

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LODOS ANAEROBIOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

Sludge Anaerobic Microbiologic Characterization Used in the Organic Fraction of Urban Solid Waste Treatment

RESUMEN

Esta investigación presenta los resultados obtenidos de la caracterización microbiológica de un reactor anaerobio en dos fases para el tratamiento de la Fracción Orgánica de los Residuos sólidos Urbanos (FORSU) mediante recuentos por sensibilidad al oxígeno y grupos metabólicos por la técnica del Número Más Probable (NMP). Se encontró un predominio de la población fermentativa ($10^5 - 10^6$ NMP ml^{-1}), seguida por la acetogénica (10^5 NMP ml^{-1}) y la sulfatorreductora ($10^4 - 10^5$ NMP ml^{-1}) en el reactor acidogénico. No se detectó competencia entre la población sulfatorreductora ($10^4 - 10^5$ NMP ml^{-1}) y la metanogénica (10^5 NMP ml^{-1}) en el reactor metanogénico. Se observaron principalmente los géneros, *Methanotrix sp*, *Methanosarcina sp*, *Methanococcus sp* y *Methanobacterium sp*.

PALABRAS CLAVES: Digestión anaerobia, grupos metabólicos, Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos, Número Más Probable.

ABSTRACT

*The microbiological characterization of two phases anaerobe reactor of Urban Solid Waste Organic Fraction (USWOF) treatment by oxygen sensibility counts and metabolics groups by Most Probable Number (MPN) was made. The fermentatives population ($10^5 - 10^6$ MPN ml^{-1}), followed for acetogenic (10^5 MPN ml^{-1}) and sulphate reducing ($10^4 - 10^5$ MPN ml^{-1}) in the acidogenic reactor were found. In the methanogenic reactor, competition between sulphate reducing ($10^4 - 10^5$ MPN ml^{-1}) and methanogenic (10^5 MPN ml^{-1}) populations was not detected. The *Methanotrix sp*, *Methanosarcina sp*, *Methanococcus sp* y *Methanobacterium sp*. sorts were found.*

PALABRAS CLAVES: Digestión anaerobia, grupos metabólicos, Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos, Número Más Probable.

KEYWORDS: Anaerobic digestion, metabolic groups, Urban Solid Waste Organic Fraction (USWOF), Most Probable Number (MPN).

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico e industrial y la elevada densidad poblacional generada al final del siglo XX, han ocasionado considerables volúmenes de residuos sólidos urbanos (RSU) a nivel nacional e internacional, constituyendo uno de los principales problemas ambientales de la sociedad contemporánea, además de contribuir en la generación de focos de infección que perjudican la salud humana como consecuencia de la falta de control, de alternativas de tratamiento y la ausencia de leyes reguladoras [23]. En América Latina la producción de RSU asciende a 118 millones de toneladas

al año y en Colombia sobrepasa las 29000 toneladas diarias, de las cuales el 45% son depositadas en los rellenos sanitarios [24].

Investigaciones realizadas en América Latina para tratar estos residuos, utilizando métodos físico-químicos, químicos y biológicos han demostrado que estos últimos son los más adecuados, siendo el de mayor perspectiva la digestión anaerobia. La aplicación de esta tecnología es considerada una de las más eficientes para el tratamiento de los RSU, debido a que en la mayoría de los países latinoamericanos el contenido de Fracción Orgánica (FO) representa entre un 40 - 75%. [1, 6, 8]. En Colombia y

CLAUDIA JOHANNA SANDOVAL

Bióloga – UIS
Investigadora
Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM),
UIS.ceiam@uis.edu.co Tel./fax: +57 76 459919.
cjoanna01@yahoo.es

MARIELA CARREÑO DE

Bacterióloga, M.Sc. Microbiología Industrial
Profesor Asociado
mcarreno@uis.edu.co

EDGAR FERNANDO CASTILLO

Ingeniero Químico, Ph.D.
Profesor Titular
efcastil@uis.edu.co

MARISOL VERGARA MENDOZA

Ingeniera Química M. Sc.
Investigadora
marisolvergara14@yahoo.es

específicamente en la ciudad de Bucaramanga el contenido de la FO de los RSU se encuentra alrededor del 63% con un porcentaje de humedad del 80% [10].

