



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Estudio del efecto del biogás sobre
el crecimiento de plántulas calabaza
(*Cucurbita pepo* L.)

Tesis

Que presenta

Eduardo Baltierra Trejo

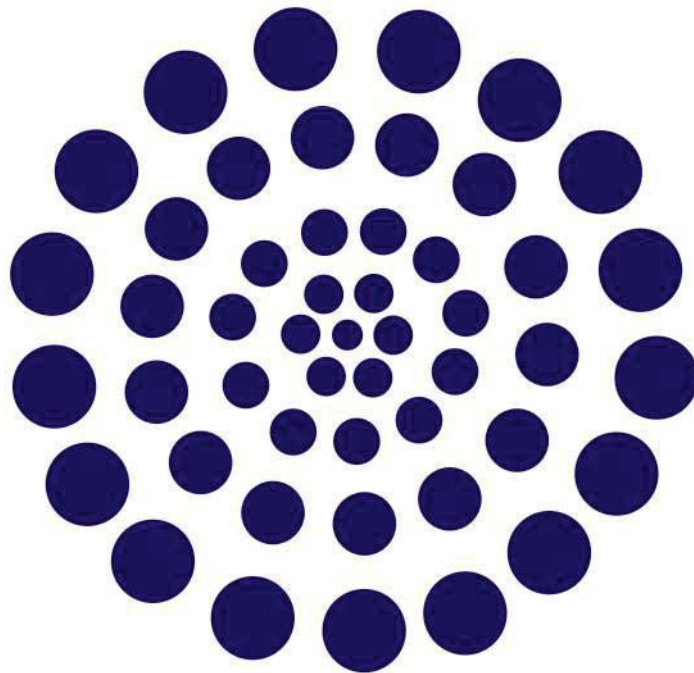
Como requisito parcial para obtener el título
Profesional de

Maestro en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez

Co-Directora: Dra. Liliana Márquez Benavides

Morelia, Mich., mayo 2012



CONACYT

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Residuos Sólidos y Medioambiente del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales (IIAF) y en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) gracias al financiamiento otorgado al Proyecto 2.7 y 5.15 de la CIC-UMSNH y a la Beca de Maestría 239180 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

La planeación y dirección del proyecto experimental fue realizada por la Dra. Liliana Márquez Benavides (IIAF) y el Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez (IIQB), se contó con la asesoría y revisión de la Dra. Jeannette Sofía Bayuelo Jiménez (IIAF), el Dr. Rafael Salgado Garciglia (IIQB) y el Dr. Héctor Javier Villegas Moreno (IIQB).



CONTENIDO

ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Ciclo de vida vegetal	6
1.2. Intercambio de gases en la parte aérea vegetal.....	7
1.3. Intercambio de gases en la raíz vegetal.....	8
1.4. Intercambio gaseoso durante la germinación	10
1.5. Efecto tóxico de gases en la parte aérea vegetal	10
1.6. Efecto tóxico de gases en la parte radical vegetal.....	10
1.8. El relleno sanitario: desarrollo y utilidad ulterior.....	11
1.9. Fases de la degradación anaerobia	12
1.10. Biogás de relleno sanitario	14
1.11. Reactores de digestión anaerobia de sustratos sólidos	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Estudios <i>ex situ</i> del efecto del biogás sobre plantas	17
2.1. Estudios <i>in situ</i> del efecto del biogás sobre plantas	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos particulares.....	20
6. PLANEACIÓN DEL PROYECTO EXPERIMENTAL.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Construcción de sistemas productores de biogás	22
7.1.1. Montaje del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido	22
7.1.2. Alimentación de reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido.....	22
7.1.3. Seguimiento del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido.....	22
7.2. Construcción de sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal	22
7.2.1. Estandarización de la medición de flujo de biogás.....	22
7.2.2. Sistema para la difusión de biogás en las raíces.....	23



7.2.3. Análisis cualitativo y cuantitativo del biogás.....	23
7.3. Manejo y operación del sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal.	24
7.3.1. Preparación de la semilla.....	24
7.3.2. Estandarización de la textura de suelo artificial y volumen de riego.....	24
7.3.3. Acoplamiento del sistema de difusión de biogás.....	25
7.3.4. Monitoreo de crecimiento de la calabaza.....	25
7.4. Análisis estadístico.....	25
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
8.1. Seguimiento del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido.....	26
8.2. Estandarización de la medición del flujo de biogás.....	27
8.3. Producción de biogás en corto plazo.....	28
8.4. Difusión de biogás en suelo artificial.....	28
8.5. Seguimiento del sistema durante la difusión de biogás en la raíz vegetal.....	29
8.6. Respuesta de la calabaza.....	30
8.6.1. Germinación.....	30
8.6.2. Crecimiento de las plántulas de calabaza a los 15 días.....	30
8.6.3. Crecimiento de las plántulas de calabaza a los 30 días.....	31
9. CONCLUSIONES.....	33
10. PERSPECTIVAS.....	33
11. VALIDACIÓN DE OBJETIVOS.....	34
12. VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS.....	34
13. FIGURAS.....	35
14. CUADROS.....	53
15. LITERATURA CITADA.....	62
16. ANEXOS.....	66
16.1. Métodos analíticos.....	67
16.1.1. Determinación de humedad, sólidos totales y sólidos totales volátiles.....	67
16.1.2. Determinación de pH.....	67
16.1.3. Determinación de capacidad de campo del suelo artificial.....	68
16.1.4. Determinación de CH ₄	69
16.2. Cronograma de trabajo.....	70



ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CG	Cromatógrafo de gases
COV	Compuestos orgánicos volátiles
DA	Digestión anaerobia
DE	Desviación estándar
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
FO	Fracción orgánica
RDASS	Reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido
RESA	Relleno sanitario
RSU	Residuos sólidos urbanos
SMB	Sistema de medición de biogás
ST	Sólidos totales
STV	Sólidos totales volátiles
UCV	Unidad de crecimiento vegetal
% (m/m)	Porcentaje masa-masa
% (V/V)	Porcentaje volumen-volumen



RESUMEN

La digestión anaerobia (DA) de la fracción orgánica (FO) de los residuos sólidos urbanos (RSU) en los rellenos sanitarios (RESA), tiene como consecuencia la emisión de biogás con un efecto negativo sobre el crecimiento vegetal. La hipótesis de este trabajo fue que exponer las raíces de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) al flujo de biogás tiene un efecto negativo sobre el crecimiento en función de la concentración y tiempo de exposición.

El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto del biogás sobre las raíces de calabaza mediante un modelo experimental *ex situ*. Para ello se construyó un sistema de simulación de la DA de la FO de los RSU que difunde biogás en el suelo, donde crecieron plántulas de calabaza. Se midió el efecto del biogás sobre esa planta con las variables respuesta: porcentaje de germinación, peso seco foliar y radical. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de T de Student para determinar la significancia en la variación de la concentración de biogás. Los resultados mostraron que en el modelo experimental se generó biogás de manera continua de composición similar al producido en los RESA, que difundió en el suelo artificial y provocó la inhibición de la germinación de semillas de calabaza expuestas a alta concentración de biogás en un 100% y a baja en un 25%, comparado con el control sin exponer al biogás; en plántulas de 15 días no hubo diferencia significativa en los pesos fresco y seco tanto de la parte aérea como radical con respecto al control, mientras que a los 30 días las plántulas expuestas a alta y baja concentración tuvieron una biomasa aérea y radical estadísticamente menor comparado con la calabaza usada como control absoluto.

Palabras clave: fisiología vegetal, digestión anaerobia, relleno sanitario.



1. INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos urbanos (RSU) son comúnmente eliminados en los rellenos sanitarios (RESA) e ilegalmente en tiraderos al aire libre donde la fracción orgánica (FO), es la más importante con un 40-65% (m/m), la que bajo digestión anaerobia (DA) genera una elevada concentración de gases y lixiviados con riesgo de contaminación ambiental (Tchobanoglous, 2005).

El biogás es la mezcla de gases generados por la DA de la FO de los RSU, compuesto principalmente por metano (CH_4) con un 45-60% (V/V) y dióxido de carbono (CO_2) con un 40-55%. La emisión de biogás no se limita a la superficie del RESA, ocurre en los sitios adjuntos por un desplazamiento denominado migración lateral de biogás (MLB) lo cual se ha correlacionado con la pérdida de la vegetación en estos lugares (Tchobanoglous, 2005; Franzidis *et al.*, 2007). A pesar de ello, son pocos los reportes en la literatura que explican un efecto negativo sobre las raíces vegetales en sitios de alta emisión de biogás (Chan *et al.*, 1991).

1.1. Ciclo de vida vegetal

Con base a lo anterior es necesario establecer el efecto que el biogás ejerce en las plantas; lo que depende del tipo de especie vegetal, de su etapa fisiológica de crecimiento, al igual que de la concentración y el tiempo de exposición al biogás.

El ciclo de vida vegetal es diferente en leñosas que en herbáceas anuales o perennes, sin embargo el crecimiento vegetal en todas los géneros está regulado por fitohormonas como son las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico y el etileno (Sallisbury *et al.*, 2005) y externamente por factores ambientales tales como la temperatura, el fotoperiodo, la precipitación pluvial y las propiedades fisicoquímicas del suelo: textura, humedad, pH, concentración de los minerales y interacciones de las raíces vegetales con los microorganismos (Sánchez-Yañez, 2007).

