatura muy por debajo de la óptima, todos los parámetros analizados se encuentran dentro de los límites que viabilizan una metanogénesis relativamente adecuada en la cisterna (Álvarez et al. 2010; FAO, 2011; Regueiro et al., 2012; Tobón, 2017).

No obstante, la bioaumentación de los consorcios hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos metabólicamente más activos identificados podría conducir a un mejor aprovechamiento energético de los residuos de camal (Ito et al., 2012; Regueiro et al., 2012). Esto podría traducirse en la optimización del proceso de biodigestión anaerobia en un biodigestor. Además, aportaría conocimiento y tecnología aplicable a sistemas de biodigestión tanto caseros como de mayor escala, en vista de que se requiere del mantenimiento de altos niveles de actividad microbiana. Es decir, resulta vital la presencia y el mantenimiento funcional de los consorcios más importantes que intervienen en el proceso de digestión anaerobia, hidrolíticos, acetogénicos y metanogénicos, para que se cumpla la ruta metabólica de la metanogénesis de manera eficiente dentro de un biodigestor. Con esto, no solo dejarían de

acumularse residuos de riesgo para la salud humana y el ambiente y emitirse incontroladamente gases de efecto invernadero a la atmósfera, sino que se estaría generado una alternativa de manejo de desechos de camal sostenible y replicable a todas las parroquias de una zona particularmente vulnerable como es el Bosque Modelo del Chocó Andino.

## 7. CONCLUSIONES

Los desechos de camal contenidos en la cisterna de la parroquia de Pacto se encuentran estratificados, lo que se traduce en diferencias significativas en cuanto a funcionalidad metabólica de los consorcios microbianos metanogénicos a lo largo del gradiente vertical.

La mayor actividad hidrolítica se encuentra en los estratos más profundos, entre los 105 y los 135 cm de profundidad, mientras que la mayor actividad acetogénica se encuentra en los estratos intermedios, localizados entre los 45 y los 75 cm de profundidad, y la mayor actividad metanogénica se encuentra en el estrato intermedio, entre los 60 y los 75 cm de profundidad.

Los factores físico-químicos que influyen y resultan determinantes en las diferencias en cuanto a actividad y presencia de los grupos microbianos funcionales de la metanogénesis en los diferentes estratos a lo largo del gradiente son la temperatura, el pH, la demanda química de oxígeno, la concentración de nitrógeno amoniacal y sulfatos, y el contenido de agua y de los sólidos totales y volátiles.

La ruta metabólica de la metanogénesis se completa a lo largo del gradiente vertical de la cisterna. Sin embargo, se podría conseguir una producción más eficiente de biogás al manipularse las condiciones fisicoquímicas idóneas en cada etapa de la metanogénesis y/o los consorcios que intervienen en ellas.

La optimización del proceso de biodigestión en un biodigestor depende en gran medida del tipo de sustrato a emplear, las condiciones fisicoquímicas en cada etapa de la ruta metabólica y el mantenimiento de una alta actividad microbiana.

La mayor actividad hidrolítica se localizó en los estratos más profundos, los potenciales acetogénicos más altos correspondieron a los estratos intermedios y los metanogénicos, a los intermedios. Por ello, una combinación de consorcios altamente eficientes provenientes de diferentes estratos potenciaría el aprovechamiento energético de estos fangos residuales, lo que realzaría la importancia de los resultados obtenidos para la generación de una alternativa de gestión de desechos enfocada en la sostenibilidad socio-productiva de una parroquia rural de un enclave especialmente vulnerable en términos ambientales.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abassi, T., Tauseef, S.M., Abassi, S.A. (2012). Anaerobic digestion for global warming control and energy generation an overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16, 3228-3242. Doi: 10.1016/j.rser.2012.02.046
- Álvarez JA, Otero L., & Lema JM. A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. *Bioresour Technol* 2010; 101:1153–8. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.061
- Antoni, D., Zverlov, V. V., & Schwarz, W. H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (1), 23-35. Doi: 10.1007/s00253-007-1163-x
- Arce, J. (2011). *Diseño de un biodigestor para generar biogás y abono a partir de desechos orgánicos de animales aplicables en las zonas agrarias del litoral* (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana, Guayaquil. Recuperada de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1593/15/UPS-GT000209.pdf>
- Arena, I., López, J. (2004). *Espectrofotometría de absorción*. Métodos de laboratorio. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria\\_de\\_absorcion.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf)
- Chavarria, I. (2014). *Implementación de un biodigestor en unidades pecuarias*. (Monografía pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Division Regional de Ciencia Animal. Coahuila-México. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4125/IMPLEMENTACIONDEUNBIODIGESTORENUNIDADESPECUARIAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chen, J., & Yin, X. (2013). Stratified Communities of Methanogens in the Jiulong River Estuarine Sediments, Southern China. *Indian Journal of Microbiology*. Publicación anticipada en línea. Doi: 10.1007/s12088-013-0397-9
- Dillon, A. (2016). *Digestión anaerobia en lechos bacterianos para remoción de nutrientes y generación gas metano a partir de agua residual de una extractora de aceite crudo de palma*. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5703/1/126457.pdf>

- Donoso-Bravo A, Retamal C, Carballa M, Ruiz-Filippi G, Chamy R. Influence of temperature on hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis in anaerobic digestion: parameter identification and modeling application. *Water Sci Technol* 2009; 60(1):9–17. Doi: 10.2166/wst.2009.316
- El Diario. (22 de diciembre de 2012). *Ecuaimco propone sustituir pozos sépticos por biodigestores*. Recuperado de <http://www.eldiario.ec/noticias-manabiecuador/250699-ecuaimco-propone-sustituir-pozos-septicos-por-biodigestores/>
- El Telégrafo. (31 de enero del 2014). *Desechos de camal se vuelven energía*. Recuperado de <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/quito/11/desechos-del-camal-se-vuelven-energia>
- Erreyes, E., & Pérez, O. (2015). *Implementación de un biodigestor para producir biogás a partir de los residuos orgánicos generados en el centro de faenamiento municipal Tena, Napo*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4079/1/236T0134%20UDCTFCI.pdf>
- FAO. (2011). Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. *Manual de biogás* 2011. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/019/as400s/as400s.pdf> ISBN 978-95-306892-0
- Ferrer, 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. *Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar*, 43 (1), 9-20. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120681002.pdf> ISSN: 0138-6204
- Garzón, M. (2011). *Estudio de un biodigestor generador de gas metano mediante abono orgánico para prácticas de energías alternativas en el laboratorio de la facultad de Ingeniería Civil y Mecánica de la Universidad Técnica de Ambato*. (Tesis Pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Ambato-Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1344/1/Tesis%20I.%20M.%2095%20-%20Garz%C3%B3n%20Cuji%20Marco%20Fabricio.pdf>
- Garzón, P., Ochoa, V & Peñafiel, R. (2015). Estudio de la generación de gas metano a partir del agua residual del proceso de extracción de aceite crudo de palma en biodigestores

experimentales. *Avances en Ciencias e Ingeniería (Quito)*, 7 (2), 130-137. Recuperado de file:///C:/Users/Paola/Downloads/274-279-2-PB.pdf

Gobierno Autónomo Descentralizado de Pácto (2015). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de Pácto*. Recuperado de: [http://pacto.gob.ec/images/PDyOT\\_Pacto\\_Actualizado.pdf](http://pacto.gob.ec/images/PDyOT_Pacto_Actualizado.pdf)

IDAE (2007). *Biomasa. Digestores anaerobios*. (Energías Renovables. Energía de Biomasa). Madrid, España: Publicaciones del Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. ISBN-13: 978-84-96680-21-0

INECC-CCA, (2010). Manual de métodos de muestreo y preservación de muestras de las sustancias prioritarias para las matrices prioritarias del proname. México. Recuperado de [http://navarrof.orgfree.com/Docencia/AnalisisInstrumental/UT1/manual\\_de\\_metodos\\_de\\_muestreo\\_inecc\\_2013.pdf](http://navarrof.orgfree.com/Docencia/AnalisisInstrumental/UT1/manual_de_metodos_de_muestreo_inecc_2013.pdf)

INEC (2010). Censo de Población y Vivienda. Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/resultados/>

Instituto de la Ciudad de Quito (2012). *Estudio sobre las dinámicas productivas territoriales rurales en el Distrito Metropolitano de Quito*. Tomo I. Quito, Ecuador: Municipio del Distrito Metropolitano de Quito.

Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H. D., & Okabe, S. (2012). Identification and quantification of key microbial trophic groups of methanogenic glucose degradation in an anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology*, 123, 599-607. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.108>

Jiang; L., Zheng, Y., Chen, J., Xiao, X., & Wang, F. (2011). Stratification of Archaeal communities in shallow sediments of the Pearl River Estuary, Southern China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99 (4), 739-751. Recuperado de: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10482-011-9548-3>

La Hora. (19 de enero del 2017). *Biodigestores una alternativa que crece*. Recuperado de [http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1032736/-1/Biodigestores,\\_una\\_\\_alternativa\\_que\\_crece.html#.WIGZLNhDMw](http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1032736/-1/Biodigestores,_una__alternativa_que_crece.html#.WIGZLNhDMw)

- López, E. V. (2018). *Caracterización de variables físico-químicas en lodos y emisiones gaseosas de un colector de desechos de camal en la Comunidad de Pacto* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador.
- MAGAP. (2016). *MAGAP contribuye a construcción de biodigestores en El Oro*. Recuperado de <http://www.agricultura.gob.ec/magap-contribuye-a-instalacion-de-biodigestores-en-el-oro/>
- Massa, D. C. (2015). *La centralidad de la microrregión del noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito: Modelos de desarrollo, procesos e influencias en las dinámicas sociales y económicas territoriales. Caso parroquia de Gualea* (Tesis de maestría). Recuperada del repositorio de FLACSO-ANDES: 67.192.84.248.
- Nielsen, J.B., Seasi, T.A., & Popiel P.O. (2009). The future of Anaerobic Digestion and biogás utilization. *Bioresource Technology*, 100, 5478-5464. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.12.046
- Ong, H. K., Greenfield, P. F., & Pullammanappallil, P. C. (2002). Effect of Mixing on Biomethanation of Cattle-Manure Slurry. *Environmental Technology*, 23(10), 1081-1090. Doi: 10.1080/09593332308618330
- Pallud, C., Meile, C., Laverman, A. M., Abell, J., & Van Cappellen, P. (2007). The use of flow-through sediment reactors in biogeochemical kinetics: *Methodology and examples of applications Marine Chemistry*, 106, 256-271. Doi:10.1016/j.marchem.2006.12.011
- Registro oficial. (2015). Órgano del gobierno del Ecuador. Recuperado de <https://www.registroficial.gob.ec/index.php/registro-oficial-web/publicaciones/registro-oficial.html>
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-Gutierrez, J., Stamsb, A. J. M., Lema; J. M., Carballa, M. Regueiro (2012). Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiological Research*, 167, 581- 589. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.002>

- RIABM. (2016). *El primer bosque modelo de Ecuador se integra con la RIABM*. Red Iberoamericana de Bosques modelo. Recuperado de <http://www.bosquesmodelo.net/la-riabm-se-realizo-su-reunion-anual-del-directorio-el-9-de-marzo-en-puerto-rico/>
- Rivero, M., Solera, R., & Pérez, M. (2013). Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.006>
- Ruiz, S. (2011). *Plan de gestión de residuos de camal del cantón Antonio Ante*. (Tesis de grado). Escuela Politécnica Nacional Quito, Ecuador. Recuperado de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3743/1/CD-3437.pdf>
- Salminen, J., Einola, J. & Rintala, J. (2001). Characterization and Anaerobic Batch Degradation of Materials Accumulating in Anaerobic Digesters Treating Poultry Slaughterhouse Waste. *Environmental Technology*, 22(5), 577-585. Doi: 10.1080/09593332208618261
- Sánchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L. & Martín, A. 2001 Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. *Process Biochem.* 37(5), 483–489. Doi: 10.1263/jbb.102.328
- Sandoval, A. M. (2018). *Aislamiento y reconstrucción de consorcios microbianos para la optimización de la producción de biogás a partir de fangos residuales* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador.
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017. Recuperado de: <http://www.buenvivir.gob.ec/versiones-plan-nacional;jsessionid=A862DFAF7D2A198E8FF5DFD387C57291#tabs1>
- Sing, J., Gu, S. (2010). Biomass conversion to energy in India-A critique. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1367-1378. Doi: 10.1016/j.rser.2010.01.013
- Soto M, Méndez R, Lema JM. Methanogenic and non-methanogenic activity tests –theoretical basis and experimental set-up. *Water Res* 1993; 27(8):1361–76. Doi: 10.1016/0043-1354(93)90224-6
- Tobón, A. (2017). Evaluación del impacto ambiental en biodigestores anaeróbicos en el SENA, regional Cesar. *Reto 5* (5). 39-49. ISSN 2333-8059

- Vavilin VA, Fernandez B, Palatsi J, Flotats X. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manage* 2008; 28(6):939–51. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>
- Young, K., Min, H., Park, M., Lee, K., Kim, D., y Mo, Y. (2016). Combination of different substrates to improve anaerobic digestion of sewage sludge in a wastewater treatment plant. *International biodeterioration & biodegradation*, 109, 73-77. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.01.006> \t "doilink
- Yu, G. H., He, P. J., Shao, L. M., He, P. P. (2008). Stratification Structure of Sludge Floccs with Implications to Dewaterability .*Environmental Science and Technology*, 42, 7944–7949. Doi: 10.1021/es8016717
- Zheng, Y., Wei, J., Li, J., Feng, S., Li, Z., Jiang, G... & Ning, T. (2012). Anaerobic fermentation technology increases biomass energy use efficiency in crop residue utilization and biogas production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 16 (7), 4588-4596. Doi: 10.1016/j.rser.2012.03.061