El proceso de digestión anaerobia consiste en la transformación de la materia orgánica a través de una serie de reacciones bioquímicas, en un biogás con un alto contenido de metano (CH_4), que puede ser aprovechado como fuente de energía y un efluente sólido, con excelentes características para ser utilizado como fertilizante para el suelo. Durante la primera etapa, participan las bacterias hidrolíticas, encargadas de romper los polímeros orgánicos (polisacáridos, proteínas, y lípidos) para convertirlos a monómeros tales como; los ácidos grasos volátiles de cadena larga, los alcoholes, el H_2 y CO_2 ; posteriormente intervienen las bacterias fermentativas o acidogénicas que transforman los productos formados durante la hidrólisis en ácido acético y compuestos intermedios como el etanol, el ácido láctico, el ácido propiónico, el ácido fórmico y el ácido butírico, además de H_2 y CO_2 . Estos productos son convertidos en acetato, H_2 y CO_2 por las bacterias acetogénicas. Finalmente, el CH_4 es producido por las bacterias metanogénicas a partir del acetato, el H_2 y el CO_2 [7, 12, 17, 19].

Varios tipos de procesos anaerobios han sido desarrollados para el tratamiento de efluentes con altas cargas orgánicas, incluyendo los sistemas en batch y los sistemas continuos en una fase y dos fases. La digestión anaerobia en dos fases ofrece ventajas significativas sobre los procesos convencionales de una sola fase, especialmente la forma en que los microorganismos son retenidos en el reactor, generando la posibilidad de establecer condiciones operacionales que disminuyan los tiempos de arranque del sistema y la especialización de la microbiota en cada reactor, permitiendo la obtención de una mayor cantidad de productos deseados en cada etapa del proceso [7, 8, 9, 11, 28, 29]. La estabilidad y eficiencia de los reactores anaerobios es usualmente determinada a través de algunos parámetros fisicoquímicos como los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), la concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's), la alcalinidad, el pH y la cantidad y la composición del biogás producido. Sin embargo, son pocos los estudios que reportan la composición microbiana y el equilibrio dinámico existente entre las distintas poblaciones involucradas en el proceso. [16, 18, 20, 21, 22, 27].

La caracterización de las diferentes poblaciones microbianas que participan en el proceso de digestión anaerobia de la FORSU en un reactor anaerobio en dos fases es el centro de atención del presente trabajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactores

Un sistema de digestión anaerobia en dos fases empleando dos reactores a escala de laboratorio; un

reactor acidogénico (R1) y un reactor metanogénico (R3) construidos en acero inoxidable, con capacidad de 30 L y un volumen útil de 24 L, además de control automático de agitación y temperatura. La temperatura y el pH de R1 fueron mantenidos entre las 5.0 – 6.5 unidades y los $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente. R3 fue operado a $38^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y un pH entre 7.5 – 8.0 unidades. El arranque de los reactores se realizó empleando las proporciones de lodo, sustrato y agua planteadas por [17], a temperaturas controladas y operadas durante 100 días.

2.2. Inóculo

El reactor fue inoculado bajo condiciones anaerobias con una mezcla 1:1 (v/v) de lodos procedentes de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) Río Frío, localizada en el municipio de Girón, Santander y de un digester anaerobio para el tratamiento de los residuos porcícolas ubicado en la finca Gavassa de la mesa de los Santos, Santander [9].

2.3. Sustrato

Se utilizó la FORSU como sustrato durante el arranque del R1 y el efluente del mismo como sustrato para el R3. Estos residuos fueron colectados en la plaza de mercado del barrio San Francisco ubicada en Bucaramanga. Posterior a su recolección fueron sometidos a un proceso de trituración para proporcionar un tamaño de partícula (4 – 6 mm). Las características fisicoquímicas de este sustrato son reportadas por [9].

2.4. Métodos analíticos

Durante la operación del reactor anaerobio en dos fases la temperatura, el pH, la concentración de AGV's, la alcalinidad y la producción de biogás fueron monitoreados diariamente. Los AGV's fueron determinados según el procedimiento descrito en [3]. El contenido de CH_4 y el CO_2 en el biogás fueron medidos por un analizador de gases Bacharach modelo GA-94.

2.5. Preparación de las muestras

Las muestras fueron tomadas por duplicado en recipientes estériles con un volumen de 1000 ml. Posteriormente se burbujearon con N_2 y CO_2 en una proporción 80:20 y se almacenaron bajo refrigeración a 4°C hasta ser procesadas. Todos los procedimientos descritos fueron hechas usando los medios descritos en [5], en la cámara de anaerobiosis bajo atmósfera controlada de N_2 y CO_2 (80% - 20%). Los viales utilizados se sellaron con tapones de caucho de butilo y agrafes de aluminio, lo cual permito el uso de jeringas estériles con aguja hipodérmica para agregar soluciones o inocular [12].