En el ciclo vegetal se distinguen cinco etapas (Hess, 1980; Sallisbury *et al.*, 2005):

1) La germinación que ocurre al hidratarse la semilla lo que provoca la hidrólisis del almidón del endospermo y causa la emergencia de la radícula, que perfora la



testa para formar la raíz primaria, luego se separan los cotiledones, seguido del alargamiento del hipocótilo con la plúmula para la formación de los tallos y las hojas cotiledonares, en esta etapa el metabolismo vegetal es heterótrofo.

2) La plántula inicia cuando el embrión consume el almidón de reserva y se induce la fotosíntesis en los cotiledones. El crecimiento celular es acelerado y está circunscrito a los meristemos apical y radicular, se desarrollan las hojas primarias para sustituir a los cotiledones, que en diversas especies tienen una morfología distinta a la de la etapa adulta, el metabolismo es fotoautótrofo en la parte aérea y heterótrofo en la raíz.

3) En la fase vegetativa el crecimiento en los meristemos es lento, aparecen las hojas secundarias que alcanzan su forma y tamaño definitivo. Crecen las raíces laterales a partir de la raíz principal y las adventicias desde la base del hipocótilo.

4) En la etapa de floración los meristemos vegetativos se transforman en reproductivos; si las condiciones nutrimentales son adecuadas, el fotoperiodo induce la formación de flores las que contienen los estambres y pistilos en los que ocurre la esporogénesis y la gametogénesis. Al madurar las células reproductivas se da la polinización que implica el paso del tubo polínico a través del estigma del pistilo para fecundar el óvulo. Al desarrollarse el embrión el pericarpio que rodea al ovario se engrosa y junto a la semilla formará el fruto. La semilla contendrá al embrión que permanece en letargo hasta que las condiciones hídricas, de oxígeno y temperatura sean las adecuadas para su germinación.

5) En la senescencia el envejecimiento vegetal, se caracteriza por una pérdida de la organización celular, abscisión de órganos y muerte. En las anuales y bianuales sucederá en toda la planta después de la floración, mientras que en perennes solo en los órganos deciduos.

1.2. Intercambio de gases en la parte aérea vegetal

El aire atmosférico al que está expuesta la parte aérea vegetal se compone por 78% N₂, 21% O₂, 0.035% CO₂ y trazas de Ar y Ne. El intercambio gaseoso



ocurre por los estomas que son poros en la superficie inferior de las hojas, formada por dos células guarda y oclusivas que normalmente abren durante el día y cierran durante la noche. En la fotosíntesis la entrada de CO_2 permite la síntesis de glucosa y emisión de O_2 , mientras que en la respiración entra O_2 para oxidar glucosa con la salida de CO_2 y producción de energía en forma de ATP, que será utilizada en el crecimiento y mantenimiento de las estructuras vegetales.

Los gases se mueven en los tejidos vegetales por el espacio aéreo intercelular por debajo de las células del parénquima, para difundir por la pared y membrana celular o por los cauces de aquaporina. Debido a que los gases solo se mueven por difusión, únicamente las capas de células superficiales están vivas mientras que en tallos y raíces las células internas están muertas (Sallisbury *et al.*, 2005).

1.3. Intercambio de gases en la raíz vegetal

La mezcla de gases que existen en el aire del suelo en una condición “natural” son: 78.5-80% N_2 , 18-20% O_2 y 0.1-3% CO_2 , lo que no ocurre en los suelos anegados en los que el O_2 se consume rápidamente por la respiración de las raíces de plantas y los microorganismos aerobios del suelo, mientras que su reemplazamiento por O_2 atmosférico es deficiente, lo que incrementa el nivel de CO_2 hasta en un 10% (Fernández y Kosian, 1987 en Chan *et al.*, 1991).

Las raíces maduras están constituidas internamente por capas de células muertas impregnadas con suberina, una cera impermeable a gases, éstas son perforadas por poros no suberizados llamados lenticelas que permiten al O_2 , difundir a los espacios intercelulares de los tejidos y liberar el CO_2 a la atmósfera (Sallisbury *et al.*, 2005). Los principales factores ambientales que afectan directamente la respiración radical son la concentración de O_2 , el contenido de humedad y la temperatura (Azcon 2001).



A nivel de la raíz, los síntomas de estrés por ausencia de O_2 y otros efectos del anegamiento son la clorosis, la epinastia o caída del peciolo, la abscisión de hojas, el decremento del crecimiento, la hipertrofia del tallo y lenticelas, el marchitamiento de hojas, la ausencia de frutos, daño radical, susceptibilidad al ataque de fitopatógenos y la muerte de la planta. Se requiere un mínimo de 18% de O_2 en el suelo para mantener saludable la población vegetal, mientras que concentración menor al 12% es mortal para la mayoría de plantas (McBain *et al.*, 2004)

Como resultado de la anoxia en las raíces ocurre un cambio de respiración de aeróbica a anaeróbica. Esto reduce la generación de ATP necesario para el metabolismo vegetal, por lo que en los tejidos se acumulan compuestos tóxicos como el etanol, el ácido láctico, el acetaldehído y los cianogénicos. En las células radicales la acidosis citosólica por exceso de ácido láctico provoca muerte celular (Jackson, 2002).

Las adaptaciones de la raíz vegetal al estrés por anegamiento en plantas tolerantes incluyen la formación de raíces adventicias e incremento de la porosidad, la respiración anaerobia de los tejidos maduros por un corto tiempo y el desarrollo de aerénquima (Azcón, 2001).

Aerénquima es el espacio gaseoso que forman los tejidos vegetales de manera intercelular en las raíces y tallos en especies de humedales y en algunas de suelo seco, producto de la hipoxia por anegamiento y otros tipos de estrés como alta temperatura, sequía, deficiencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Existen 2 tipos básicos, el aerénquima lisogeno que ocurre por muerte en células en temprano desarrollo debido al incremento de etileno, síntesis de celulasas, disolución del protoplasma y separación de las paredes celulares como ocurre en la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el maíz (*Zea mays* L.); y el aerénquima esquizógeno que es formado por la separación celular formada por un crecimiento diferenciado en células adjuntas en la lamela media, es común en especies de humedales como la acedera (*Rumex sp.* L.), y la sagitaria (*Sagittaria latifolia* Willd.) (Evans, 2003). Los espacios interconectados facilitan el movimiento de O_2 de la atmósfera a la raíz para una adecuada respiración (McBain *et al.*; 2004)



1.4. Intercambio gaseoso durante la germinación

Además de agua, el O_2 es factor indispensable en la germinación de semillas vegetales, para la producción de ATP en la fosforilación oxidativa a nivel de sustrato en la cadena respiratoria para la obtención de energía. Algunas gramíneas como el arroz (*Oryza sativa* L.) se han adaptado a germinar bajo el agua, ya que poseen un sistema de glucólisis que no requiere O_2 (Hess, 1980).

En la mayoría de las semillas, la germinación se inhibe a concentración de O_2 menor del 10% o superior al 4% de CO_2 . (Stolwijk y Thimman, 1987 en Chan *et al.*, 1991; Burton y Pregitzer, 2002)

1.5. Efecto tóxico de gases en la parte aérea vegetal

El requerimiento mínimo de CO_2 para que las plantas realicen la fotosíntesis es de 0.035-0.05%. Un aumento en la concentración de 0.15-2% incrementa la tasa fotosintética, el crecimiento vegetal y la productividad hasta en un 30% (m/m), pero nivel superior a 2% provocan el cierre de estomas, lo que inhibe la fotosíntesis, la respiración y la transpiración (Schwarz, 1999; Lindroth, 2010).

1.6. Efecto tóxico de gases en la parte radical vegetal

La concentración "normal" de CO_2 en el suelo en contacto con las raíces vegetales es de 0.1-2%, su incremento disminuye la actividad respiratoria, en especial cuando en el suelo no existe un intercambio adecuado de gases. Se ha reportado que una concentración menor al 4% de CO_2 estimula el crecimiento de la raíz, por un mecanismo de resistencia al estrés anóxico, pero se inhibe si es del 5-10%, mientras que superior al 15-20% son letales para la mayoría de las raíces de plantas (Stolwijk y Thimman, 1987 en Chan *et al.*, 1991, McBain *et al.*, 2004).

En el suelo, el CH_4 no es un componente habitual, su formación depende de condiciones anaerobias, el incremento puede ser de 0.1-2% y en suelos anegados por un periodo prolongado alcanza el 14%. En general se considera que el efecto tóxico del CH_4 sobre las raíces vegetales es consecuencia del desplazamiento del O_2 del suelo (Jackson, 2002).



En los RESA las raíces de las plantas están expuestas a concentración de hasta un 45-60% de CH_4 , 40-55% de CO_2 y 0% de O_2 en sitios donde la emisión de biogás es extremadamente alta y menor de acuerdo con las características físicas del suelo y la profundidad, por ejemplo en los primeros 20 cm se reporta un promedio de 17% de O_2 , 8% de CO_2 , 3% de CH_4 y 72% de N_2 (Gilman *et al.*, 1982 en Marchiol *et al.*, 2000), por lo que de acuerdo a la literatura las plantas que crecen en estos lugares están expuestas a una concentración por arriba de los niveles considerados tolerables, aún así algunos géneros vegetales crecen en los RESA.

1.8. El relleno sanitario: desarrollo y utilidad ulterior

Un RESA es el sitio destinados para la disposición final de los RSU diseñado y explotado para minimizar la contaminación del aire, agua y suelo así como los efectos negativos sobre la salud pública (Tchobanoglous, 2005). La disposición de los RSU implica su compactación, entierro, apisonamiento en capas y su posterior cobertura con suelo (Glynn, 1999). Un predio destinado a ser RESA debe ubicarse a una distancia mínima de 500 m de desarrollos urbanos o cuerpos lacustres, tener una membrana geológica natural mayor a un metro de espesor, un sistema de captación y recirculación de lixiviado, además de contar con un drenaje pluvial (NOM-083-SEMARNAT-2003). Sin embargo en México y Latinoamérica son pocos los casos de RESA contruidos con ingeniería avanzada provistos de una geomembrana plástica para la retención de lixiviados y pozos para la recolección de biogás, por lo que se emiten sin control grandes cantidades al ambiente (Tchobanoglous, 2005).