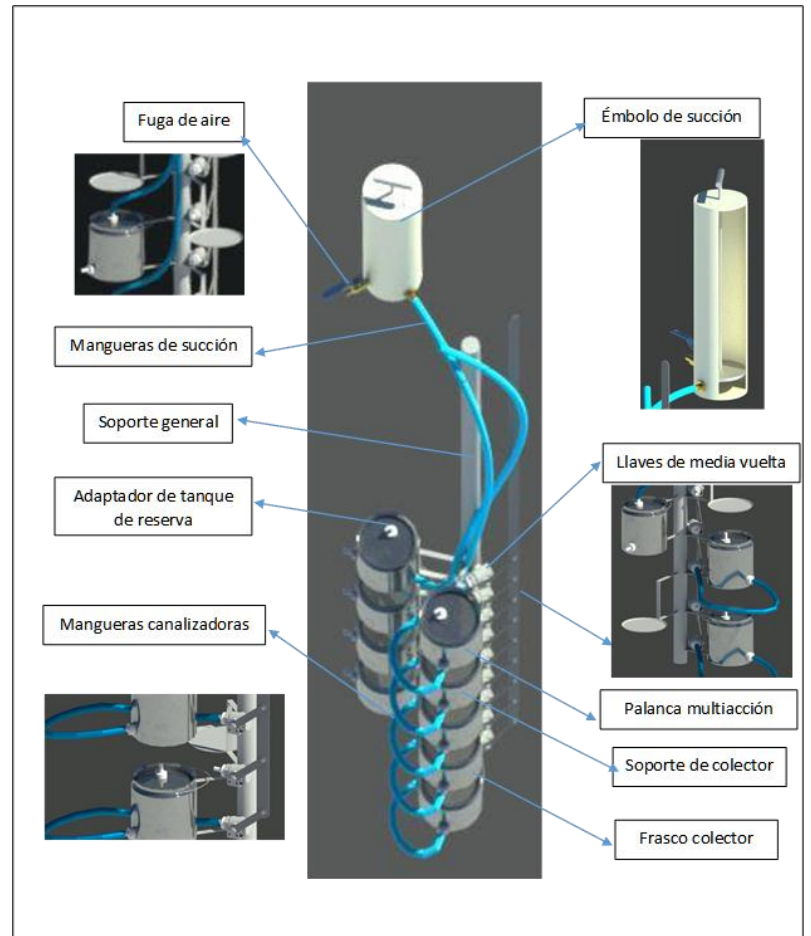
## 9. FIGURAS



**Figura 1. Cisterna de desechos de camal de la parroquia de Pacto.**



(a)



(b)

**Figura 2. Dispositivo de muestreo diseñado para el efecto.** Obtiene simultáneamente nueve estratos de 3 litros cada uno. Cedido por (Sandoval, 2018). (a) Dispositivo de muestreo utilizado para obtener muestras de los 9 estratos de la cisterna, (b) diseño del dispositivo de muestreo utilizado en la cisterna.



**Figura 3. Toma de muestra del fango residual para cada ensayo de funcionalidad.**



(a)

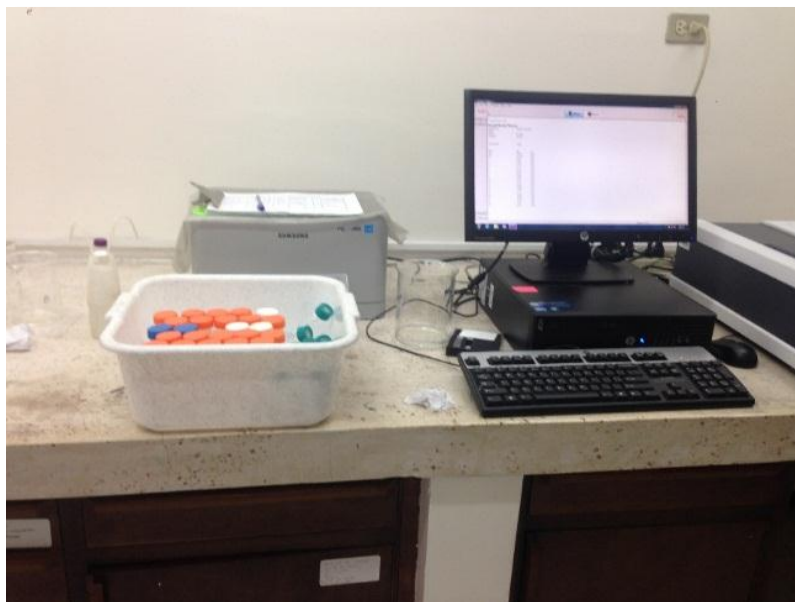


(b)

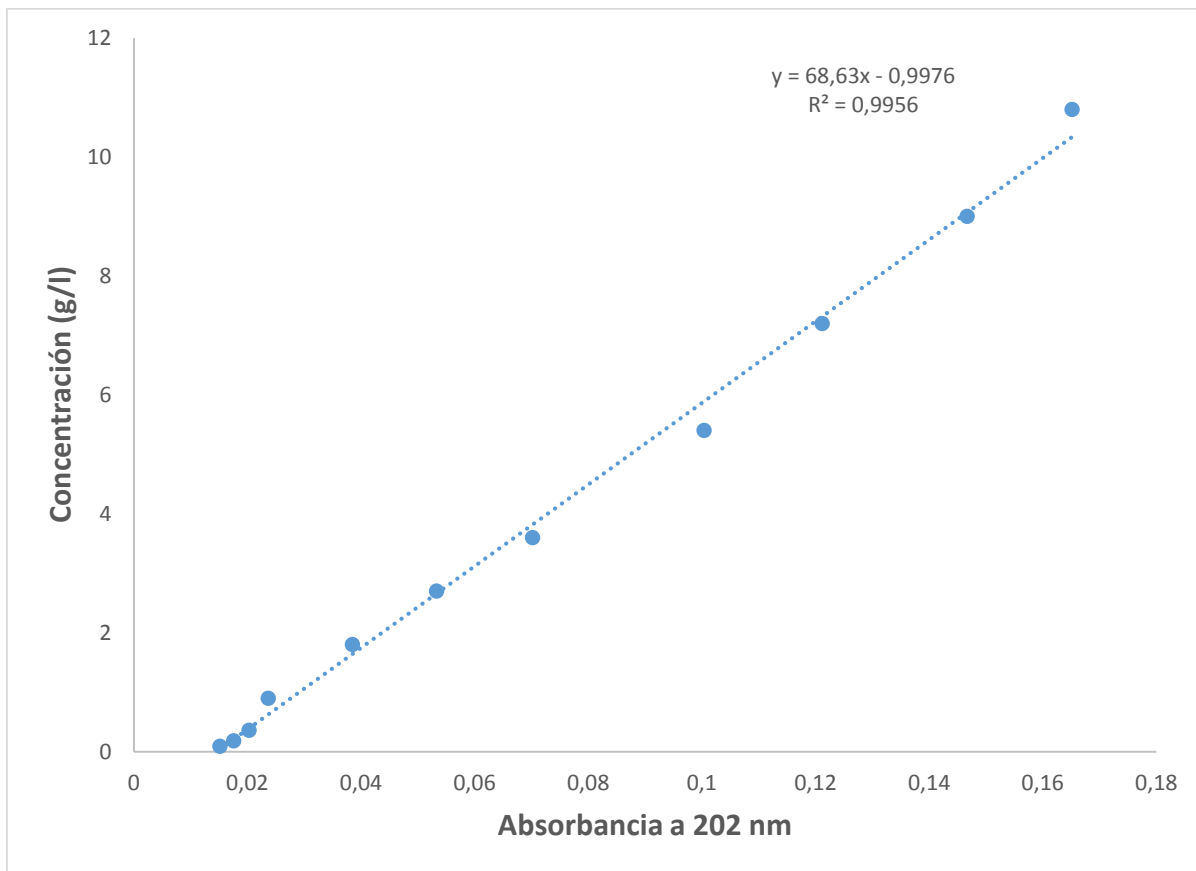
**Figura 4. Ensayos de funcionalidad.** (a) Incubadora con agitación en la que se han incluido los 81 frascos de vidrio con tapón perforable correspondientes a los ensayos por triplicado de cada una de las actividades metabólicas evaluadas en los nueve estratos de la cisterna: hidrólisis, metanogénesis y metanogénesis. (b) frascos de vidrio con tapón perforable empleados en los ensayos de funcionalidad.



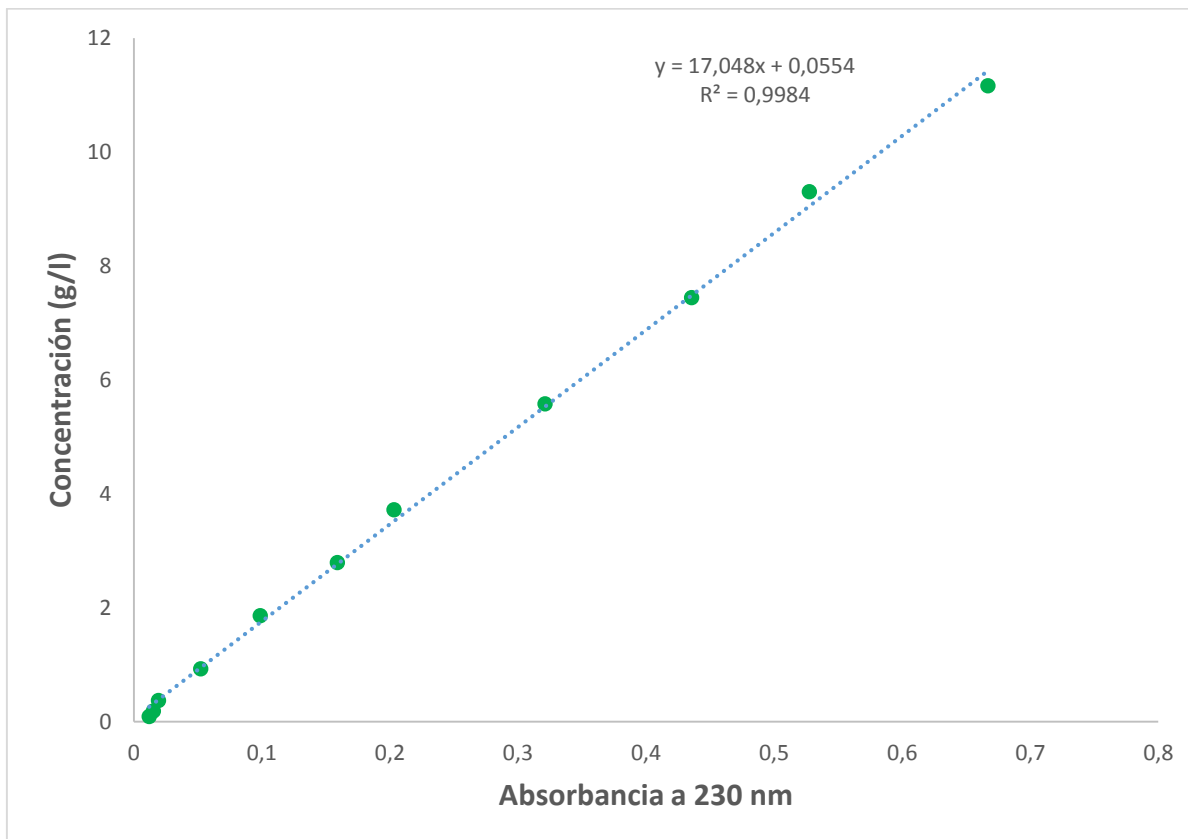
**Figura 5. Centrifugación de las muestras para posterior análisis.**



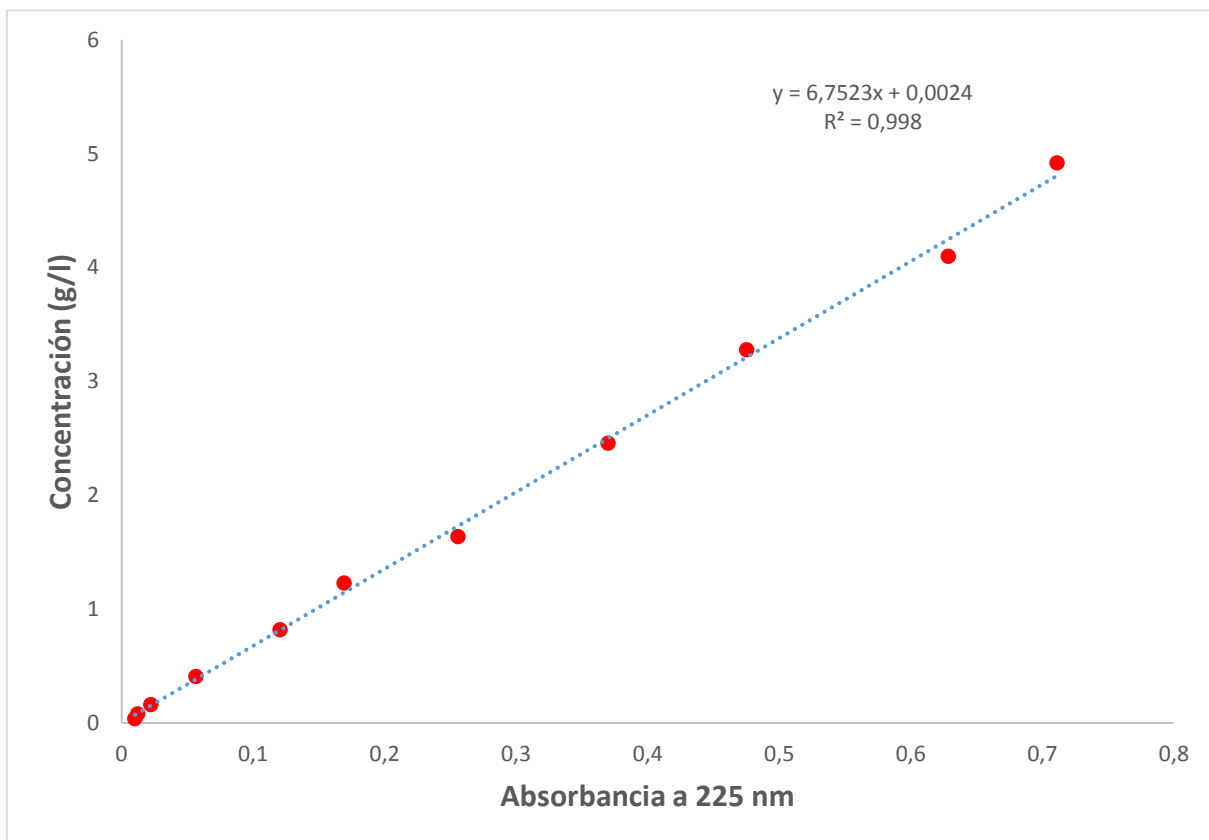
**Figura 6. Toma de mediciones de absorbancia por espectrofotometría.**