2.6. Recuento por sensibilidad al oxígeno

Las poblaciones fueron cuantificadas empleando la técnica de recuento estándar en placa por siembra profunda. Se incubaron a 35°C, en la siguiente forma: las Bacterias Aerobias y Anaerobias Facultativas (BAAF), bajo condiciones aerobias durante 48 horas; las Bacterias Anaerobias (BA), durante 8 días bajo atmósfera de anaerobiosis y los Mohos y Levaduras (ML), durante 8 días a temperatura ambiente. Los datos se reportaron en UFC ml⁻¹ [12].

2.7. Recuento por grupos metabólicos

Las poblaciones microbiales fueron estimadas por la técnica de NMP (n=3) usando los medios de cultivo descritos por [5], para los siguientes grupos: las Bacterias Fermentadoras de la Glucosa (BFG) y el Lactato (BFL); las Bacterias Acetogénicas del Propionato, el Formato y el Etanol (BAP, BAF, BAE); las Bacterias Sulfatorreductoras del Acetato (BSRA), el Lactato (BSRL) y el Etanol (BSRE); las Bacterias Metanogénicas del Acetato, el Formato, y el Metanol (BMA, BMF, BMM). Se incubaron a 35°C durante el tiempo necesario dependiendo del grupo metabólico [12]. El número de tubos positivos en las diferentes diluciones fue usado para obtener el NMP según la tabla de probabilidades reportada en el Standard Methods [4].

2.8. Aislamiento e identificación de bacterias metanogénicas

La siembra se realizó por duplicado en la cámara de anaerobiosis con una atmósfera de N₂ y CO₂ (80: 20) a partir de cultivos de enriquecimiento tomados del R3, empleando medios diferenciales publicados en la base de datos de la DSMZ [13]. Para la identificación de la población microbiana se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas de las colonias diferenciándolas según su morfología, características tintoriales y bioquímicas de acuerdo al manual de Bergey's [30].

3. RESULTADOS

3.1. Operación del reactor anaerobio en dos fases y análisis químicos

El R1 fue aclimatado con una solución de melaza al (10% p/v) referida al volumen de operación del reactor. A partir de los 30 días el R1 fue alimentado con la FORSU para una carga orgánica total (COT) de 1.8 Kg día⁻¹ con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 10 días, mientras el R3 fue alimentado con un flujo volumétrico de 1.6 L día⁻¹ del efluente de R1 con un TRH de 15 días. El porcentaje de biogás (CH₄ y CO₂) para el R1 y el R3 se presenta en la Figura. 1.

Durante la puesta en marcha del R1 el contenido de CH₄ hallado fue alrededor del 70%, sin embargo, este comienza a disminuir después del día 25 de operación.

Por otro lado, la cantidad de CO₂ se incrementó hasta alcanzar un valor máximo del 90% a los 40 días y a partir de los 50 días disminuyó gradualmente hasta obtener un porcentaje entre el 10% - 20%. En el R3 los porcentajes de CH₄ y CO₂ oscilaron entre el 30% y el 60% durante los primeros 60 días, no obstante, los niveles de CH₄ fueron relativamente superiores a los de CO₂ durante los últimos 40 días de operación. Para este reactor se obtuvo un valor máximo de CH₄ del 70% con un porcentaje de CO₂ del 25% en el día 68. La concentración de AGV's en el R1 se incrementó drásticamente durante todo el proceso de digestión anaerobia llegando a alcanzar valores alrededor de los 25000 mg L⁻¹ a los 95 días de operación y como una consecuencia de este comportamiento, la alcalinidad disminuyó hasta llegar a cero. La concentración de AGV's osciló entre los 14000 mg L⁻¹ y 25000 mg L⁻¹ durante los últimos 50 días. En el R3 la concentración de AGV's se presentó por debajo de los 4000 mg.L⁻¹ durante el tiempo de operación. Por otro lado, se observó una disminución de la alcalinidad durante todo el proceso, con una concentración máxima de 18000 mg L⁻¹ en el día 48 y una concentración final entre los 6000 mg L⁻¹ a los 7000 mg L⁻¹ (Figura. 2).