Dado a su origen los RSU depositados en el RESA están conformados por materiales no biodegradables: 15% plástico, 7% vidrio, 5% textiles, 3% metales y principalmente por materiales biodegradables: 70% orgánicos y papel. La DA de la FO de los RSU genera CH_4 y CO_2 (Tchobanoglous, 2005). Se estima que a nivel mundial los RESA producen 40 Tg/año de CH_4 , equivalente al 7% de las emisiones atmosféricas totales, lo que contribuye de manera importante al calentamiento global (Glynn, 1999; Houweling *et al.*, 1999).



Cuando estos sitios cumplen su vida útil se usan para desarrollo urbano por su cercanía con la ciudad, sin embargo no son aptos para la construcción habitacional ya que la emisión de lixiviados tóxicos y gases inflamables se produce hasta 75 años posteriores a su clausura, al igual que hundimientos en el suelo. Por ello los RESA se rehabilitan como: parques, jardines botánicos, áreas de recreación o granjas lo que requiere la introducción de vegetación, sin embargo las especies de plantas usadas para reforestar han mostrado dificultades para adaptarse a las condiciones ambientales adversas de estos sitios (Leone *et al.*, 1977, Flower *et al.*, 1978 en Chan *et al.*, 1991).

La cobertura vegetal en los RESA clausurados es muy pobre dominada por un número limitado de especies de pastos, los intentos por restaurar deben considerar los grados de erosión del suelo y los niveles de hipoxia del suelo. Se considera que la etapa de establecimiento es crítica por lo que es importante comprender el efecto del biogás en semillas y plántulas. Se ha recomendado para la rehabilitación el uso de pastos y leguminosas como el trébol (*Trifolium spp.*) y la alfalfa (*Medicago Sativa L.*), en el caso de arbóreas el álamo (*Populus spp.*) y fresno (*Fraxinus spp.*), sin embargo se sabe poco sobre cómo afectan las emisiones de gases como CH₄ y CO₂ en su crecimiento (Marchiol *et al.*, 2000)

1.9. Fases de la degradación anaerobia

Es necesaria la comprensión de los procesos involucrados en la DA de la FO de los RSU en un RESA, para entender el impacto que tiene el biogás sobre la vegetación. De acuerdo con la variación en la tasa de generación de biogás se consideran 5 fases secuenciales (Tchobanoglous, 2005).

I) El ajuste inicial comienza cuando los RSU son depositados en las celdas del RESA, en las que microorganismos aerobios degradan los compuestos orgánicos de fácil digestión: monómeros de azúcares, aminoácidos y lípidos hasta que se consume el O₂ atrapado en el suelo, en consecuencia el pH disminuye gradualmente. Al comenzar esta fase la composición de gases es de: 79% de N₂ y 21% de O₂, los cuales disminuyen lentamente mientras se incrementan el nivel de CO₂, esta fase dura 2 semanas.



II) En la fase de transición se inicia la actividad bacteriana anaeróbica al descender el O_2 , se generan ácidos orgánicos, aumenta la concentración de CO_2 hasta un 40-50% y de H_2 alrededor 10-20%. Los nitratos (NO_3^-) y los sulfatos (SO_4^-) que sirven como aceptores finales de electrones, se reducen a N_2 y sulfuro de hidrógeno (H_2S) respectivamente, hay un bajo potencial de oxidación-reducción y el pH del lixiviado disminuye a 5. Esta fase se completa entre 2 semanas a 2 meses.

III) La fase ácida se divide en 2 partes: 1) fermentación de ácidos orgánicos en alcoholes, 2) transformación de alcoholes en ácido acético (CH_3-COOH), CO_2 y pequeñas cantidades de H_2 , por bacterias anaerobias estrictas y facultativas denominadas acetogénicas. Se incrementa la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la química de oxígeno (DQO) y el pH disminuye a 3-5. En esta etapa el biogás está compuesto principalmente por un 50-90% de CO_2 y <20% de H_2 . El tiempo de duración de esta fase varía entre 2 meses a 2 años.

IV) En la fase metanogénica dos grupos de bacterias anaerobias estrictas reducen el CH_3-COOH y el CO_2 generados en la fase anterior a CH_4 : las metanogénicas acetoclásticas y las hidrogenofílicas, respectivamente. En esta etapa la composición de la mezcla de gases es principalmente: 40-55% de CO_2 y 45-60% de CH_4 . El pH en los RSU se eleva entre 6.8 a 8. Disminuyen los valores de la DBO y la DQO. Esta fase es la más estable y dura aproximadamente desde 6 meses hasta 5-20 años.

V) En la fase de maduración se registra una caída en la generación de biogás ya que el CH_3-COOH se consumió en el lixiviado o gases de las fases anteriores. La mayor parte de la FO se ha degradado persistiendo la lignina y sus derivados: ácidos húmicos y fúlvicos, estas son sustancias recalcitrantes en el RESA de difícil degradación que se utilizan como indicadores del proceso. La emisión de CH_4 y CO_2 ocurre de manera intermitente en un periodo de 20 hasta 40 años posteriores a la clausura del RESA, se incrementa gradualmente la



concentración de N_2 y O_2 por inmisiones atmosféricas en el gas del vertedero para restablecer la condición original.

La duración de cada fase dependerá de la distribución de los componentes orgánicos, la disponibilidad de nutrientes, la relación C/N, la composición de los RSU y su grado de compactación, así como de factores ambientales como la temperatura y el contenido de humedad. El suelo de cobertura, la adición de lodos de agua residual y la recirculación de lixiviados son fuentes de microorganismos aerobios y anaerobios que aceleran la DA de la FO de los RSU (Tchobanoglous, 2005).

1.10. Biogás de relleno sanitario

El biogás en un RESA es una mezcla de gases constituido principalmente por CH_4 45-60% y CO_2 40-55%, cantidades menores de otros gases inorgánicos como N_2 2-5%, H_2S 0-1%, NH_3 0.1-1%, H_2 0-0.2% y trazas de compuestos orgánicos volátiles o COV 0.01-0.6% (Flower *et al.*, 1978 en Chan *et al.*, 1991; Tchobanoglous, 2005) de los que se han identificado un total de 116, varios altamente fitotóxicos como son el cloruro de vinilo, el benceno y el cloroformo; su producción depende de la co-disposición de residuos peligrosos y de la formación de lixiviados (Tchobanoglous, 2005).

La velocidad de la DA de la FO de los RSU con la emisión de biogás en el RESA, puede ser rápida como de 6 meses a 5 años, o muy lenta desde 20 a 40 años. La tasa de generación y composición del biogás es afectada por la temperatura de los RSU, por su contenido de humedad derivada de la precipitación pluvial en el sitio, del régimen estacional, del tipo de suelo de cobertura, de la composición de la FO y aspectos técnicos de operación del RESA (Tchobanoglous, 2005).

La tasa estimada de producción de biogás para RSU en los RESA de México, en condiciones de rápida DA es de: 4 a 10 L/kg/año, en moderada de: 1.5 a 3 L/kg/año y en baja de: 0.7 a 1.5 L/kg/año (Rosiles, 2000).



El biogás generado difunde hacia la atmósfera por una diferencia en el gradiente de presión y de temperatura, mientras que a lo largo del RESA circula en dirección a áreas de menor presión. La cantidad de la MLB depende de la porosidad de la clase del suelo adyacente al RESA (Rivera y Sarmiento, 1994) y de fluctuaciones en la presión atmosférica (Young, 1992, en Marchiol *et al.*, 2000). Se ha registrado concentración de CH₄ y CO₂ superior al 40% a distancia de 100 m del borde del RESA y hasta de 5% de CH₄ a 300 m de su límite (Tchobanoglous, 2005).

En este sentido la vegetación que crece en los RESA está expuesta a distinta concentración de biogás, pero son pocos los reportes sobre el efecto que tiene en el crecimiento vegetal, por lo que se desconoce si el daño se debe al CH₄, al CO₂ o al efecto combinado de ambos.

1.11. Reactores de digestión anaerobia de sustratos sólidos

Con base a lo anterior, un mayor control de los factores involucrados en la DA de la FO de los RSU en un RESA, puede lograrse mediante el uso de modelos a escala denominados reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS).

Los RDASS son contenedores herméticos donde la FO de los RSU se DA por acción conjunta de diversos grupos microbianos en especial bacterianos: los aerobios facultativos que generan las hidrolasas, proteasas y lipasas para descomponer los polímeros en monómeros solubles que luego son fermentados en ácidos orgánicos, H₂ y CO₂. Las bacterias anaerobias acetogénicas fermentan los ácidos orgánicos en CH₃-COOH, el que luego es reducido posteriormente a CH₄ por las arqueobacterias metanogénicas (*Brock et al.*, 2009).

La dinámica de la DA en un RDASS se realiza en cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte. El factor clave es mantener a los microorganismos en la fase de exponencial el mayor tiempo posible para efficientizar la DA. Esto se logra en un pH entre 6.7 y 7.8, de 30-38° C en un RDASS a temperatura mesofílica o bien de 55-60° C en termofílica, anaerobiosis estricta (<-330 mV), un contenido de sólidos totales volátiles (STV) >22% y una



alimentación continua para evitar la fase de muerte por consumo de sustratos (Tchabanoglous, 2005).