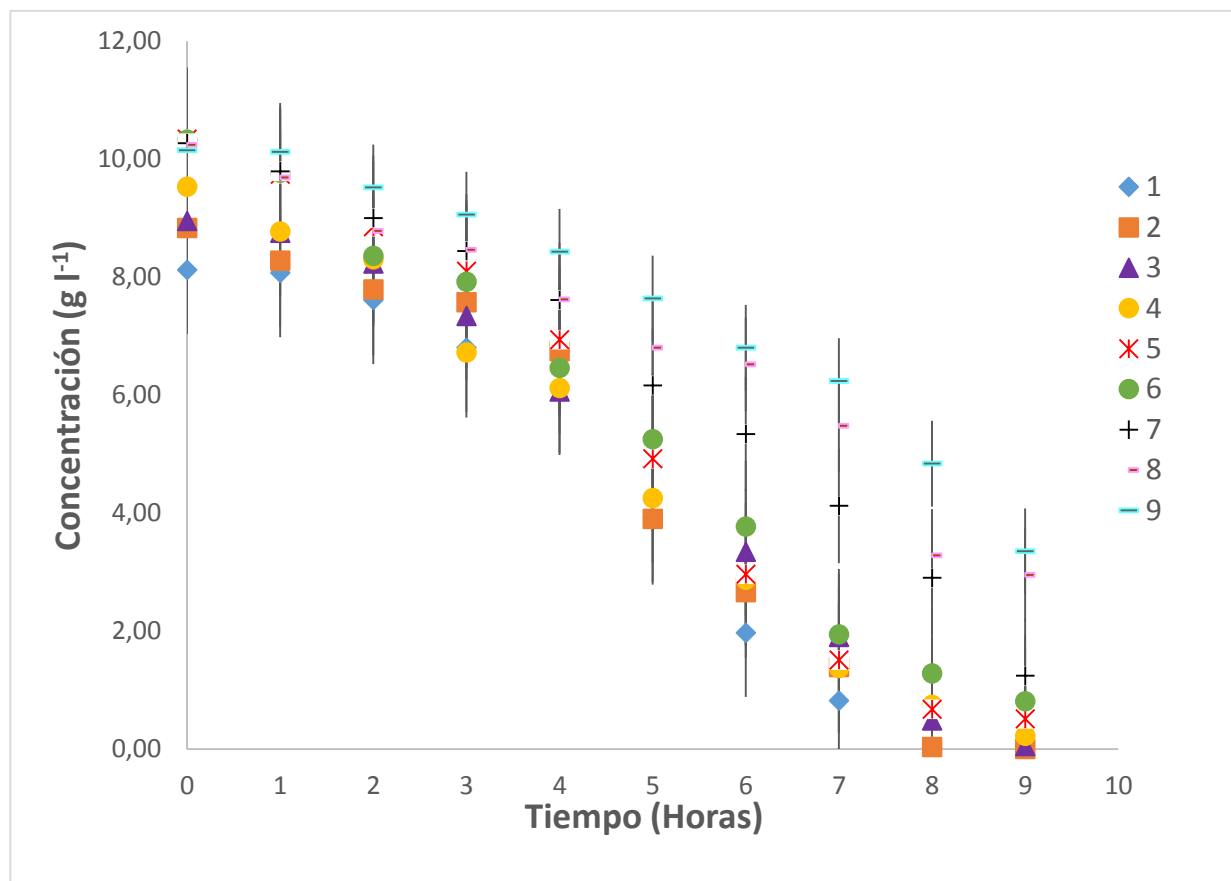
**Figura 7. Curva de calibración para la glucosa: concentración vs. absorbancia.**



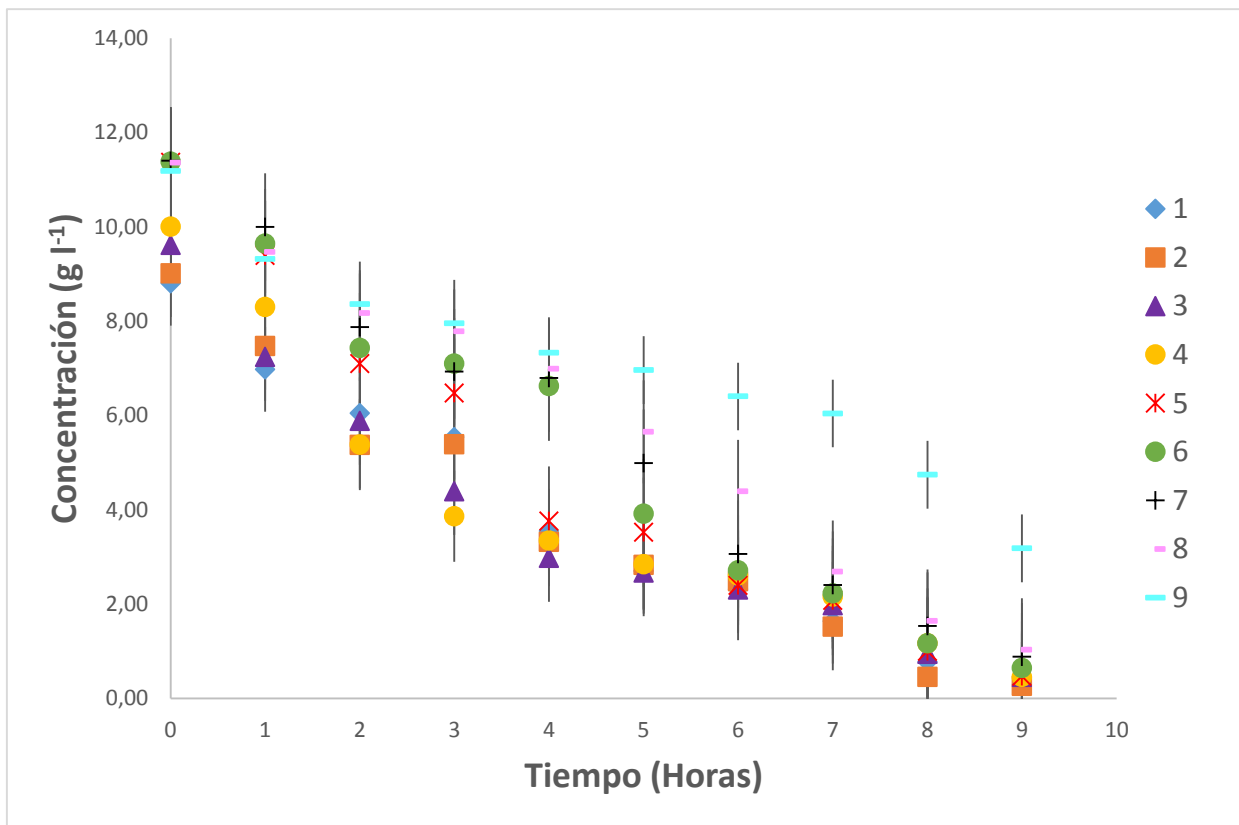
**Figura 8. Curva de calibración para el propionato de calcio: concentración vs. absorbancia.**



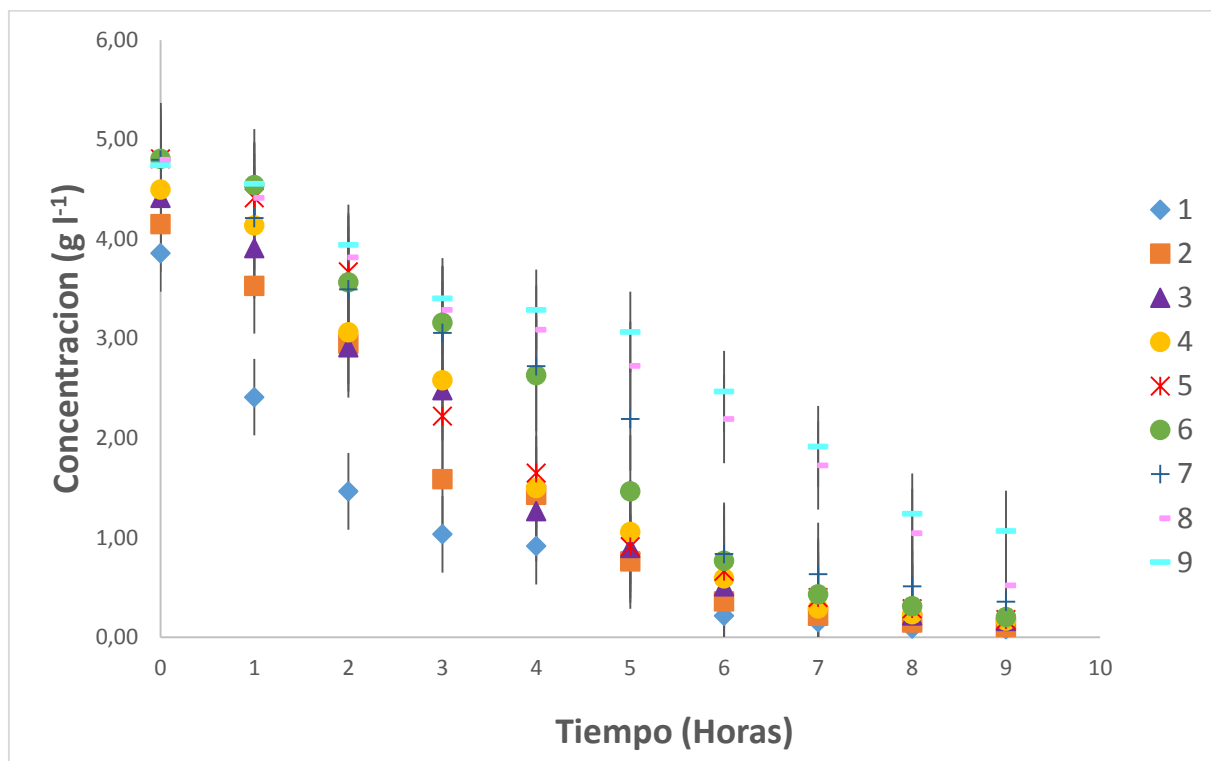
**Figura 9. Curva de calibración para el acetato de sodio: concentración vs. absorbancia.**



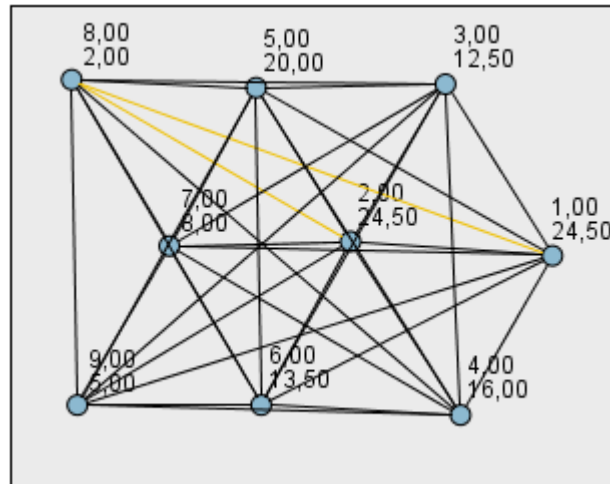
**Figura 10. Actividad hidrolítica: Curvas de evolución de la concentración de glucosa vs tiempo, consumo promedio durante las nueve horas de experimento. Las barras representan la desviación estándar de las réplicas en cada uno de los nueve estratos evaluados.**



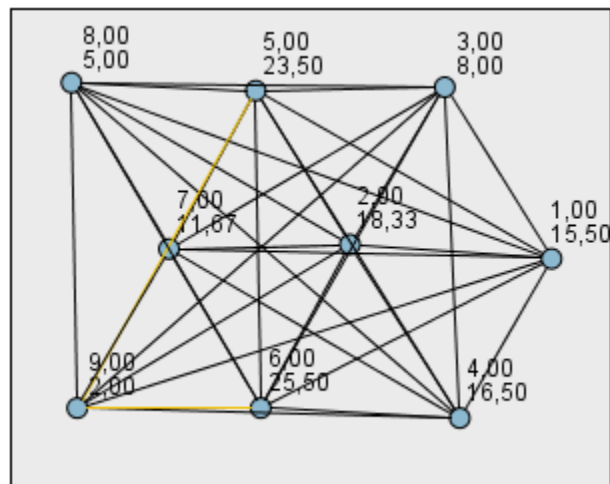
**Figura 11. Actividad acetogénica: Curvas de evolución de la concentración de propionato de calcio vs tiempo, consumo promedio durante las nueve horas de experimento. Las barras representan la desviación estándar de las réplicas en cada uno de los nueve estratos evaluados.**



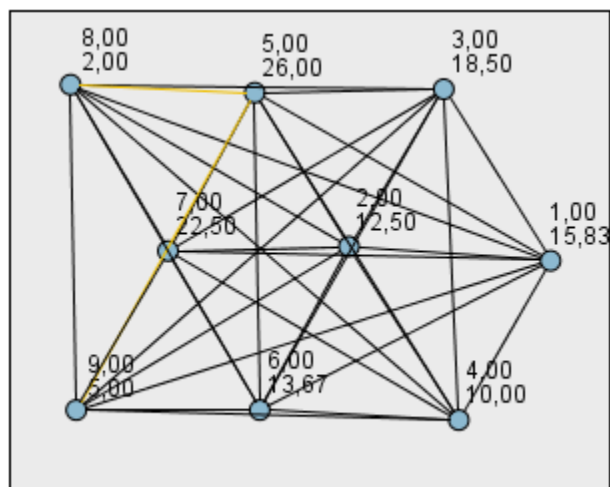
**Figura 12. Actividad metanogénica: Curvas de evolución de la concentración de acetato de sodio vs tiempo, consumo promedio durante las nueve horas de experimento. Las barras representan la desviación estándar de las réplicas en cada uno de los nueve estratos evaluados.**