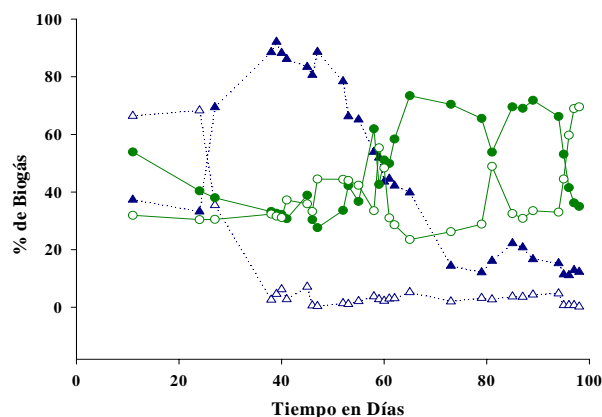


Figura. 1. Variación diaria de biogás para los reactores acidogénico (líneas punteadas azules) y metanogénico (líneas continuas verdes). (▲) % CO₂ R1, (△) % CH₄ R1, (●) % CH₄ R3, (○) % CO₂ R3.

3.2. Recuentos por sensibilidad al oxígeno

El R1 se caracterizó por presentar una proporción de BA alta, seguidas por las BAAF y ML. Sin embargo, este comportamiento no se presentó a los 90 días, en donde se observó una mayor cantidad de ML (4.2×10^7 UFC ml⁻¹) que de BAAF (1.6×10^7 UFC ml⁻¹). En el R3 predominó la población de BA excepto a los 30 días, en donde se encontraron en menor cantidad (7.5×10^6 UFC ml⁻¹). Los ML presentaron los valores más bajos, sin embargo, se detectó una mayor cantidad a los 30 días de operación. No se detectó el crecimiento de hongos filamentosos y la población dominante fueron las levaduras, quienes intervienen en procesos de fermentación con producción

de ácidos y poseen una alta afinidad por sustratos ricos en carbohidratos. Los conteos realizados para el inóculo presentaron una proporción de BAAF alta, seguidas por las BA y en menor cantidad los ML.

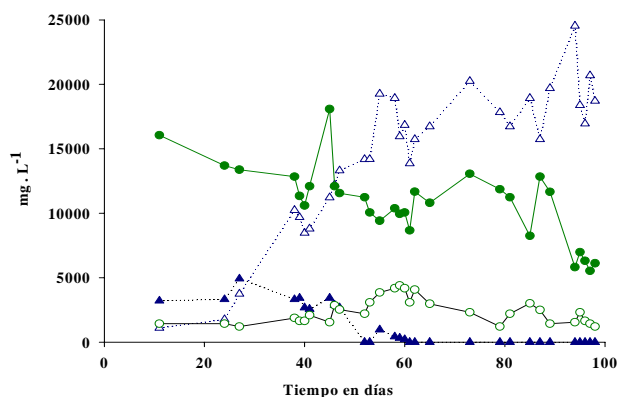


Figura 2. Variación diaria de la concentración de (AGV's) y la alcalinidad en los reactores acidogénico (líneas punteadas azules) y metanogénico (líneas continuas verdes). (▲) Alcalinidad R1, (△) AGV's R1, (●) alcalinidad R3, (○) AGV's R3.

3.3. Recuentos por grupos metabólicos

Con respecto al metabolismo bacteriano, las bacterias fermentadoras (BF) presentaron un incremento entre 10^4 NMP ml⁻¹ y 10^6 NMP ml⁻¹ en el R1, siendo las más abundantes las BFG que alcanzaron valores de 1.1×10^6 NMP ml⁻¹ a los 90 días de operación (Figura 3). Este grupo metabólico no fue determinado para el R3 ya que sus condiciones operacionales no son óptimas para el crecimiento de las BF. En el R1 se observó un incremento en la población de BSR por el orden de 10^4 NMP ml⁻¹ a 10^5 NMP ml⁻¹ alcanzando valores máximos de 2.4×10^5 NMP ml⁻¹ a los 90 días (Figura 3). En el R3, las BSRA y las BSRE aumentaron ($10^4 - 10^5$ NMP ml⁻¹), mientras las BSRL permanecieron constantes 7.4×10^4 NMP ml⁻¹ (Figura 4).