El tiempo de residencia de la FO en un RDASS varía con la concentración y el tipo de material de alimentación, la DA en condición termofílica está en el rango de 14 días, mientras que en mesofílica varía de 15-40 días. La eficiencia del biodigestor expresada como actividad metanogénica puede ser medida por cromatografía de gases (Guyot *et al.* 1990), por cambios en la concentración de intermediarios metabólicos (Switzenbaum *et al.*, 1990), por adición de determinados sustratos como el acetato, el propionato, el butirato o el H₂ para medir la actividad catabólica de grupos bacterianos específicos como las bacterias acetoclásticas, propionoclásticas e hidrogenofílicas (Sorensen *et al.*, 1993).



2. ANTECEDENTES

Son escasas las investigaciones sobre el efecto en el crecimiento de plantas, cuyas raíces fueron expuestas al flujo de biogás derivado de la DA de la FO de los RSU, los que fueron realizados por análisis de la vegetación directamente en los RESA, o bien por medio de inyección de gases en el suelo, pero no se reporta en la literatura un modelo de análisis *ex situ* que simule este proceso.

2.1. Estudios *ex situ* del efecto del biogás sobre plantas

Smith *et al.*, en 2004 reportaron el impacto de la inyección en el suelo por flujo regulado de 100 L/h de CH₄ a un metro de profundidad, durante 20 meses sobre el crecimiento del pasto (*Bouteloua sp. B.*), el trigo (*Triticum aestivum L.*) y el frijol (*Phaseolus vulgaris L.*). Los resultados indicaron que el pasto mostró clorosis a los 44 días de exposición; mientras que el trigo y frijol tuvieron un pobre crecimiento y clorosis hasta 4 meses después de iniciar el experimento. La concentración de gas en las parcelas no fue constante, en el punto de inyección se registró hasta 80% de CH₄, pero conforme aumento la distancia a este la concentración fue menor.

Franzidis *et al.*, en 2007 con un modelo de simulación por computadora compararon la concentración de biogás en distintos sitios de un RESA durante 3 años; con base a la porosidad del suelo medida por nucleodensometría así como por la pérdida de la cobertura vegetal. Los resultados mostraron que la concentración de biogás aumentó en áreas en las que suelo fue poroso, sitio donde registró la mayor pérdida de vegetación. Se concluyó que hubo una relación directa entre el nivel de concentración de biogás y la pérdida de la cobertura vegetal en RESA.

2.1. Estudios *in situ* del efecto del biogás sobre plantas

Wong *et al.*, en 1992 investigaron los factores que afectan la diversidad y distribución de la vegetación en un RESA. Para ello hicieron un análisis mediante transectos en cuadrantes de 1 m² de vegetales herbáceas y arbóreas en sitios de baja emisión de biogás de hasta un 10% (V/V) de CH₄ comparados con los de alta de 41% de CH₄.

Los resultados reportaron que el efecto del biogás sobre la vegetación en sitios con baja emisión de biogás fue de mayor cobertura vegetal, con un promedio de 6



herbáceas con cobertura de 68.5% y 12 arbóreas superior al 100%, mientras que en sitios con alta emisión hubo 6 herbáceas que cubrieron 51.2% y tres arbóreas con el 7.6%, por lo que reportaron una relación directa entre la concentración de biogás y la cobertura vegetal de las herbáceas y las arbóreas.

Chan *et al.*, en 1991 estudiaron el impacto del biogás en las raíces de 10 especies de plantas leñosas subtropicales: acacia (*Acacia confusa* Merr.), acacia de Constantinopla (*Albizzia lebbek* L.), aporosa (*Aporosa chinensis* Champ.), ceiba (*Bombax malabaricum* L.), castanea (*Castanopsis fissa* Champ.), árbol del ámbar (*Liquidambar formosana* Hance), laurelito (*Litsea glutinosa* Lour.), aguacate (*Persea breviflora* Benth.), pino ellioti (*Pinus elliotii* Engelm.) y boj cepillo (*Lophostemon confertus* R.Br.). En un RESA a distancia de 5 m entre sí se colocaron muestreadores de biogás a 30 cm de profundidad, para determinar sitios con alta y baja emisión de acuerdo con la concentración de CH₄, en los baja con un máximo del 10% (V/V); en cada sitio trasplantaron 10 plántulas de un año y medio de edad, cada mes durante un año se midieron las variables respuesta: altura, diámetro basal, número y tamaño de hojas, además de porcentaje de cobertura.

Los resultados señalaron que en sitios con baja emisión en 7 especies vegetales no hubo mortalidad, pero si en aguacate y castanea que fue del 60%, en tanto en áreas con alta emisión, hubo menor crecimiento de la parte aérea y disminución de la cobertura, con una mortalidad de plántulas en la mayoría de las especies superior al 10%, excepto en el caso de: la aporosa, la castanea, el árbol del ámbar, el laurelito y el aguacate con un 50%. En la acacia y acacia de Constantinopla no hubo inhibición del crecimiento. En los sitios con alta emisión de biogás se determinó la composición máxima de gases: CH₄ en 41%, CO₂ en 39% y O₂ en 16.3%, mientras que en los de baja: CH₄ del 10%, CO₂ del 4.7% y O₂ del 20.3%. Concluyeron que en los sitios de mayor concentración de biogás hubo una mayor inhibición del crecimiento de las plantas leñosas subtropicales, aunque algunas especies fueron menos sensibles.

L



as concentración de biogás a la que estuvieron expuestas las plantas varió entre los diferentes sitios de nuestros y en los que se consideraron de alta emisión el nivel de O_2 era alto, mientras que la literatura considera que el suelo del RESA tiene condiciones anóxicas durante un periodo prolongado.

Este trabajo *in situ* es una importante aproximación para conocer el efecto del biogás de RESA en el crecimiento vegetal porque se busco correlacionar el efecto de distintas concentraciones de biogás, del que se caracterizó sus componentes con la inhibición del crecimiento y supervivencia de distintas especies arbóreas. Sin embargo se requiere un modelo de investigación *ex situ* que reduzca el número de variables involucradas en la DA de la FO en un RESA y permita determinar el impacto del biogás en función de la concentración de biogás.



3. JUSTIFICACIÓN

El biogás en los RESA se ha relacionado como la principal causa de la pérdida de la vegetación y como un factor que dificulta su reforestación una vez que estos sitios son clausurados, sin embargo, no existe una metodología para analizar, ni información suficiente sobre el efecto del biogás en el crecimiento vegetal. Por ello es necesario diseñar un modelo experimental que simule la difusión directa del biogás producto de la DA de la FO de los RSU sobre el sistema radical vegetal para establecer el efecto en función de la concentración en el sitio y tiempo de exposición.

4. HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo fue que exponer las raíces de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) al flujo de biogás tiene un efecto negativo sobre su crecimiento en función de la concentración y tiempo de exposición.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar el efecto del biogás sobre las raíces de calabaza mediante el diseño de un modelo experimental *ex situ*.

5.2. Objetivos particulares

1. Diseñar y construir un sistema para evaluar el efecto de biogás sobre las raíces de calabaza.
2. Analizar cualitativa y cuantitativamente el biogás derivado de la DA.
3. Analizar la respuesta en el crecimiento de la calabaza al exponer las raíces al biogás producto de la DA en la etapa temprana del ciclo biológico.



6. PLANEACIÓN DEL PROYECTO EXPERIMENTAL

Etapa I. Construcción de sistemas productores de biogás

Actividad 1. Montaje de RDASS

Actividad 2: Alimentación de RDASS

Etapa II. Construcción de sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal.

Actividad 1. Operación de RDASS para lograr metanogénesis en estado estable

Actividad 2. Estandarización de la medición del flujo de biogás

Actividad 3. Medición de concentración de CH₄ en biogás: puntos estratégicos

Actividad 4. Estandarización de la textura de suelo

Actividad 5. Estandarización del volumen de riego

Actividad 6. Acoplamiento del sistema de difusión de biogás

Etapa III. Manejo y operación del sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal.

Actividad 1. Preparación de la semilla

Actividad 2. Monitoreo de crecimiento de calabaza

Etapa IV. Recopilación y análisis de datos

Actividad 1. Recopilación de datos y análisis estadísticos

Actividad 2. Escritura de tesis

Actividad 3. Presentación en congresos



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Construcción de sistemas productores de biogás

7.1.1. Montaje del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido

Para la producción artificial de biogás que simuló al generado en un RESA se construyeron RDASS: en un frasco de vidrio de 2 L con 350 g de excreta fresca de vaca, 350 mL de la fase acuosa de lodos biológicos metanogénicos de la planta de tratamiento de agua residual de la ciudad de Quiroga, Michoacán México, filtrados en malla de 2 mm, 350 g de suelo con materia orgánica, 3 g de carbonato de sodio (NaCO_3 , Baker) y 3 g de sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, Meyer) que se mezclaron manualmente hasta homogeneizar.

7.1.2. Alimentación de reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido

Para la alimentar los RDASS se preparó una mezcla 60% (m/m) residuos alimenticios y 40% (m/m) papel bond, enriquecida con lodos biológicos metanogénicos en proporción 59:1 (Poggi et al., 1997), éstos se deshidrataron en horno a $105^\circ\text{C}/24$ h y posteriormente se trituraron en un molino de martillos para rastrojo con criba de 4 mm, hasta obtener granulo fino y se guardó en un lugar seco.