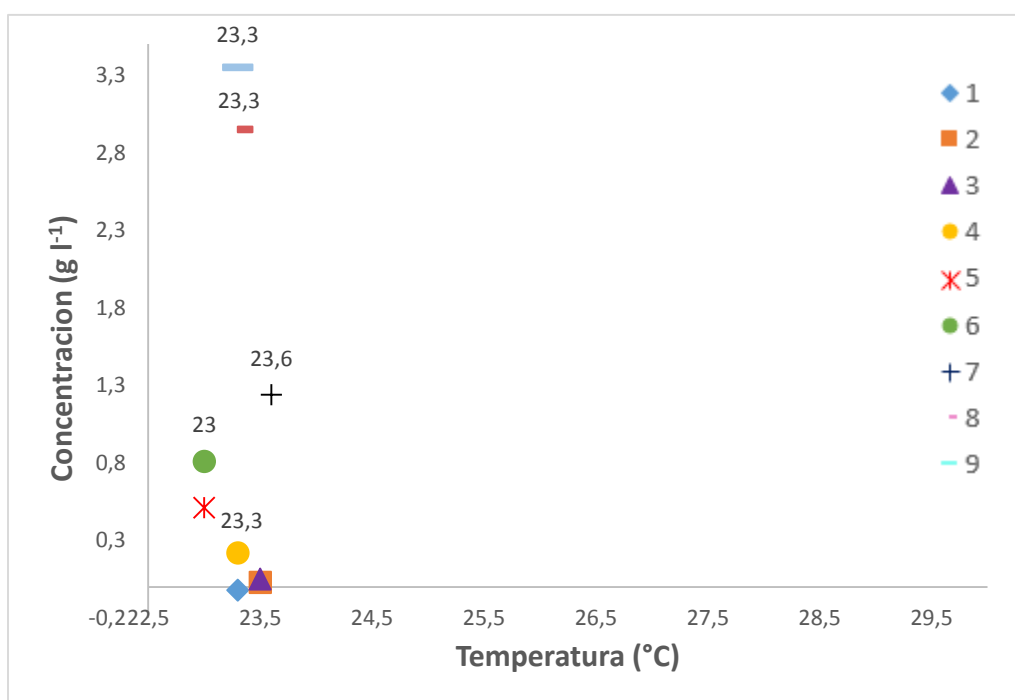
**Figura 13. Actividad hidrolítica: Análisis Post-Hoc. Comparaciones múltiples entre los nueve estratos.** Cada nudo representa el rango promedio de cada estrato, con los estratos identificados con los numerales respectivos. Los consorcios de los estratos 1 y 2 son los más eficientes.



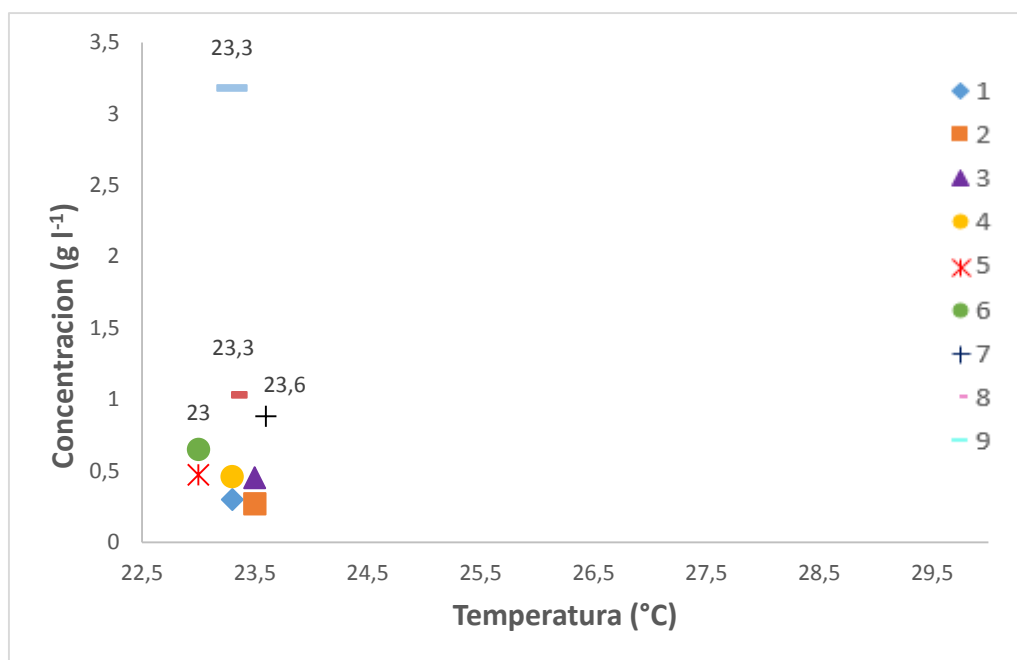
**Figura 14. Actividad acetogénica: Análisis Post-Hoc. Comparaciones múltiples entre los nueve estratos.** Cada nudo representa el rango promedio de cada estrato, con los estratos identificados con los numerales respectivos. Los consorcios de los estratos 5 y 6 son los más eficientes.



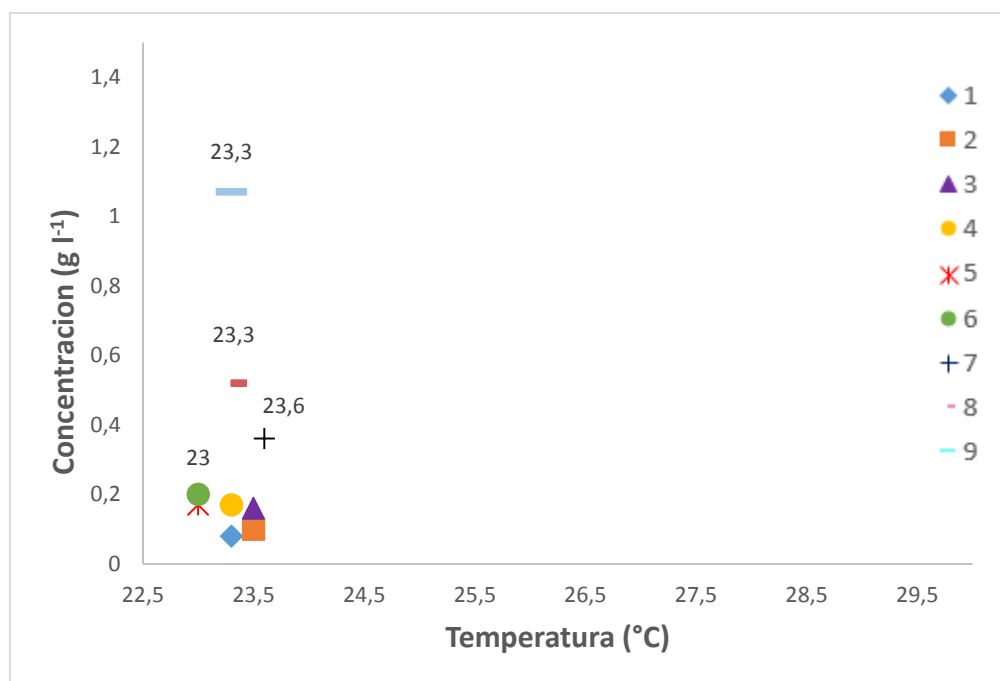
**Figura 15. Actividad metanogénica: Análisis Post-Hoc. Comparaciones múltiples entre los estratos.** Cada nudo representa el rango promedio de cada estrato, con los estratos identificados con los numerales respectivos. El consorcio del estrato 5 es el más eficiente.



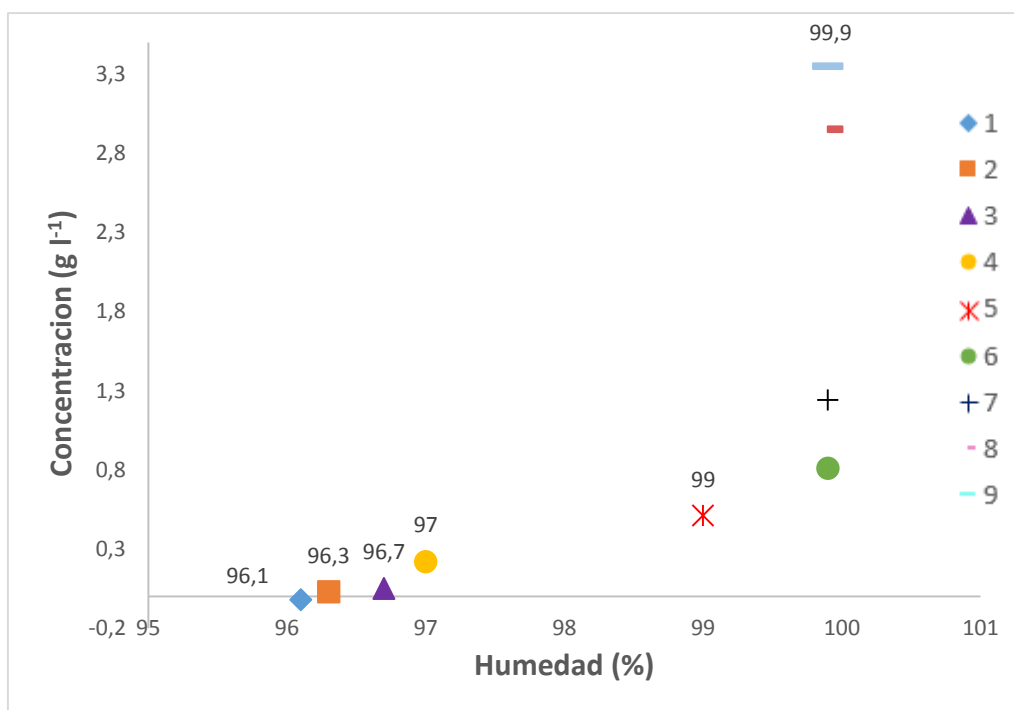
**Figura 16. Concentración final de glucosa vs. temperatura del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la temperatura circundante registrada por López (2018).



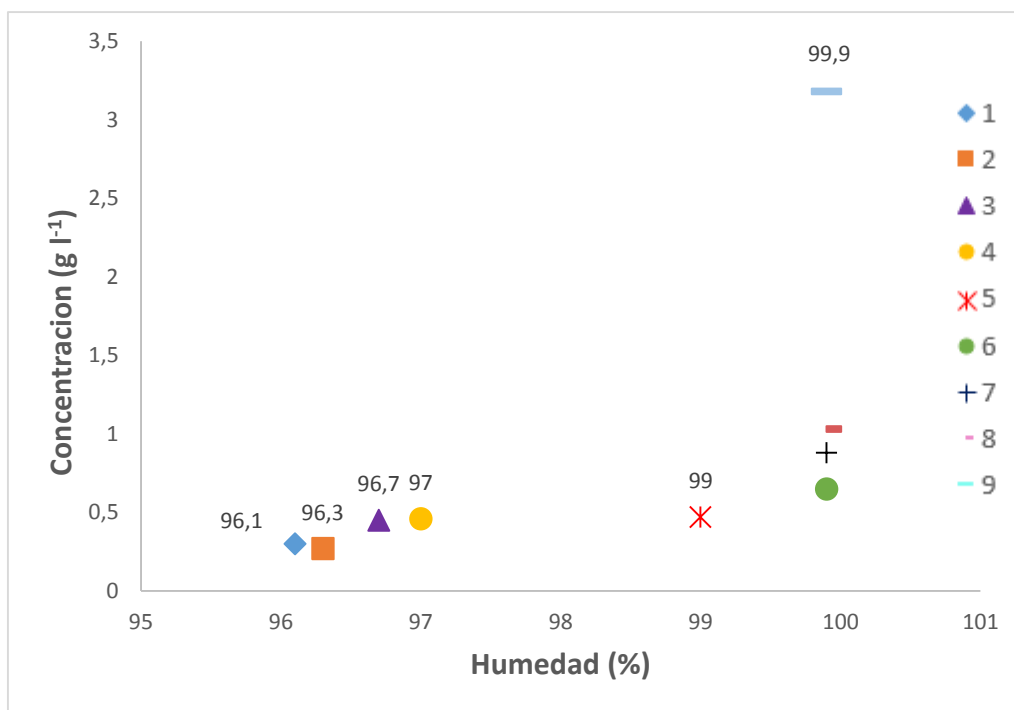
**Figura 17. Concentración final de propionato de calcio vs. temperatura del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la temperatura circundante registrada por López (2018).



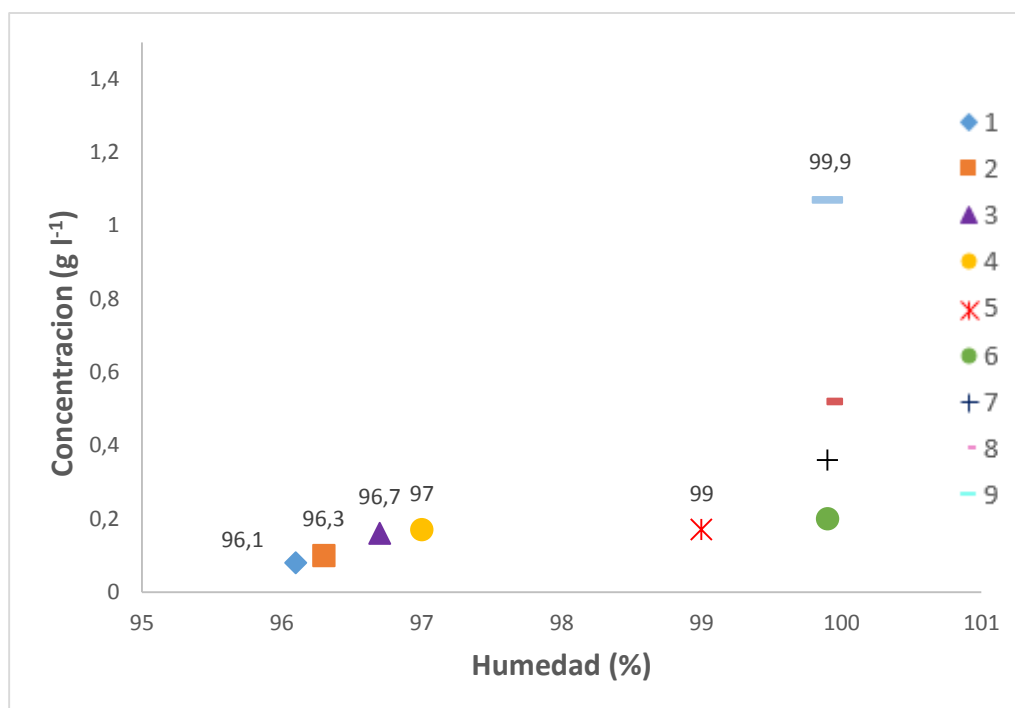
**Figura 18. Concentración final de acetato de sodio Vs temperatura del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la temperatura circundante registrada por López (2018).