Para el caso de las bacterias acetogénicas (BA), se encontraron poblaciones por el orden de 10^5 NMP ml⁻¹ en el R1. Dentro de este grupo metabólico las bacterias más representativas fueron las BAP que alcanzaron valores de 4.6×10^5 NMP ml⁻¹ a los 60 días de operación, sin embargo, se observó una disminución de la población a los 90 días.

Las BAF presentaron valores constantes de 1.1×10^5 NMP ml⁻¹, mientras las BAE disminuyen en cantidad 1.1×10^5 NMP ml⁻¹ (Figura 3). En el R3 la población de BA presentó una disminución a los 60 días por el orden de 10^4 NMP ml⁻¹. En este reactor la población más abundante fueron las BAP, las cuales se encontraron por el orden de 8.0×10^5 NMP ml⁻¹ a los 90 días. Las bacterias metanogénicas obtuvieron valores por el orden

de 10^5 NMP ml⁻¹, sin embargo, se observó una disminución en la población metanogénica de los conteos realizados a los 90 días de operación. Las BMA comparadas con las BMF presentaron poblaciones similares en el R3, mientras los valores más bajos fueron reportados para las BMM (Figura 4).

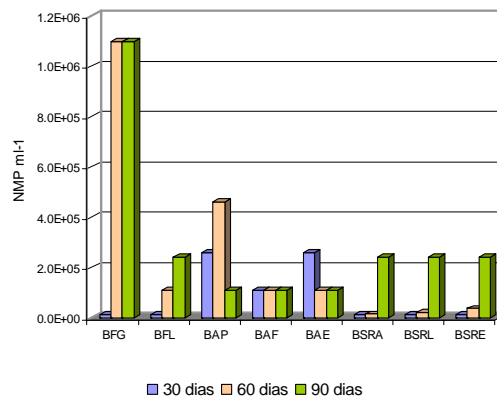


Figura 3. Grupos microbiales relacionados con el metabolismo bacteriano, para el reactor acidogénico, expresado en NMP ml⁻¹.

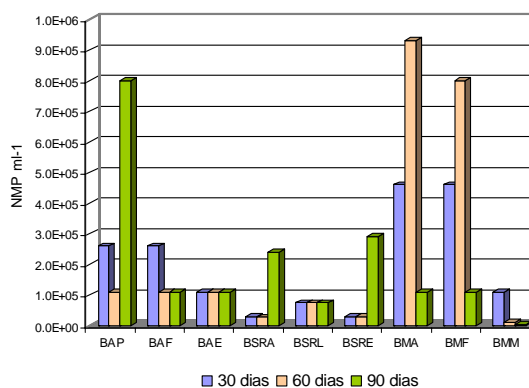


Figura 4. Grupos microbiales relacionados con el metabolismo bacteriano, para el reactor metanogénico, expresado en NMP ml⁻¹.

Como resultado de los procedimientos de aislamiento llevados a cabo para los lodos procedentes del R3, se observó la presencia de bacilos filamentosos, utilizadores de acetato, cuyas características morfológicas y bioquímicas correspondían al género *Methanotrix* sp. También se observó la presencia de cocos irregulares capaces de utilizar varios sustratos, incluyendo acetato y formato pertenecientes al género *Methanosarcina* sp. Así como representantes de la población metanogénica hidrogenofílica de los géneros *Methanococcus* sp y *Methanobacterium* sp.

4. DISCUSIÓN

La transformación eficiente de la FORSU en los reactores anaerobios requiere del esfuerzo coordinado de varios grupos metabólicos involucrados en la conversión

de la materia orgánica en un biogás formado principalmente por CH_4 y CO_2 .

El incremento prolongado en la concentración de los AGV's (25000 mg L^{-1}) en los lodos procedentes del R1, al igual que los niveles de CO_2 detectados durante el proceso de digestión anaerobia, pueden ser atribuidos a la presencia de una población balanceada de bacterias acidogénicas que transforman la FORSU (Figuras 1 y 2). La comparación de los recuentos obtenidos para los diferentes grupos metabólicos en el R1 mostró un predominio de la población fermentativa seguida por la acetogénica y la sulfatorreductora, sin embargo, la población de BSR presentó valores más altos ($2.4 \times 10^5 \text{ NMP ml}^{-1}$) que la población acetogénica ($1.1 \times 10^5 \text{ NMP ml}^{-1}$) a los 90 días de operación, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de las BSR para utilizar el etanol y el lactato como sustratos, intermediarios que son generados por las bacterias fermentadoras que en ausencia de sulfatos pueden metabolizar estos compuestos transformándolos en acetato, CO_2 e H_2 .