7.1.3. Seguimiento del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido

Los RDASS se cerraron herméticamente, se colocaron en cámaras de incubación a temperatura mesofílica de 35°C , se alimentaron cada 5 días con 21 g de la mezcla de residuos orgánicos y 39 mL de H_2O . Para conocer su eficiencia en la conversión de la FO en biogás se determinó el contenido de humedad, sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV) y pH, para ello se tomó ~15 g de muestra al momento de la alimentación (Figura 1, Sección 13.1.1 y 13.1.2).

7.2. Construcción de sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal

7.2.1. Estandarización de la medición de flujo de biogás

Se armó el sistema de medición de biogás (SMB) con dos frascos de vidrio de 4 L graduados con escala de 50 mL. Se llenó uno de ellos con 3.5 L de solución de salmuera (200 g NaCl/L). Se cerraron herméticamente con un tapón de hule provisto de 3 salidas: la que recibió el biogás del RDASS; la que lo llevó a la unidad de



crecimiento vegetal (UCV) y la que conduce la solución salina al frasco vecino, de tal forma que el volumen de biogás se determinó indirectamente por la cantidad de salmuera desplazada. El SMB tiene un sistema de llaves en las mangueras que permitió o impidió el paso del flujo de tal forma que los frascos se alternaron para recibir el biogás del RDASS o enviarlo a la UCV (Figura 2).

Se analizó si la acidez en pH 4 o alcalinidad en pH 10 de la solución de salmuera influyó en la concentración del CH_4 y el CO_2 producidos en el RDASS. Para ello se realizó un muestreo de biogás generado en el RDASS y del almacenado luego de su paso por el SMB cada 2 días durante 2 semanas.

7.2.2. Sistema para la difusión de biogás en las raíces

Para la difusión del biogás de los RDASS en las raíces se construyó la unidad de crecimiento vegetal (UCV), para ello se utilizó un cilindro de polietileno (PET) de 40 cm de altura x 11 cm de diámetro, la entrada inferior y superior tuvo un diámetro de 2.5 cm al que se adaptó un tapón de hule con un tubo de vidrio incrustado. En su interior contuvo 2 kg peso seco del sustrato de crecimiento de la planta, el cual fue retenido en la parte inferior con una capa delgada de algodón.

7.2.3. Análisis cualitativo y cuantitativo del biogás

Para registrar la cantidad del biogás y sus componentes se adaptaron sitios de muestreo con un tapón suba-seal #13 (Sigma-Aldrich) en el RDASS y después de su paso por el SMB. Para colectarlo se usó una jeringa de 5 mL y después se almacenó en tubo para centrifuga de 15 mL con 10 mL de solución de salmuera acidificada al que se le realizó previamente vacío. Posteriormente se analizó el contenido de CH_4 en el cromatógrafo de gases (CG) Varian CP-3800 (Figura 3a, Sección 13.1.4). Se realizaron las siguientes pruebas:

- 1. Estabilización de la producción de biogás:** Se determinó el volumen y composición del biogás generado por el RDASS durante 45 días. Para ello se alimentó cada 5 días, el volumen de biogás desplazado en el SMB se monitoreó diariamente y se tomó muestra de biogás cada 2 días para determinar contenido de CH_4 .



- 2. Producción de biogás en corto plazo:** Se determinó el volumen y composición del biogás generado por el RDASS en un lapso de 24 h. Se monitoreó el SMB cada hora y se tomó muestra del biogás cada 2 h a partir de la alimentación.
- 3. Difusión de biogás en el suelo:** Se probó si el biogás que se difunde en el suelo artificial de la UCV mantiene una composición similar a la del RDASS, para ello se adaptó al cuello de la UCV una bolsa a la que se le fijó un septo para el muestreo del biogás (Figura 3b). Se probaron 2 condiciones de humedad: suelo seco y a capacidad de campo.

7.3. Manejo y operación del sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal.

7.3.1. Preparación de la semilla

Antes de sembrar las semillas de calabaza se realizó asepsia superficial con solución de 2.5 g/L de hipoclorito de sodio al 5 % (V/V) por 5 min y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. Se mantuvieron en una cámara a 25° C con ciclo 16/8 h luz/oscuridad mediante 2 lámparas fluorescentes de 40W, 4300 Lumen (Philips) a un metro de altura. Se realizó riego manual de la plántula de calabaza con solución nutritiva (Sánchez-Yañez, 2007), macronutrientes a pH 6.5: NH_4NO_3 10 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, NaCl 0.1 g/L, CaCl_2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L, micronutrientes a pH 6.8: H_3BO_3 0.00286 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00022 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0001 g/L (J.T.Baker).

7.3.2. Estandarización de la textura de suelo artificial y volumen de riego

Se probaron dos sustratos de crecimiento el primero consistió en una mezcla de suelo artificial formado por arena 50%, arcilla 20%, y limo 30% (m/m). Cada uno de los suelos se secó al sol en 2 ocasiones durante 5 h dejando un día de reposo entre ambos procesos para secar y eliminar los microorganismos patógenos. Posteriormente se pesaron las proporciones y se hizo la mezcla manualmente.

Para determinar el volumen de agua de riego se determinó la capacidad de campo del suelo (sección 13.1.3) y se mantuvo constante mediante la irrigación manual y toma de peso de la UCV.



7.3.3. Acoplamiento del sistema de difusión de biogás

Se armaron los componentes del sistema de difusión de biogás en la raíz vegetal: RDASS, SMB y UCV (Figura 4). Para determinar el efecto desfavorable del biogás en el crecimiento de plántulas de calabaza se utilizó solución de salmuera acidificada y el suelo a capacidad de campo regado con agua destilada y cada 10 días con solución nutritiva. Se tuvieron 2 grupos de RDASS en diferente estado en el proceso de DA, los de mayor producción de biogás se denominaron de “alta concentración” y los de menor de “baja concentración” y se monitorearon a lo largo del experimento. Durante el crecimiento de la plántula de calabaza se realizó un seguimiento diario del SMB y cada 2 días del contenido de CH₄ en el biogás.

7.3.4. Monitoreo de crecimiento de la calabaza

Se registró el efecto del biogás sobre el crecimiento de calabaza durante la etapa temprana de su ciclo de vida: germinación y plántula. Las variables-respuesta usadas fueron: porcentaje de germinación, peso fresco y seco de la parte radical y aérea de plantas a los 5, 15 y 30 días posteriores a la germinación; se midieron las variables de crecimiento: altura de la planta, número y longitud de hojas, longitud de raíz.

7.4. Análisis estadístico

Se analizaron los datos obtenidos estadísticamente para establecer con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia entre las medias de las variables respuesta porcentaje de germinación, peso fresco y seco de la parte radical y aérea de plántulas de calabaza de 5, 15 y 30 días expuestas a distintas concentraciones de biogás. Para ello se utilizó el programa de análisis estadísticos por computadora JMP 8.0.



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se probaron los 3 componentes del sistema descritos en el diseño experimental: RDASS, SMB y UCV lo que permitió estandarizar las condiciones de operación del modelo que probó si el biogás producto de la DA de la FO de los RSU tenía un efecto sobre el crecimiento del sistema radical vegetal.

8.1. Seguimiento del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido

Se determinó el volumen y composición del biogás en el periodo de prueba y estabilización de los RDASS durante 45 días. La mayor producción de biogás ocurrió en las 24 h posteriores a la alimentación del RDASS, lo que se realizó cada 5 días (Figura 5a). En promedio se generaron 1161 mL/día de biogás cuyo nivel superior fue de 3450 mL/día y el inferior de 83 mL/día (Cuadro 1). En los primeros 10 días la generación de biogás fue baja y la concentración de CH₄ menor del 50% (V/V), entre los días 10 al 45 se estabilizó el contenido de CH₄ que fluctuó del 52.41 al 76.31% en el biogás, la media fue de 53.88% durante el experimento (Figura 5b).

Para conocer la eficiencia de la conversión de la FO en biogás se determinó la humedad, los ST, los STV y el pH de la mezcla usada como inóculo de los RDASS detectados cada 5 días (Figura 6). El % de humedad aumentó en promedio de 64.57 a 72.57% (m/m), los ST disminuyeron de 35.42 a 27.42% (m/m), los STV fueron estables de 21.12 a 24.88% (m/m) y el pH fluctuó entre 8.11 y 9.46, un promedio de 8.73 durante los 45 días de experimento (Cuadro 2b).

Se realizó un análisis estadístico de regresión a partir de la producción acumulada de biogás, la que mostró una dinámica lineal a largo plazo, con un valor de regresión (R) de 96.75%, por lo que en el periodo entre cada alimentación de los RDASS la generación del biogás fue constante desde el día 15 de registro, con un promedio total de 53.38 L/45 días (Figura 7).

El modelo experimental logró normalizar la producción de biogás y tener un flujo continuo, para probar su efecto en la germinación de la semilla y el crecimiento vegetal de la calabaza a nivel de sus raíces. Los RDASS registraron valores de pH de 8-9 y STV de 25-30% (m/m), ligeramente superior a los resultados reportados como favorables en la literatura para la metalogénesis.



En experimentos previos Flores *et al.*, 2006; Baltierra *et al.*, 2007 mantuvieron RDASS por 6 meses con alimentación continua, con valores de pH 6-8 y de STV cercanos a 25% (m/m). La disminución de la alcalinidad, de los STV y del contenido de CH₄ fueron indicativos de que los reactores estaban en proceso de decadencia (Gerardi, 2003).