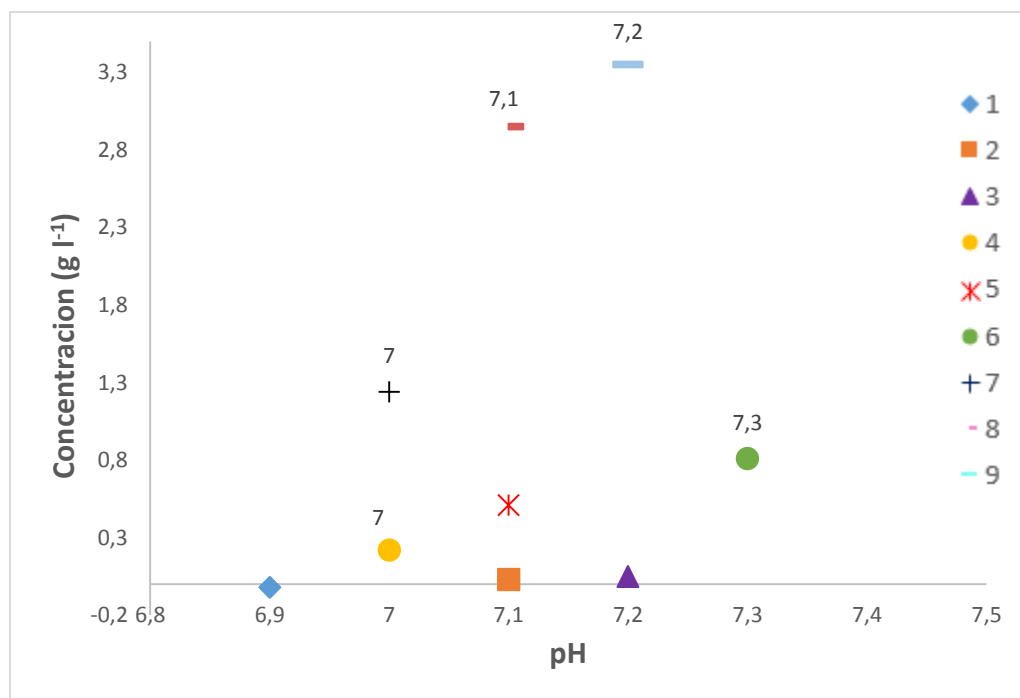
**Figura 19. Concentración final de glucosa vs. humedad del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la humedad circundante registrada por López (2018).



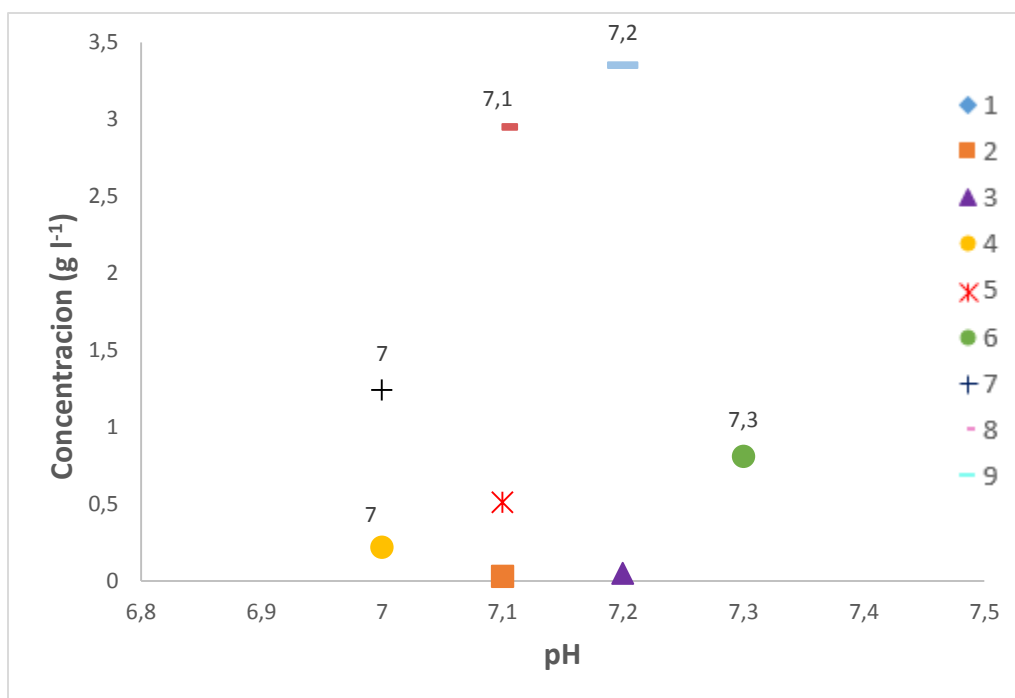
**Figura 20. Concentración final de propionato de calcio vs. humedad del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la humedad circundante registrada por López (2018).



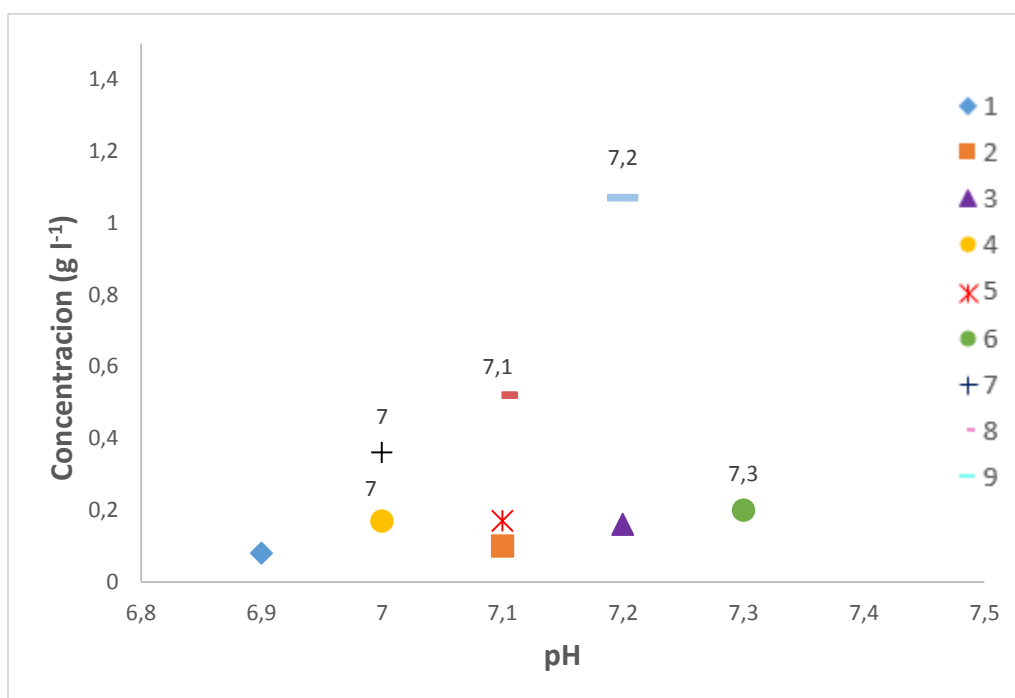
**Figura 21. Concentración final de acetato de sodio vs. humedad del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la humedad circundante registrada por López (2018).



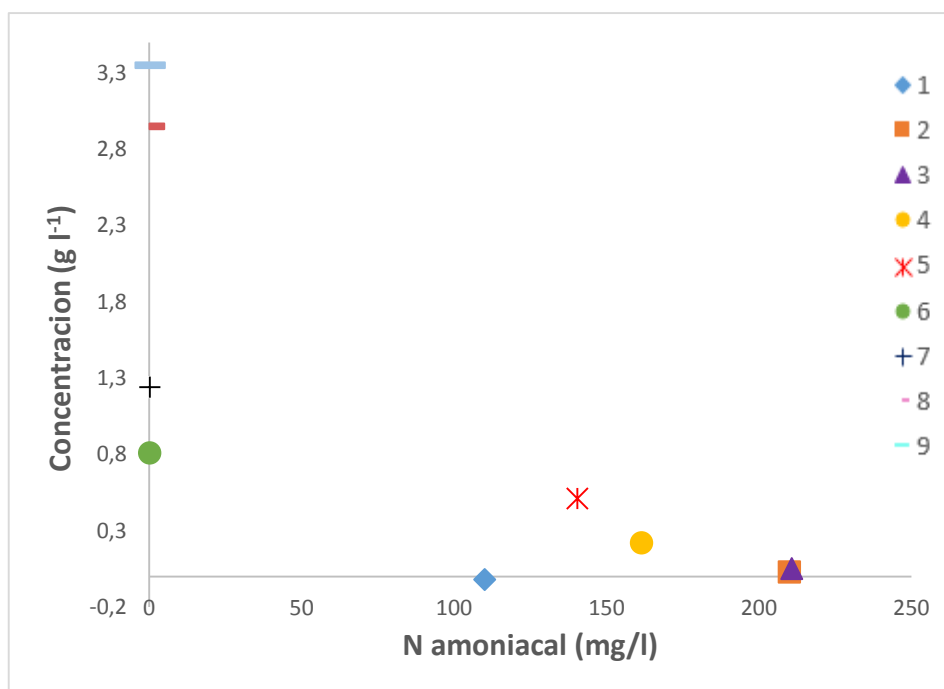
**Figura 22. Concentración final de glucosa vs. pH del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con el pH circundante registrado por López (2018).



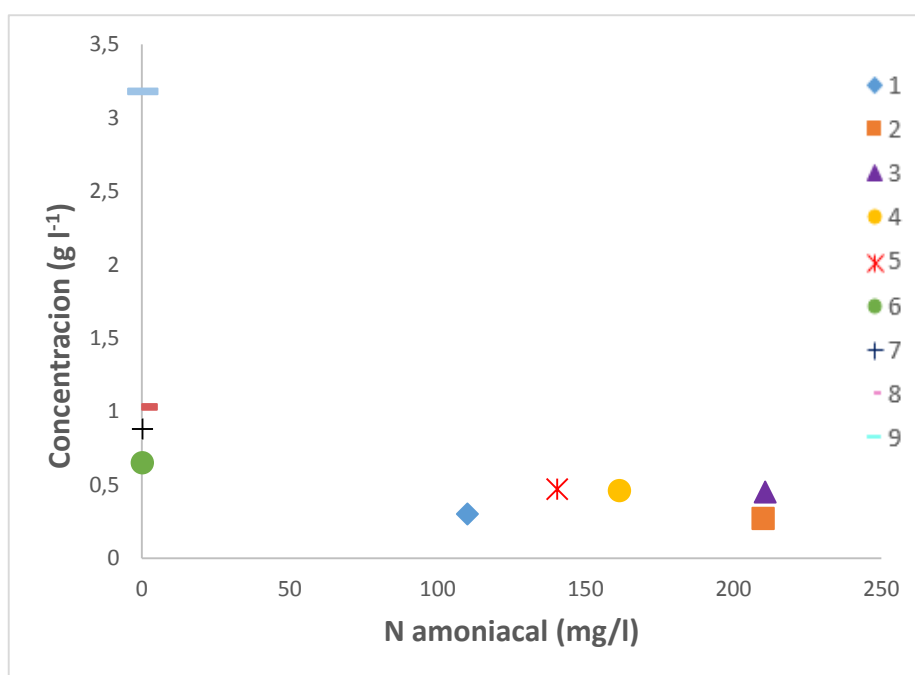
**Figura 23. Concentración final de propionato de calcio vs. pH del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con el pH circundante registrado por López (2018).



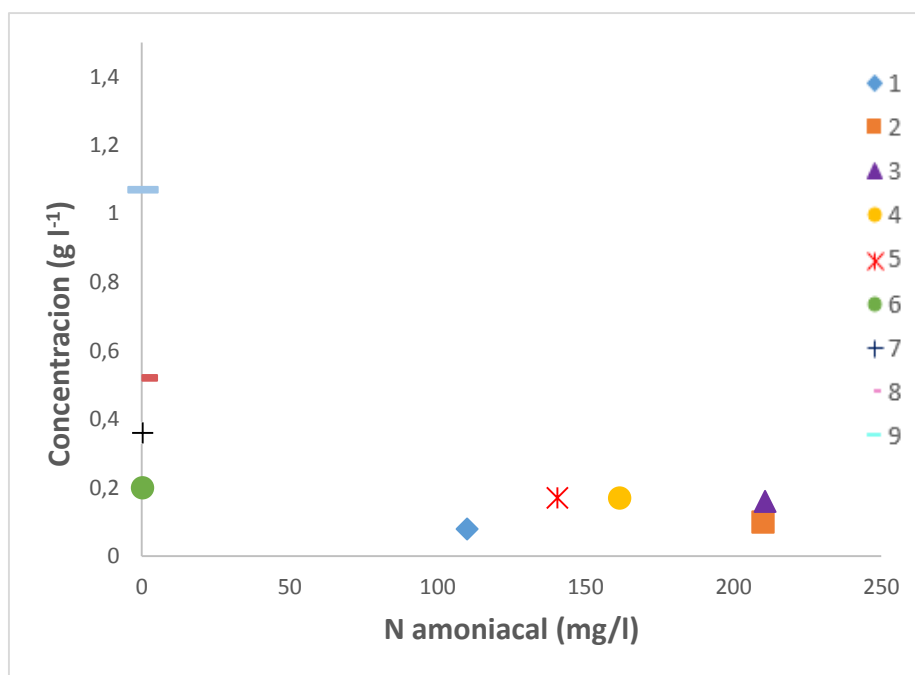
**Figura 24. Concentración final de acetato de sodio vs. pH del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con el pH circundante registrado por López (2018).