La población de metanógenos acetoclásticos e hidrogenofílicos se incrementó cuando los AGV's fueron consumidos durante la transformación de la FORSU (Figura.2). En los lodos evaluados del R3 hubo un predominio de la población metanogénica del acetato y el formato por el orden de 10^5 NMP ml^{-1} en los recuentos realizados a los 30 y 60 días. Sin embargo, se detectó una disminución de la población metanogénica y un aumento en la población sulfatorreductora a los 90 días de operación, sin que aparentemente exista competencia por los sustratos entre estos grupos metabólicos. Por el contrario, ha sido reportado que en reactores anaerobios en los que la concentración de sulfatos es baja, la población sulfatorreductora podría comportarse como las bacterias acetogénicas, debido al metabolismo fermentativo de esta población, por lo que la transferencia interespecífica de hidrógeno podría llevarse a cabo entre la población sulfatorreductora y metanogénica [14, 24, 31, 32]. Al relacionar este hecho con los valores obtenidos para la población acetogénica (10^5 NMP ml^{-1}) se puede inferir que la baja concentración de AGV's podría ser el resultado de las interacciones sintroficas encontradas en el sistema, donde las bacterias acetogénicas producen H_2 y las BMH o BSR lo consumen. La presencia de metanógenos acetoclásticos pertenecientes al género *Methanotrix sp* y *Methanosarcina sp* en el R3, posiblemente se debe a que estos microorganismos utilizan el acetato como la principal ruta metabólica para la producción de metano. Por otro lado, la producción de metano a partir del formato sería el resultado de la presencia de la población metanogénica hidrogenofílica (*Methanococcus sp* y *Methanobacterium sp.*) que utilizan este tipo de sustrato. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores quienes observaron la presencia de bacilos filamentosos pertenecientes al género *Methanotrix sp* como el metanógeno acetoclástico más

abundante en reactores anaerobios. El género *Methanotrix sp* presenta alta afinidad por el acetato, mientras el género *Methanosarcina sp* se caracteriza por su habilidad para utilizar múltiples sustratos, incluyendo H_2 y formato, lo cual le confiere una alta tasa de crecimiento y una ventaja competitiva en sistemas estables, en los cuales los niveles de acetato son bajos. [2, 14, 15, 17, 26].

Los resultados presentados en este estudio aportan evidencia sobre la dinámica poblacional en reactores anaerobios que tratan la FORSU. Sin embargo, la complejidad de estos sistemas hace difícil concluir acerca de todas las interacciones del proceso.

5. CONCLUSIONES

La digestión anaerobia en dos fases es un proceso adecuado para la degradación de la FORSU, de acuerdo con el balance encontrado entre los distintos grupos metabólicos involucrados en ella, que permitió correlacionar la estabilidad de los reactores anaerobios con el crecimiento de estos grupos. No se detectó competencia por los sustratos entre la población sulfatorreductora y la metanogénica, en el R3 lo cual es atribuido a los efectos de sinergismos entre estos microbios. Los lodos procedentes del R3 se consideran un inóculo adecuado para el arranque de nuevos reactores anaerobios para el tratamiento de la FORSU, de acuerdo con la producción de metano y la población microbiana reportada.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación de esta investigación y al CEIAM-UIS por el soporte académico.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ađdađ, O. N. and Sponza, D. T. 2005. Co-digestion of industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling reactors. *Process Biochemistry*. 40:1871–1879.
- [2] Alves, M., Pereira, A., Mota, M., Novais, J. and Colleran, E. 1998. Staged and non-staged anaerobic filters: microbial activity segregation, hydrodynamic behaviour and performance. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 99-108.
- [3] Anderson, G. K. and Yang, G. 1992. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environ. Res.* 64: 53-59.
- [4] APHA, AWWA and WEF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19 th edition. *American public Health Association*. Washington, D.C. USA.