8.2. Estandarización de la medición del flujo de biogás

Se probó el funcionamiento del SMB bajo 2 con una solución de salmuera ácida a pH 4 y con otra alcalina a pH 10 con lo que se determinó si hubo un cambio en la concentración del CH₄ en el biogás, generado en los RDASS, después de fluir por el SMB. En función del volumen de salmuera desplazada, en la alcalina hubo un aumento en la cantidad de CH₄ en el biogás (Figura 8), que fue estadísticamente significativa con respecto a la ácida sólo en los primeros seis días con menos de 7167mL de biogás, este incremento fue en promedio 71.31 a 84.44 de CH₄ (V/V), pero la tendencia no se mantuvo y desde el día 8 fue similar en los 2 puntos de muestreo antes del SMB 55.26 y después de fluir por el SMB de 58.11%. La salmuera ácida la no alteró la concentración de CH₄ en el biogás (Cuadro 3). En el día 15 se midió el pH de ambas salmueras en los SMB, en la ácida subió levemente a 4.8 y en la alcalina disminuyó hasta 5.6.

El SMB se realizó a partir de la técnica de medición de biogás descrita por Poggi *et al.* (1997), en la que flujo del biogás fue posible sólo en una dirección y al pasar por la solución de salmuera los frascos eran vaciados y llenados (Figura 2a), mientras que en el modelo planteado en este trabajo, las llaves permitieron alternar la dirección del flujo de biogás y salmuera entre los frascos del SMB, con presión constante y libre de O₂ (Figura 2 b y c).

De acuerdo con Muñoz *et al.* (2008) la alcalinidad de una solución salina favorece la disolución del CO₂ para formar H₂CO₃, sin embargo en el modelo experimental se observó que esta reacción química es limitada y se evitó en salmuera ácida. Este conocimiento es útil si se prueba el efecto del CH₄ producto de la DA de la FO de los RSU, aunque es necesario diseñar un sistema para mantener el pH alcalino favorable para la disolución del CO₂ a largo plazo.



8.3. Producción de biogás en corto plazo

Se caracterizó el volumen y composición del biogás producido en un lapso de 24 h a partir de la alimentación del RDASS (Figura 9). Se registraron 2 picos en la generación de biogás entre la hora 1 y 5 con 425 y 375 mL respectivamente, el que se estabilizó a las 16 h con 100-175 mL/h. En cuanto a su composición química la concentración de CH₄ en el primer pico fue menor al 10% (V/V) y en el segundo se estabilizó entre 53.89 y 65.67%. De los 3550 mL de biogás, la mitad se generó de la h 1 a la 8 con una concentración de CH₄ menor al 50% (Cuadro 4).

La generación de biogás en el RDASS en corto plazo mostró una dinámica similar al descrito para la DA de la FO de los RSU en un RESA (Tchobanoglus, 2005). Inicialmente hubo un elevado volumen de biogás con una concentración de CH₄ menor al 10% (V/V) relacionada con la fase inicial de ajuste; seguido de un ligera disminución de la actividad microbiana, con la de transición; hubo un segundo aumento en la producción con un 30-40% de CH₄, como en la fase ácida y finalmente la estabilización del reactor con un 50-60% de CH₄ en el biogás con la fase metanogénica que se mantuvo durante 4-5 días y continuó al realimentar el RDASS.

El CO₂ fue el segundo componente principal del biogás al que de acuerdo a los resultados se estimó en concentración de 60-90% (V/V) en las 8 h posteriores a la alimentación, por lo que es necesario investigar el efecto de los principales componentes del biogás por separado en la germinación y en el crecimiento vegetal.

8.4. Difusión de biogás en suelo artificial

Se analizó si el biogás generado en el RDASS fluyó a lo largo del sistema y mantuvo su composición al difundir por el sustrato de la UCV a dos condiciones de humedad: en suelo seco y capacidad de campo.

En suelo seco el RDASS no se detectó disminución estadísticamente significativa en la concentración de CH₄, que en promedio fue de 63.86% (V/V) en el RDASS y de 57.98% en la UCV. En el suelo con humedad capacidad de campo el biogás disminuyó a 46.66% en la UCV (Figura 10, Cuadro 5).



El análisis estadístico indica que solo hubo diferencia en la concentración del metano en el biogás de los RDASS comparado con el de la UCV independientemente del tipo de condición en el suelo o de la interacción.

En suelo de cobertura de los RESA existen diferentes niveles de hipoxia o incluso anoxia, el cual depende de la relación de sus 3 componentes gaseosos principales: CH₄, CO₂ y O₂, mientras que su capacidad contaminante dependerá de la textura y el estado hídrico del sustrato (Marchiol *et al.*, 1999).

El diseño de la UCV permitió medir una concentración alta de CH₄ similar a la reportada en los respiraderos de un RESA, en promedio de ~ 60% en suelo seco mientras que con humedad a capacidad de campo fue de un ~45%. Esta última condición representó una barrera física para el flujo del biogás generado en el RDASS, por lo que el flujo del biogás podría variar al cambiar las condiciones de textura o contenido de humedad del sustrato de crecimiento vegetal.

8.5. Seguimiento del sistema durante la difusión de biogás en la raíz vegetal

Evaluados los componentes del sistema de difusión de biogás se ensamblaron y se analizó su efecto sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de calabaza.

Los RDASS se dividieron en 2 grupos de acuerdo a la dinámica de la DA de la FO de los RSU que mostraron durante el experimento: los de alta concentración con un promedio de 79.27 L/mes y 58.90% de CH₄ (V/V) y los de baja concentración con un promedio de 46.98 L/mes y 49.18% de CH₄. Entre ambos hubo un comportamiento estadísticamente diferente (Figura 11, Cuadro 6).

En los RDASS se determinó la humedad, los ST, los STV y el pH de la mezcla inóculo cada 5 días durante los 35 días de experimento. Ahí la humedad aumentó en promedio de 74.62 a 76.95% (m/m), los ST disminuyeron de 25.37 a 23.04% (m/m), los STV aumentaron de 28.46 a 31.08% (m/m) y el pH fluctuó levemente entre 8.39 y 8.91, un promedio de 8.8 durante los 30 días de exposición (Figura 12, Cuadro 7).



8.6. Respuesta de la calabaza

8.6.1. Germinación

El biogás causó inhibición de la germinación de la semilla de calabaza, las expuestas a alta concentración hubo inhibición del 100% y a baja concentración fue del 25% comparado con la germinación de la misma semilla sin exponer al biogás que fue del 0% (Figura 13, 15 y 16). La semilla expuesta a alta concentración de biogás germinó 4 días después que la semilla sembrada en el suelo sin exponer a biogás, con un porcentaje del 25%, las cuales se consideraron en la medición del crecimiento a los 15 y 30 días.

La plántula de calabaza cosechada 5 días después de la germinación expuesta a alta concentración de biogás tuvo menor biomasa en peso fresco y seco comparado con la calabaza crecida en suelo no expuesto al biogás (Cuadro 8).

La germinación de la semilla de calabaza se inhibió por la difusión de biogás, lo que indicó que esta es una etapa crítica ya que tanto las semillas como las plántulas requieren una alta presión de O_2 para activar el metabolismo de hidrólisis de almidón de reserva (Hess, 1980). Sin embargo se requiere mayor investigación para definir si el daño se debe a la anoxia o a una alteración metabólica en la cadena respiratoria provocada por los altos niveles de CO_2 o CH_4 en el biogás. En las UCV expuesta a elevada concentración de biogás se encontraron semillas con embriones que germinaron, pero murieron antes de emerger del suelo, lo cual fue una evidencia de la sensibilidad de la semilla al biogás.

8.6.2. Crecimiento de las plántulas de calabaza a los 15 días

Las plántulas de calabaza de 15 días expuestas a alta concentración de biogás mostraron menor crecimiento. En la peso fresco de la parte aérea fue en promedio de 1.4928 g y el seco de 0.1024 g comparado con la parte aérea de la plántulas de calabaza sembrada sin exponer al flujo de biogás que fue en el fresco de 3.0067 g y en el seco de 0.2079 g, mientras que en la raíz el promedio fue del peso fresco de 0.0697 g y del seco de 0.0104 g menor al registrado en la calabaza sin exponer a biogás con un fresco radical de 0.2296 g y un seco de 0.0394 g. La calabaza expuesta a baja concentración mostró un crecimiento ligeramente menor y sin diferencia comparado con



la calabaza que creció en suelo sin exponer al biogás: la aérea tuvieron un peso fresco promedio de 2.3787 g y un seco 0.1467 g, mientras que en la raíz el fresco fue en promedio del 0.1125 g y el seco de 0.0263 g (Figura 14, Cuadro 9). Se observó un daño foliar con síntomas de clorosis y marchitez en la plántula de expuesta a elevada concentración de biogás y menor en las de baja, lo que confirma que el daño es en función de la concentración (Figura 17).

8.6.3. Crecimiento de las plántulas de calabaza a los 30 días

Las plántulas de calabaza expuestas a biogás durante 30 días mostraron inhibición de su crecimiento, a elevada concentración la parte aérea tuvo menor biomasa expresada en peso y seco comparado con el de la calabaza sembrada en suelo sin exponer a biogás. En plántulas expuestas a baja concentración la inhibición del crecimiento fue menor pero estadísticamente significativo en la parte aérea y radical comparado con la calabaza sembrada en suelo sin exponer a biogás (Cuadro 9). El daño foliar fue menor en la calabaza expuesta a concentración alta de biogás, mientras que en baja mostró un efecto similar al de la calabaza usada como control sin exponer a biogás (Figura 18).

El análisis estadístico indica que hubo diferencia en el crecimiento de las plántulas de calabaza el cuál fue en función del tiempo de exposición y de la concentración del biogás, así como de la interacción de ambos factores.