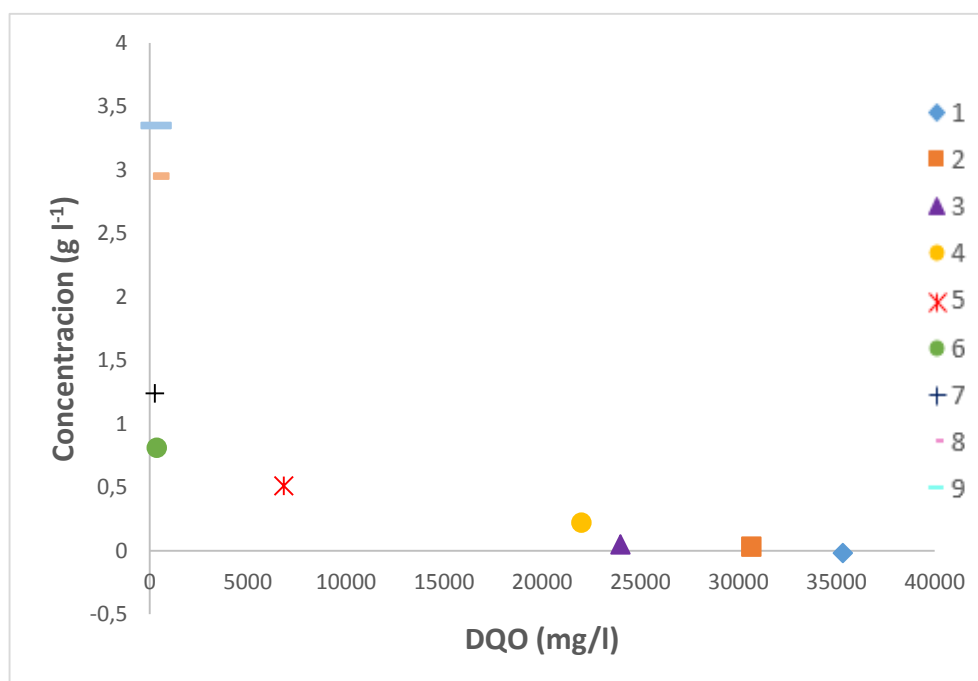
**Figura 25. Concentración final de glucosa vs. nitrógeno amoniacal del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de nitrógeno amoniacal circundante registrada por López (2018).



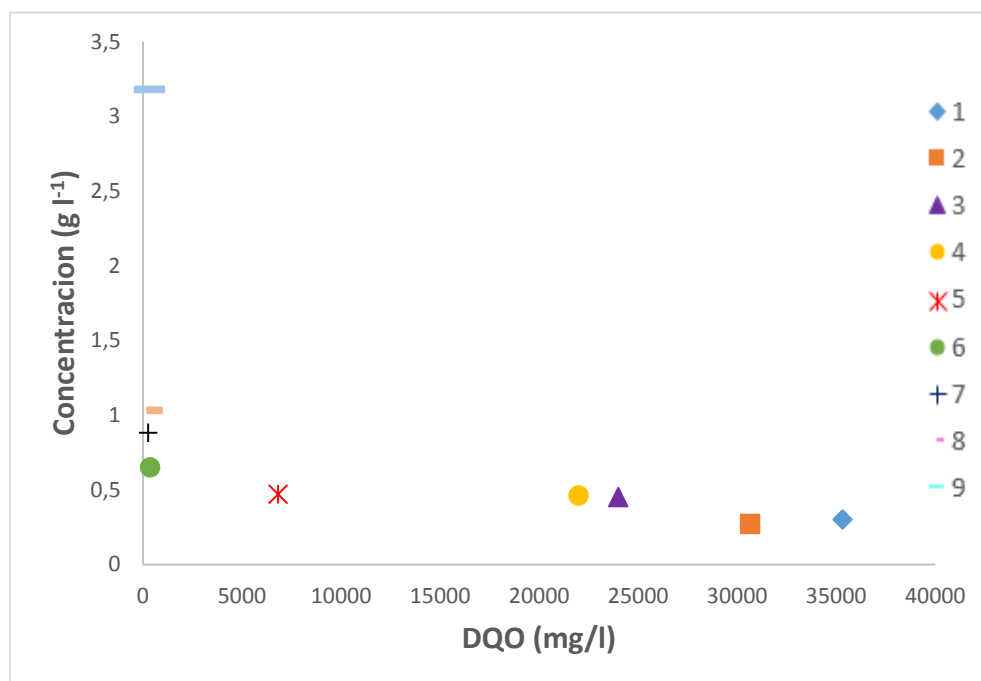
**Figura 26. Concentración final de propionato de calcio vs. nitrógeno amoniacal del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de nitrógeno amoniacal circundante registrada por López (2018).



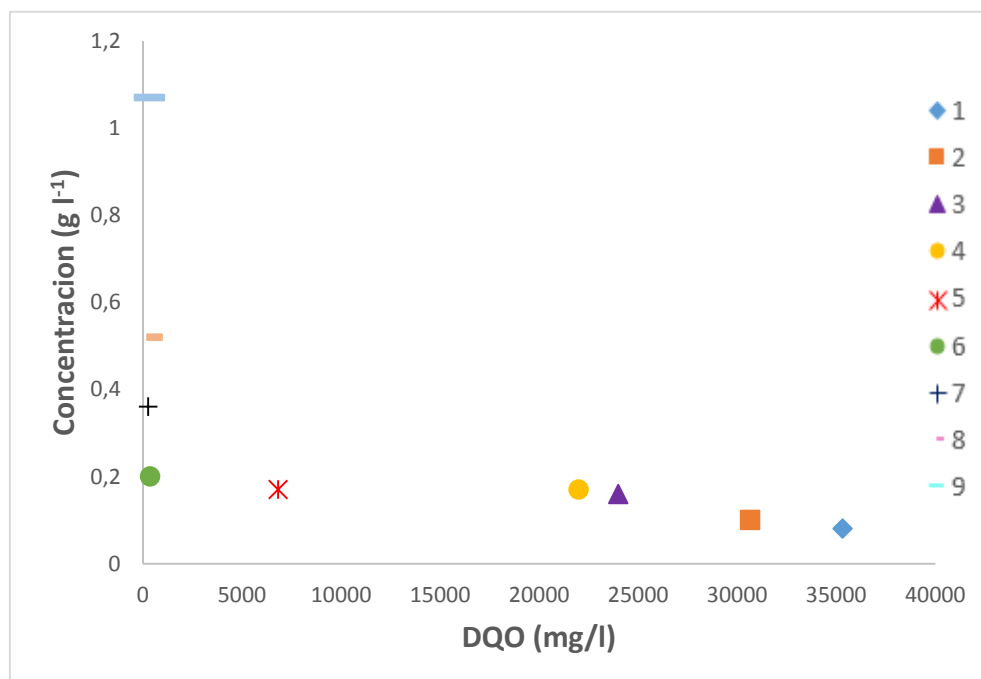
**Figura 27. Concentración final de acetato de sodio vs. nitrógeno amoniacal del estrato de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de nitrógeno amoniacal circundante registrada por López (2018).



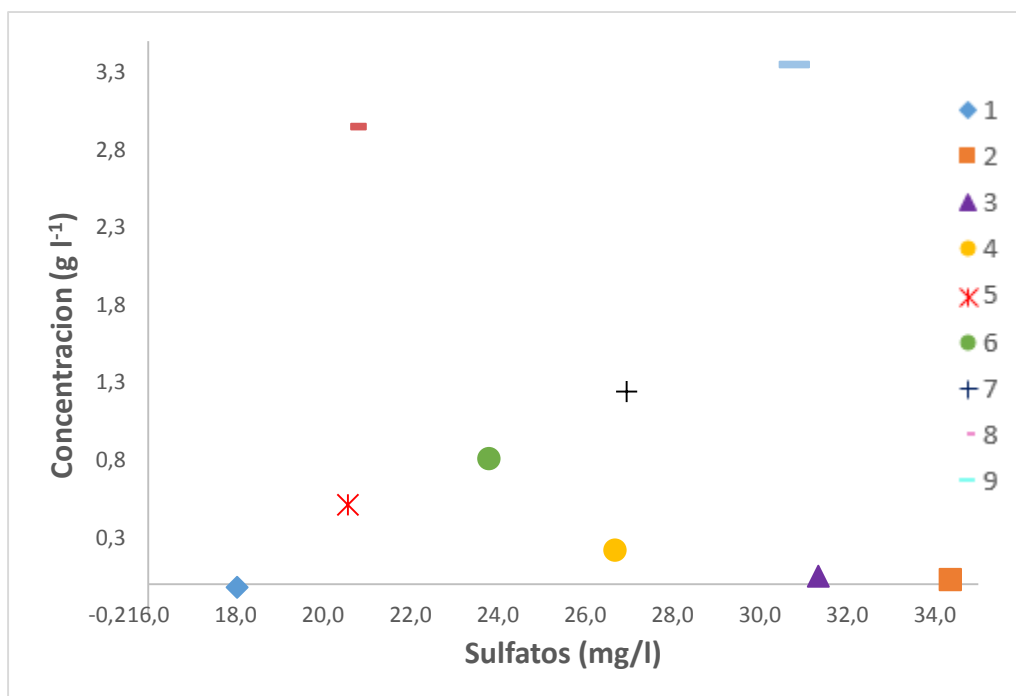
**Figura 28. Concentración final de glucosa vs. DQO de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la demanda química de oxígeno circundante registrada por López (2018).



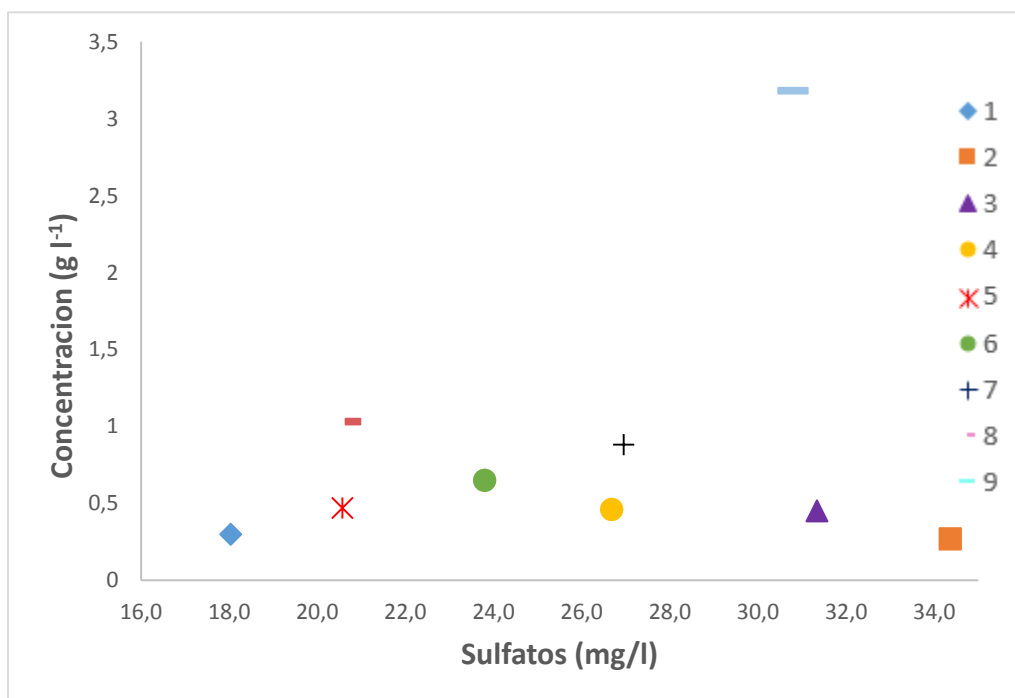
**Figura 29. Concentración final de propionato de calcio vs. DQO de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la demanda química de oxígeno circundante registrada por López (2018).



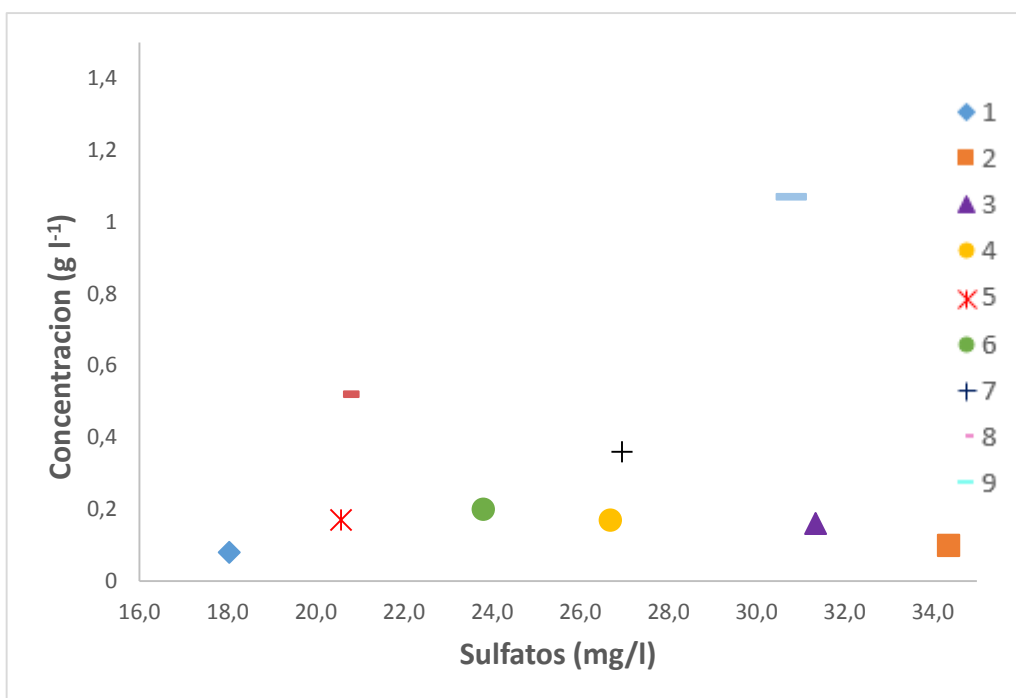
**Figura 30. Concentración final de acetato de sodio vs. DQO de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la demanda química de oxígeno circundante registrada por López (2018).