- [5] Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. and Wolfe, R. S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43:260-296.
- [6] Bezama, A., Aguay, P., Konrad, O., Navia, R. and Lord, K. 2007. Investigations on mechanical biological treatment of waste in South America: Towards more sustainable MSM management strategies. *Waste Management*. 27(2): 228-237.
- [7] Bouallagui, H., Touhami, Y., Cheikh, R. B. and Hamdi, M. 2005. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*. 40: 989-995.
- [8] Borzacconi, L., López, I. and Viñas, M. 1995. Application of anaerobic digestion to the treatment of agroindustrial effluents in Latin America. *Wat. Sci. Tech.* 32(12): 105-111.
- [9] Castillo, E., Cristancho, D. and Arellano, V. 2006. Study of the operational conditions for anaerobic digestion of urban solid wastes. *Waste Management*. 26:546-556.
- [10] Cogán, A. M. y Rodríguez, I. C. 2000. Diagnóstico, análisis y planteamiento de alternativas ambientales para minimizar la contaminación originada por los residuos tóxicos y peligrosos en el vertedero municipal el carrasco. Tesis de Grado. *Universidad Industrial de Santander (UIS)*. Pág. 73.
- [11] Demirer, G. N. and Chen, S. 2005. Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. *Process Biochemistry*. 40: 3542-3549.
- [12] Diaz, M., Espitia, V. y Molina, P. 2002. Digestión Anaerobia. Una aproximación a la Tecnología. *Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología*. Primera edición.
- [13] DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. [Base de datos en línea]. Versión en HTML. Braunschweig (Germany), 2000. Disponible en Internet: <http://www.dsmz>.
- [14] Elferink, S. J. W. H., Vorstman, W. J. C., Sopjes, A. and Stams, A. J. M. 1998. Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 185-194.
- [15] Fukuzaki, S., Nishio, N. and Nagai, S. 1995. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates. *Journal of fermentation and bioengineering*. 79(4): 354-359.
- [16] Fricke, K., Santen, H. and Wallmann, R. 2005. Comparison of selected aerobic and anaerobic procedures for MSW treatment. *Waste Management* 25: 799-810.
- [17] Griffin, M. E., McMahon, K. D., Mackie, R. I. and Raskin, L. 1998. Methanogenic population dynamics during start-up anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering*. 57(3): 342-355.
- [18] Hartmann, H. and Ahring, B. 2005. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. *Water Research* 39: 1543-1552.
- [19] Hedrick, D. B., White, T., Gruckert, J. B., Jewell, W.J. and White, D. 1992. Microbial biomass and community structure of a phase-separated methanogenic reactor determined by lipid analysis. *Journal of industrial Microbiology*. 9: 193-199.
- [20] Horiuchi, J. I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T. and Kobayashi, M. 2002. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*. 82:209-213.
- [21] Hu, Z-H., Wang, G. and Yu, H-Q. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*. 21:59-62.
- [22] Liu, J., Olsson, G. and Mattiasson, B. 2004. On-line monitoring of a two-stage anaerobic digestion process using a BOD analyzer. *Journal of Biotechnology*. 109: 263-275.
- [23] Lopes, W. S., Duarte, L. and Shiva, P. 2004. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 94: 261-266.
- [24] Ministerio de Ambiente, Vivienda y desarrollo Territorial (MAVDT). República de Colombia. 2005.
- [25] Mizuno, O., Li, Y. Y. and Noike, T. 1998. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Wat. Res.* 32 (5): 1626-1634.
- [26] McMahon, K. D., Zheng, D., Stams, A. J. M., Mackie, R. I. and Raskin, L. 2004. Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnology and Bioengineering*. 87(7): 823 - 834.
- [27] Qian, X. and Morton, A. B. 1996. Enumerations of anaerobic refuse-decomposing microorganisms on refuse constituents. *Waste Management & Research* 14: 151-161.
- [28] Sachs, J., Meyer, U., Rys, P. and Feitkenhauer, H. 2003. New approach to control the methanogenic reactor of a two-phase anaerobic digestion system. *Water Research*. 37: 973-982.
- [29] Sosnowski, P., Wieczorek, A. and Ledakowicz, S. 2003. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Environmental Research*. 7: 609-616.
- [30] Staley, J., Briant, M., Pfennig, N. and Hoit, J. 2000. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. Volumen 3.
- [31] Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F. Pavan, P. and Poggi-Varaldo, H. 2004. A review on hydrogen production with anaerobic mixed cultures. Proceedings of the H₂-age Conference: When, Where, Why. Pierucci S. (ed) AIDIC Publ, 16-19/May, Pisa, Italy.
- [32] Zhou G. and Fang, H. 1998. Competition between methanogenesis and sulfidogenesis in anaerobic wastewater treatment. *Waf. Sci. Tech.* 38(8-9): 317-324.