Los síntomas de estrés en las hojas como clorosis y pérdida de hojas por exposición al biogás fueron más notorios en los primeros 15 días de exposición, mientras a los 30 días disminuyó el daño foliar, lo que sugiere que las plántulas en al madurar sean menos sensibles al biogás por lo que se requiere probar en futuras investigaciones el efecto del biogás en distintas fases de crecimiento.

El CH₄ parece no ejercer un efecto tóxico directo en las plantas pero su presencia causa desplazamiento del oxígeno en el suelo (Marchiol *et al.*, 1999), lo causa reducción del potencial redox que hace disponible metales tóxicos como el hierro (Fe) y zinc (Zn) (Flower *et al.*, 1981), y además la oxidación del metano por bacterias metanotróficas puede aumentar la concentración del CO₂ (Boeckx y Van Cleemput, 1996 en Marchiol *et al.*, 1999).



La presencia de CO_2 afecta el metabolismo de las plantas e induce la producción de toxinas, lo que se ha relacionado con clorosis, abscisión de las hojas (Marchiol *et al.*, 1999). De acuerdo con Drew (1990, en Marchiol *et al.*, 1999) condiciones adversas en la atmósfera del suelo por anegamiento o anoxia del suelo podría provocar daño en el metabolismo de la raíz con un inadecuado desarrollo de la parte aérea e inhibición de la fotosíntesis.

Aunque se han realizado pocas investigaciones para determinar cómo los componentes del biogás de RESA alteran la respiración y otros aspectos del metabolismo, se han encontrado similitudes en el efecto que tiene el estrés por anegamiento, como son afectación de la conductancia estomal y la inhibición de la fotosíntesis (Gilman *et al.*, 1989 en Marchiol *et al.*, 1999).

De igual manera las adaptaciones morfológicas en especies tolerantes a inundación (hipoxia) pueden ser reproducidas al exponer las raíces al biogás, Marchiol y colaboradores (2000) trabajaron con plántulas de (*Populus deltoides*) y (*P. nigra*) que sembraron en cámaras en las que expusieron a sus raíces a un flujo de 3 % CH_4 , 12% O_2 , 12% CO_2 y 73% N_2 y adición de nitrato de amonio (NH_4NO_3), bajo la condición de hipoxia registraron hipertrofia de los lenticelas, desarrollo de raíces adventicias y formación de aerénquima; detectaron flujo de N_2O procedente de la raíz a la parte aérea producto de la oxidación biológica del NH_4NO_3 , pero bajo las condiciones experimentales no lograron demostrar un transporte interno de CH_4 , sin embargo consideraron que era posible así como de O_2 en sentido opuesto.



9. CONCLUSIONES

La investigación sobre el efecto del biogás de RESA en el crecimiento vegetal es incipiente y confusa, así es difícil comparar los resultados obtenidos en este modelo experimental con otros trabajos.

Los resultado confirman que el biogás producto de la DA de la FO de los RSU tiene un efecto negativo sobre la germinación y el crecimiento vegetal en función de la concentración y el tiempo de exposición debido al desplazamiento del O_2 por la mezcla de CH_4 y CO_2 pero aún no es posible dar una explicación precisa de cuál fue el mecanismo por el que se produce el efecto tóxico por lo que es indispensable mayor investigación para definir.

Este trabajo intenta ser un punto de partida y servir como una propuesta para estandarizar las condiciones de estudio de la exposición de raíces de plantas a diferente concentración de biogás producto de la DA de la FO de los RSU en un RESA.

10. PERSPECTIVAS

Las estandarización de las condiciones de estudio como se propone en este trabajo, permitirá además probar el efecto del biogás en las poblaciones microbianas del suelo, encontrar especies vegetales resistentes al biogás y conocer los factores que influyen en su establecimiento, así como determinar géneros sensibles para la obtención de bioindicadores de la calidad del aire del suelo en los RESA y todo esto a su vez derivar en estrategias que permitan atenuar las emisiones de CH_4 a la atmósfera.



11. VALIDACIÓN DE OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto del biogás sobre las raíces de calabaza mediante el diseño de un modelo experimental *ex situ*.

Objetivo cumplido

Objetivos particulares

1. Diseñar y construir un sistema para evaluar el efecto de biogás sobre las raíces de calabaza.

Objetivo cumplido.

2. Analizar cualitativa y cuantitativamente el biogás derivado de la DA.

Objetivo cumplido.

3. Analizar la respuesta de la calabaza al exponer las raíces al biogás producto de la DA en la etapa temprana del ciclo biológico.

Objetivo cumplido.

12. VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo fue que exponer las raíces de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) al flujo de biogás tiene un efecto negativo sobre el crecimiento en función de la concentración y tiempo de exposición.

Hipótesis validada en semillas de calabaza con inhibición de la germinación y del crecimiento radical y aéreo en plántulas de 15 y 30 días.



13. FIGURAS



Figura 1. Operación y seguimiento del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS): alimentación, muestreo de biogás y determinación de humedad, sólidos totales volátiles, pH y contenido de CH₄ en el biogás.

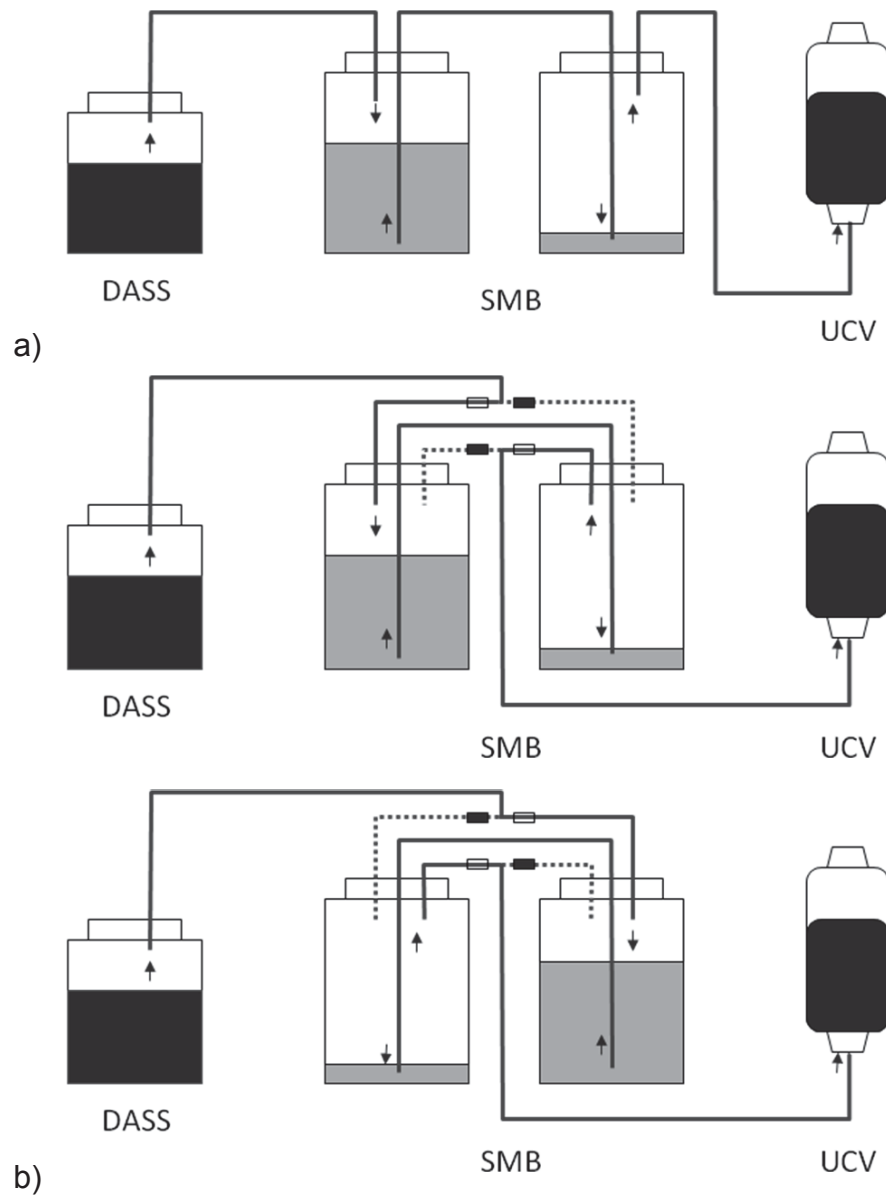
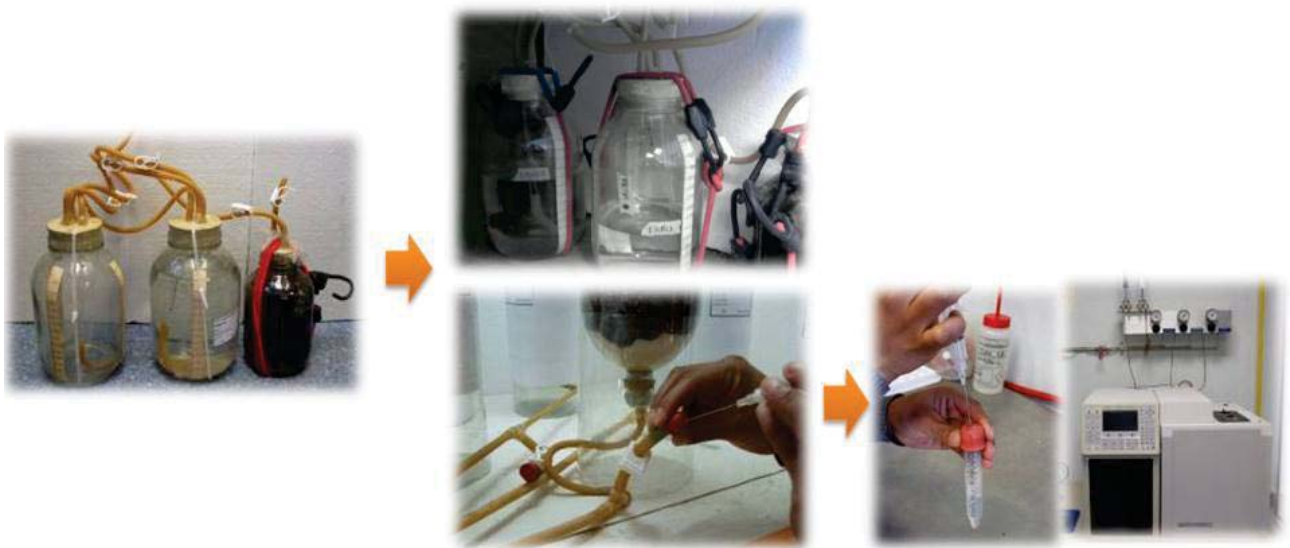


Figura 2. Esquemas del sistema de medición de biogás (SMB)

a) El modelo propuesto por Poggi *et al.* (1997). **b)** y **c)** modelo experimental con sistema de llaves para alternar la dirección del flujo de biogás.



a)



b)

Figura 3. Procedimiento de muestreo de biogás para su medición en el cromatógrafo de gases.