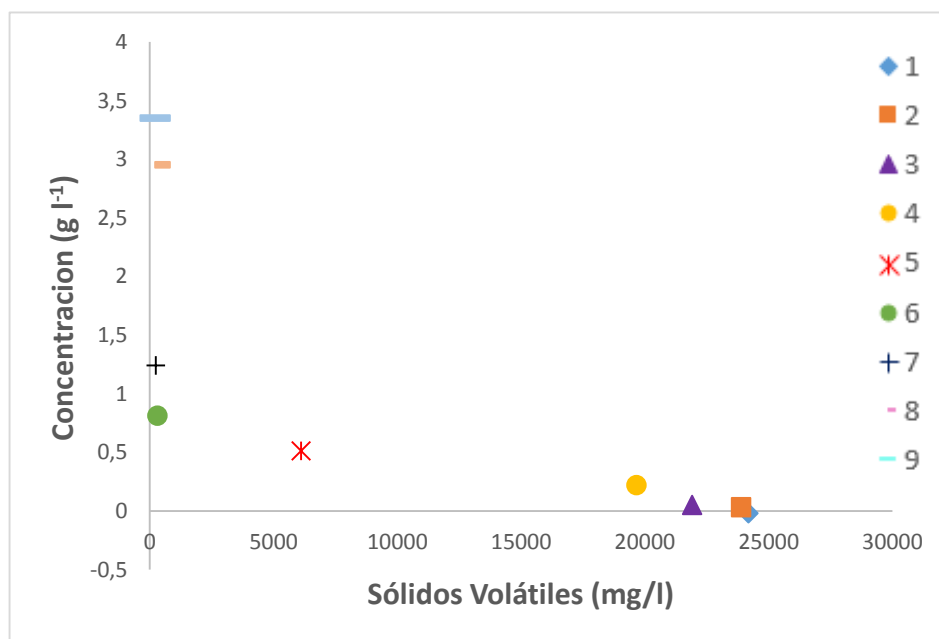
**Figura 31. Concentración final de glucosa vs. sulfatos de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sulfatos circundante registrada por López (2018).



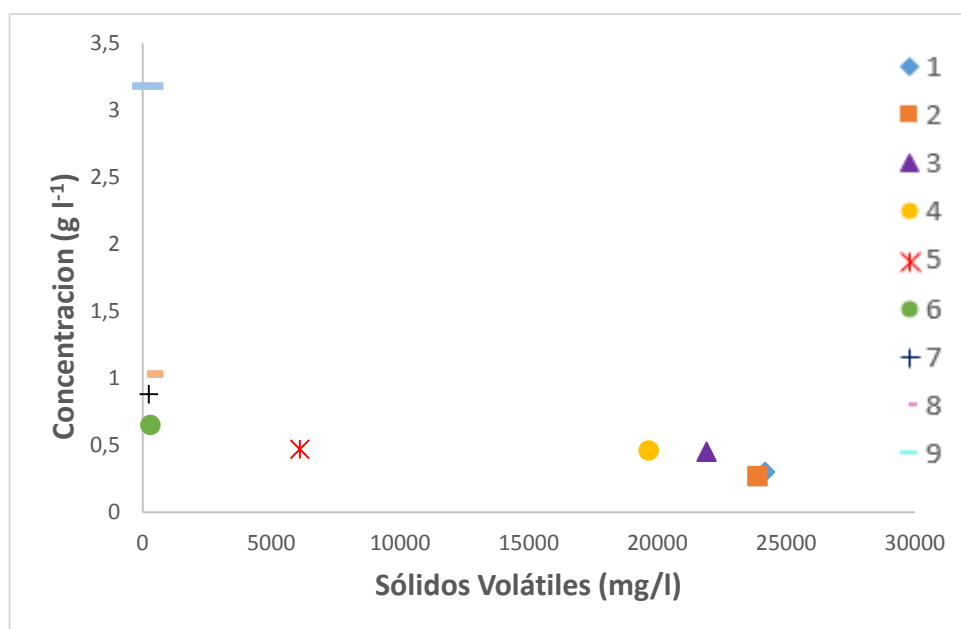
**Figura 32. Concentración final de propionato de calcio vs. sulfatos de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sulfatos circundante registrada por López (2018).



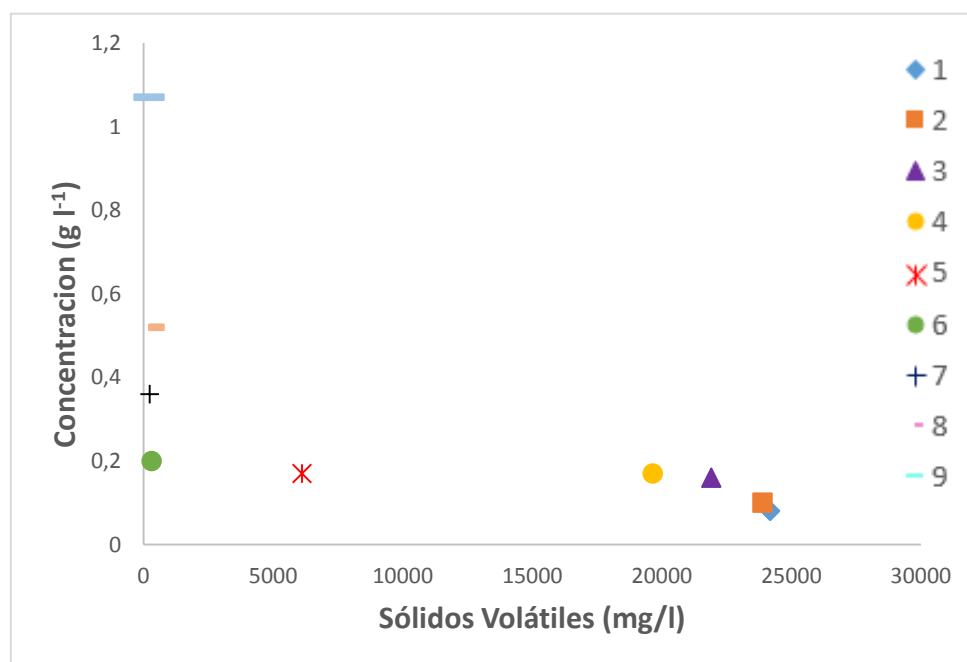
**Figura 33. Concentración final de acetato de sodio vs. sulfatos de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sulfatos circundante registrada por López (2018).



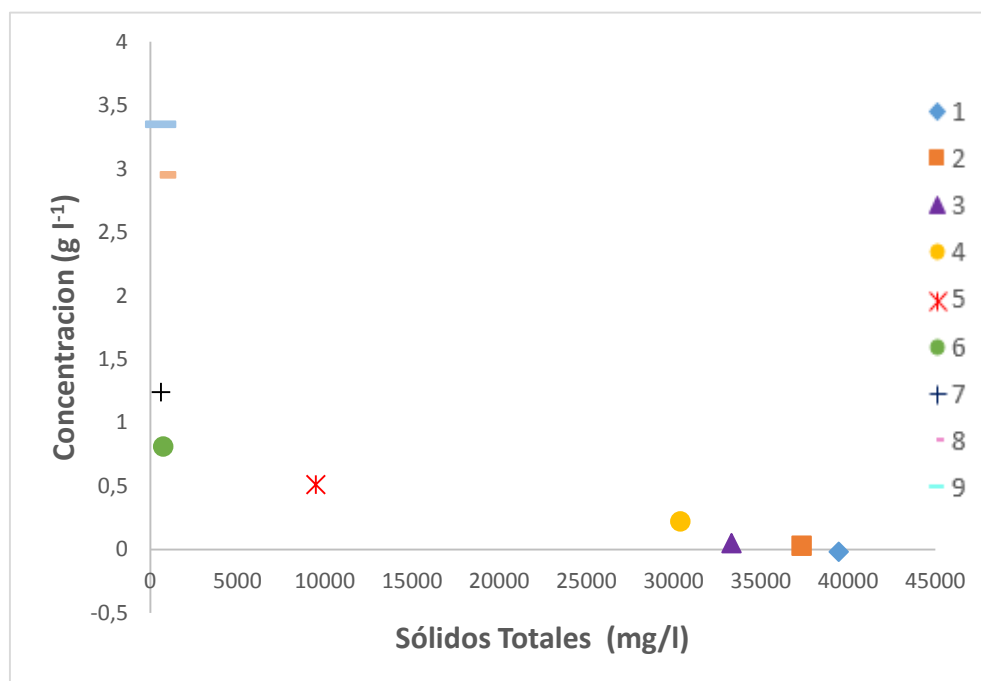
**Figura 34. Concentración final de glucosa vs. sólidos volátiles de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sólidos volátiles circundante registrada por López (2018).



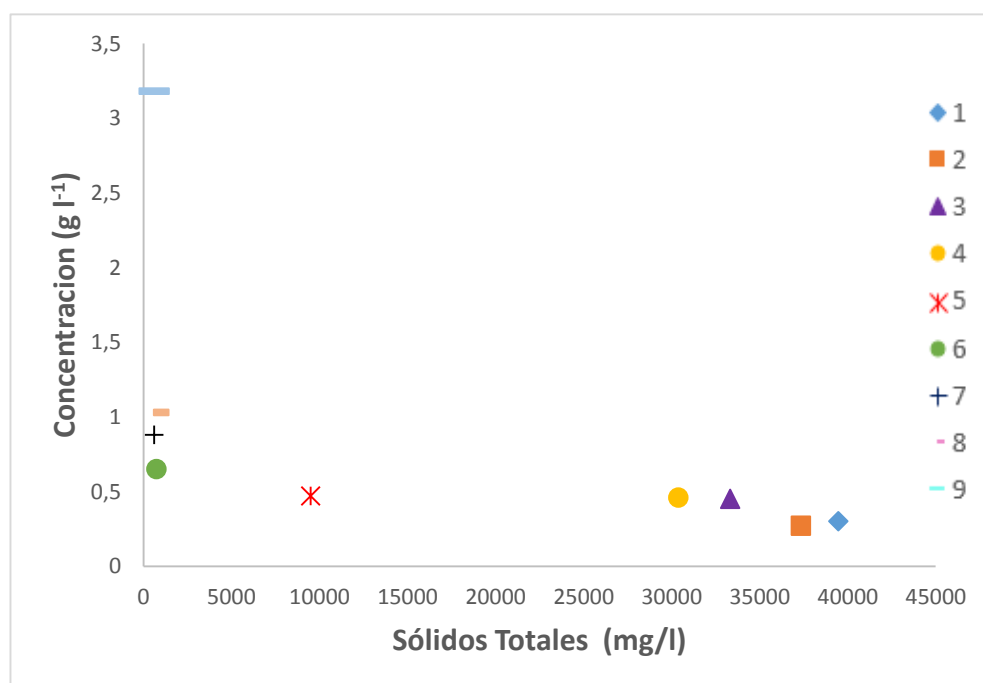
**Figura 35. Concentración final de propionato de calcio vs. sólidos volátiles de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sólidos volátiles circundante registrada por López (2018).



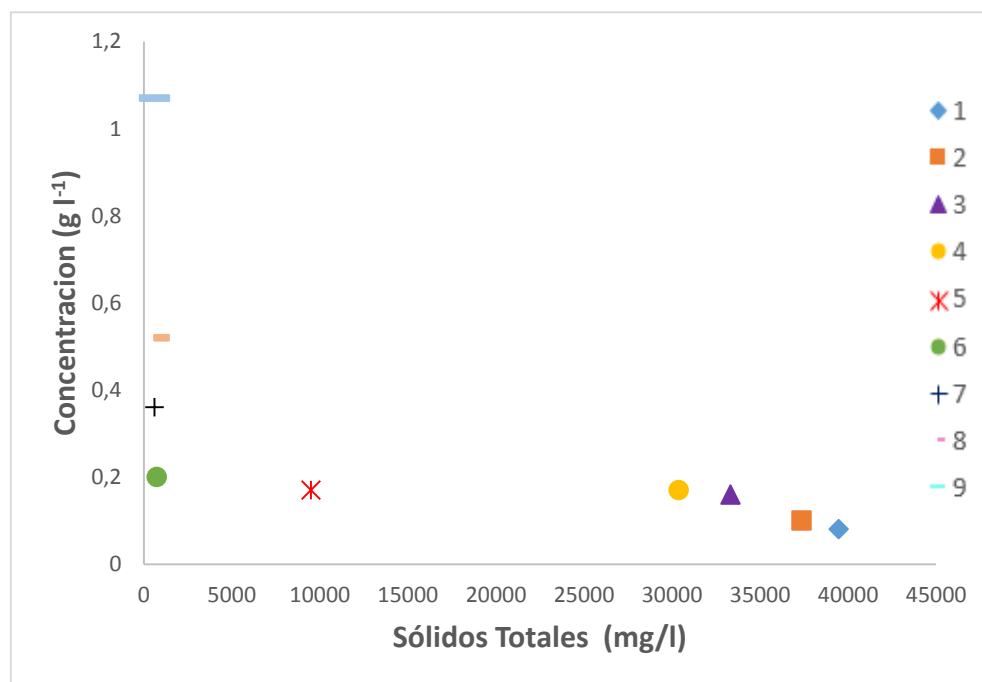
**Figura 36. Concentración final de acetato de sodio vs. sólidos volátiles de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sólidos volátiles circundante registrada por López (2018).



**Figura 37. Concentración final de glucosa vs. sólidos totales de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de glucosa a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sólidos totales circundante registrada por López (2018).



**Figura 38. Concentración final de propionato de calcio vs. sólidos totales de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de propionato de calcio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sólidos totales circundante registrada por López (2018).



**Figura 39. Concentración final de acetato de sodio vs. sólidos totales de la cisterna:** Comparación de la concentración final en g l<sup>-1</sup> de acetato de sodio a lo largo del gradiente de profundidad contrastado con la concentración de sólidos totales circundante registrada por López (2018).

## 10. TABLAS

**Tabla 1. Velocidad máxima de consumo por estrato y sustrato evaluado.** Se muestran el promedio y la desviación estándar de las tres réplicas analizadas por estrato.

Sustrato	Estrato	Profundidad (cm)	Promedio velocidad máxima de consumo ( $\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	Desviación ( $\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
Glucosa	1	120-135	-2,84	0,06
	2	105-120	-2,84	0,01
	3	90-105	-1,36	0,01
	4	75-90	-1,63	0,01
	5	60-75	-1,99	0,01
	6	45-60	-1,51	0,33
	7	30-45	-1,03	0,00
	8	15-30	-0,64	0,00
	9	0-15	-0,71	0,00
Propionato	1	120-135	-1,99	0,11
	2	105-120	-2,08	0,07
	3	90-105	-1,45	0,01
	4	75-90	-2,04	0,00
	5	60-75	-2,71	0,01
	6	45-60	-2,71	0,01
	7	30-45	-1,51	0,00
	8	15-30	-1,30	0,01
	9	0-15	-0,46	0,00
Acetato	1	120-135	-1,19	0,03
	2	105-120	-1,12	0,20
	3	90-105	-1,21	0,00
	4	75-90	-1,08	0,00
	5	60-75	-1,45	0,00
	6	45-60	-1,16	0,01
	7	30-45	-1,35	0,01
	8	15-30	-0,45	0,00
	9	0-15	-0,58	0,01

**Tabla 2. Actividad específica evaluada por estrato y sustrato evaluado.** Se muestran el promedio y la desviación estándar de las tres réplicas analizadas por estrato.

Actividad metabólica	Estrato	Profundidad (cm)	Actividad específica ( $\text{g}_{\text{sustrato}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Desviación ( $\text{g}_{\text{sustrato}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
Hidrólisis	1	120-135	1,42	0,03
	2	105-120	1,42	0,01
	3	90-105	0,68	0,00
	4	75-90	0,81	0,01
	5	60-75	0,99	0,01
	6	45-60	0,75	0,18
	7	30-45	0,51	0,00
	8	15-30	0,32	0,00
	9	0-15	0,35	0,00
Acetogénesis	1	120-135	0,99	0,06
	2	105-120	1,04	0,03
	3	90-105	0,73	0,00
	4	75-90	1,02	0,00
	5	60-75	1,35	0,01
	6	45-60	1,36	0,01
	7	30-45	0,91	0,06
	8	15-30	0,65	0,00
	9	0-15	0,23	0,00
Metanogénesis	1	120-135	0,60	0,02
	2	105-120	0,56	0,10
	3	90-105	0,61	0,00
	4	75-90	0,54	0,00
	5	60-75	0,73	0,00
	6	45-60	0,58	0,01
	7	30-45	0,68	0,00
	8	15-30	0,22	0,01
	9	0-15	0,29	0,00

**Tabla 3. Parámetros físico-químicos de los diferentes estratos de la cisterna de camal de Pacto medidos por López (2018) en base a metodologías estándar.** Se muestran el promedio y la desviación estándar de las tres réplicas analizadas por estrato.

ESTRATO	Temperatura (°C)		Humedad %		Sólidos totales (mg/l)		Sólidos volátiles (mg/l)	
	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación
1	23,3	0,12	96,1	0,12	39479,8	1,12	24186,2	1,12
2	23,5	0,15	96,3	0,25	37358,0	1,25	23897,6	1,25
3	23,5	1,22	96,7	1,37	33336,2	1,3	21921,9	1,3
4	23,3	1,01	97,0	1,17	30395,8	1,22	19663,5	1,22
5	23,0	1,01	99,0	1,25	9506,2	0,32	6119,0	0,32
6	23,0	0,6	99,9	0,9	745,5	0,99	313,3	0,99
7	23,6	0,59	99,9	2,59	616,8	2,11	242,3	2,11
8	23,3	0,84	99,9	1,84	596,5	0,84	216,4	0,84
9	23,3	0,27	99,9	0,45	605,8	0,6	214,7	0,6

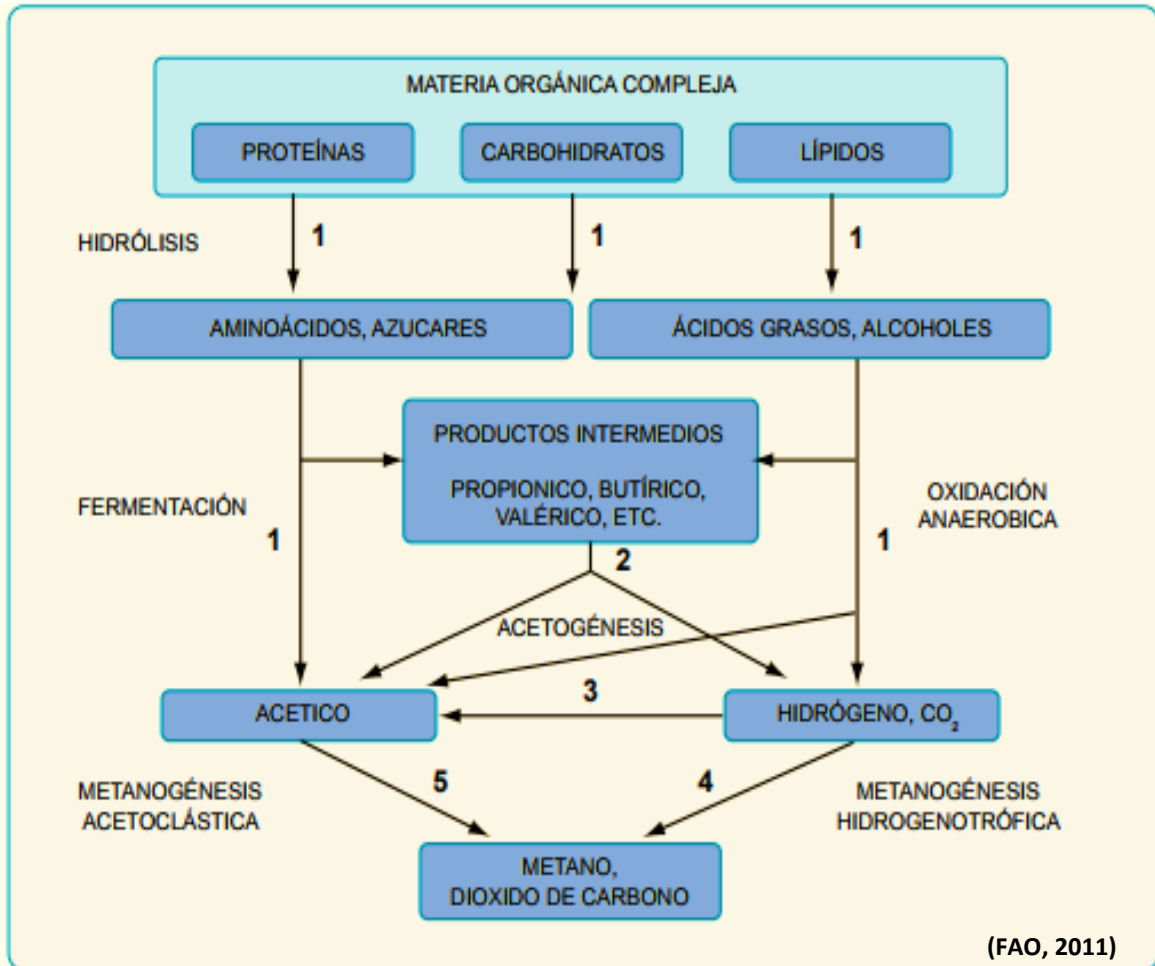
  

ESTRATO	Sulfatos (mg/l)		DQO (mg/l)		pH		Nitrógeno amoniacal (mg/l)	
	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación
1	18,0	1,45	35333,3	0,89	6,9	0,9	110	0,42
2	34,4	1,27	30666,7	0,45	7,1	0,53	210	0,36
3	31,3	1,39	24000,0	2,12	7,2	1,65	210,8	0,84
4	26,7	0,72	22000,0	0,26	7,0	0,77	161,5	1,3
5	20,6	0,87	6833,3	1,96	7,1	1,98	140,5	0,67
6	23,8	0,43	370,0	1,23	7,3	1,5	0,2	1,21
7	27,0	1,1	273,3	0,67	7,0	0,77	0,3	1,08
8	20,6	0,32	216,7	0,44	7,1	0,42	0,2	1,04
9	30,8	0,65	330,0	0,72	7,2	0,88	0,4	0,62

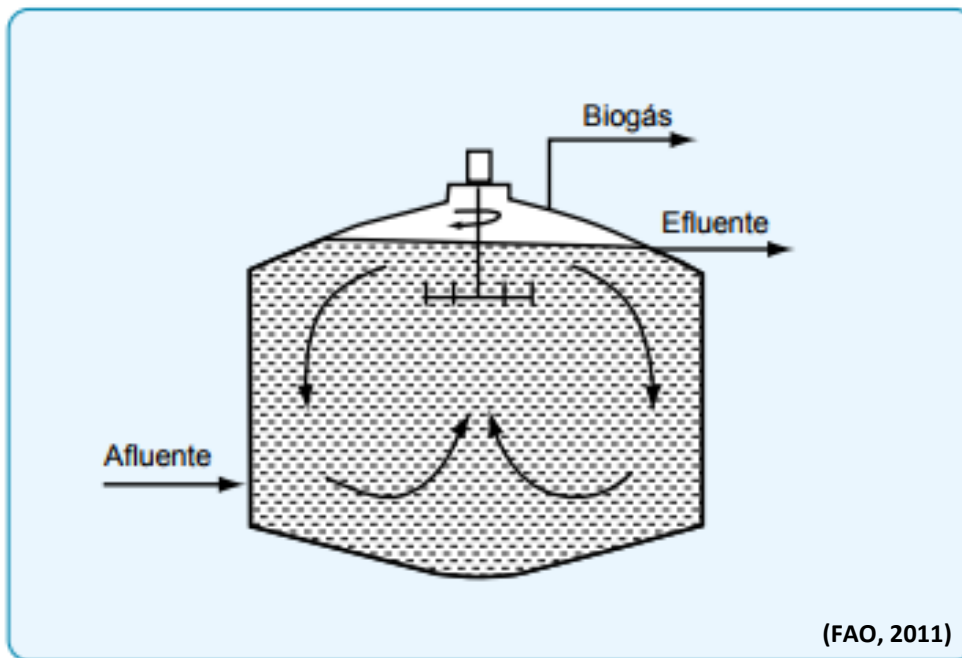
Temperatura, método EPA-105.1; humedad, método ME 740-78; sólidos totales, método EPA-1684; sólidos volátiles, método EPA-1684; sulfatos, método EPA-375.3; DQO, método EPA-410; pH, método EPA-150.1; nitrógeno amoniacal, método colorimétrico 10031-HACH, método 1684 US-EPA.

## 12.ANEXOS

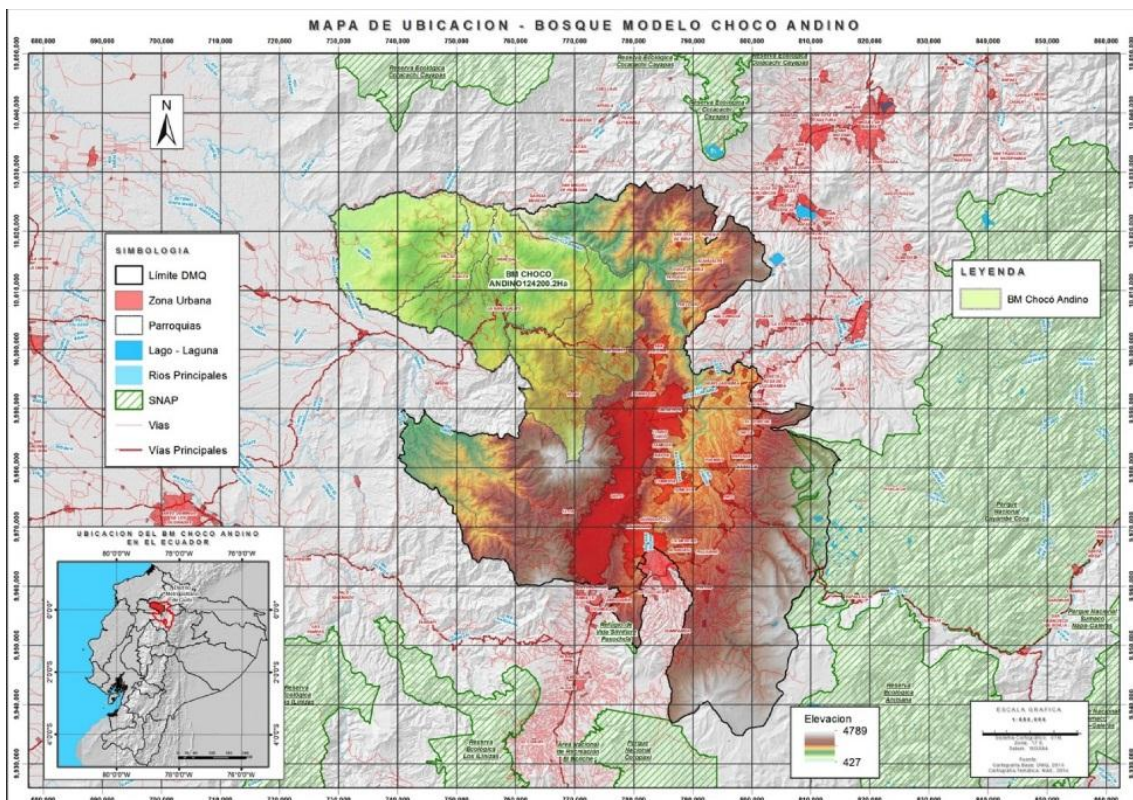
## ANEXO 1. Esquema de la ruta metabólica fermentativa de la metanogénesis.



**ANEXO 2. Biodigestor: dispositivo donde se lleva a cabo la digestión anaerobia.**



**ANEXO 3. Mapa de la ubicación de la Mancomunidad del Chocó Andino.**



(RIABM, 2016)