- a) Determinación de biogás generado en los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) después de fluir por el sistema de medición de biogás (SMB).
- b) Determinación de biogás después de fluir por el suelo de unidad de crecimiento vegetal (UCV).

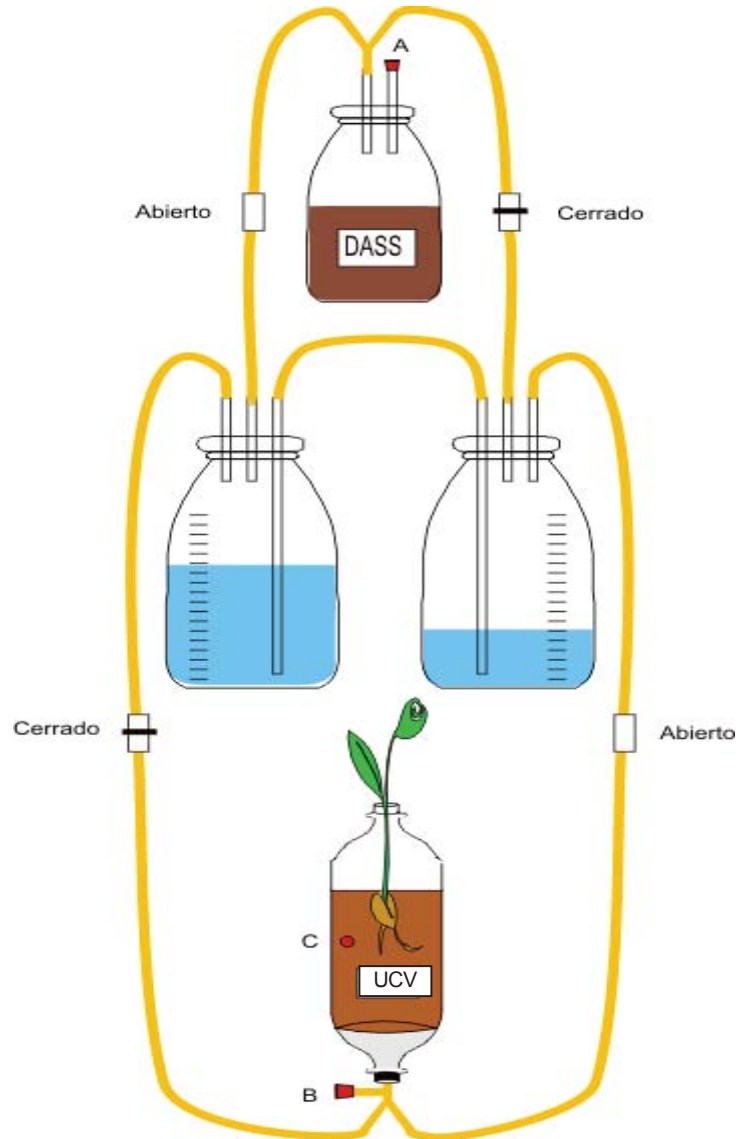
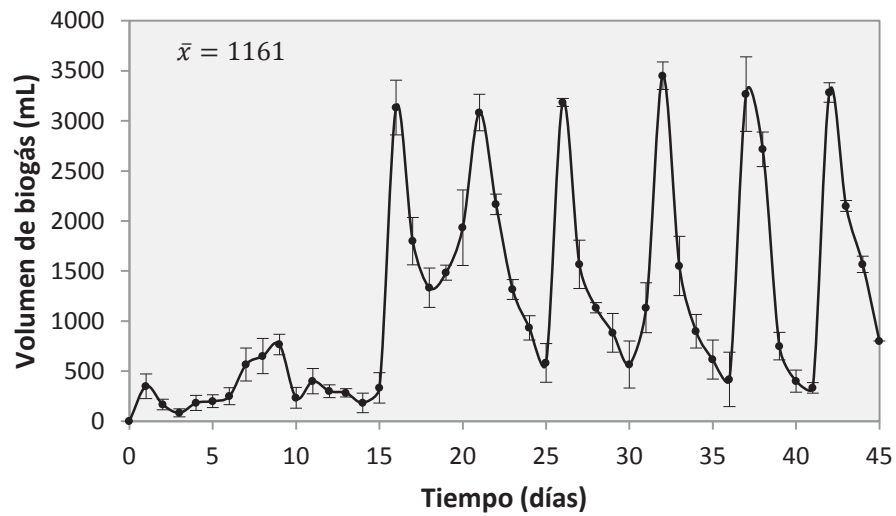
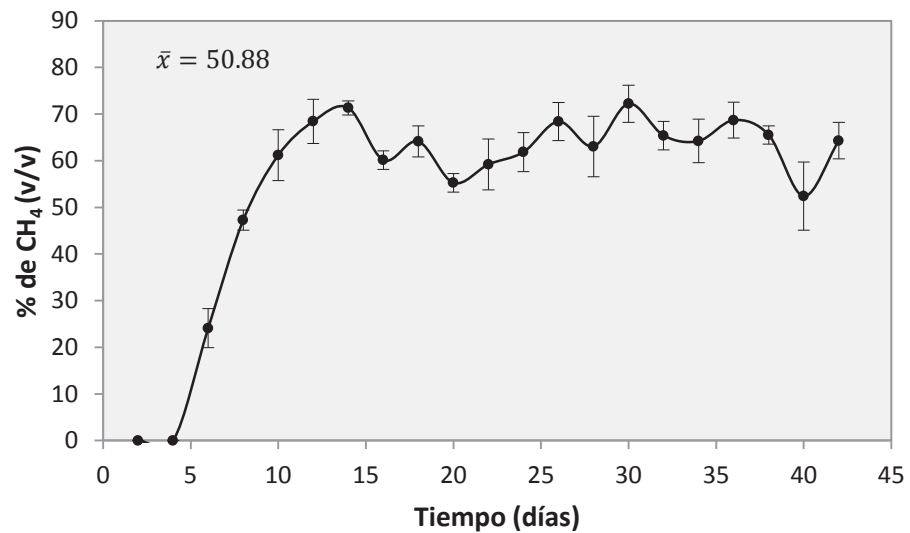


Figura 4. Reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS), conectado al sistema de medición de biogás (SMB) y a la unidad de crecimiento vegetal (UCV). Las letras indican los puntos de muestreo de biogás: A) RDASS, B) SMB, C) UCV.

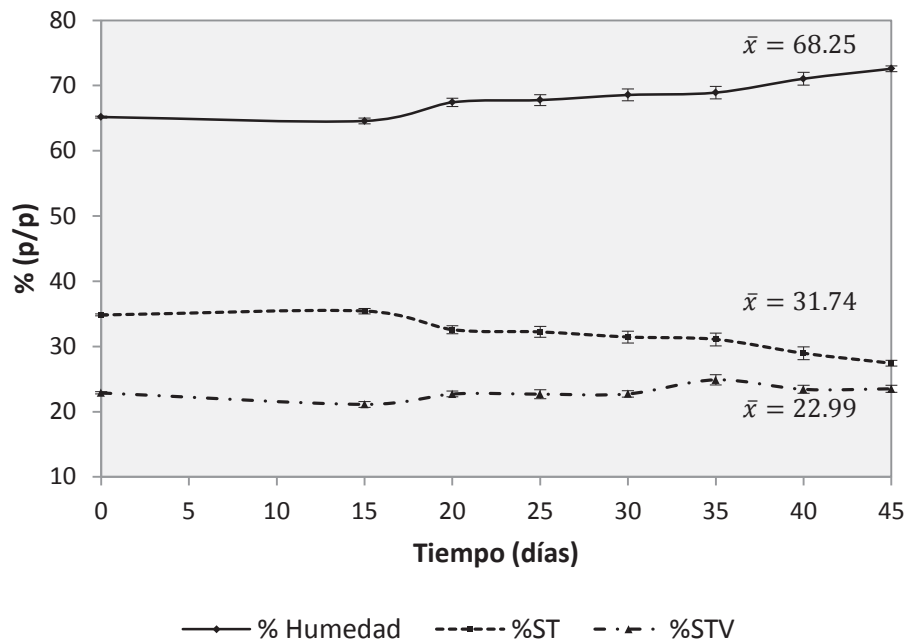


a)

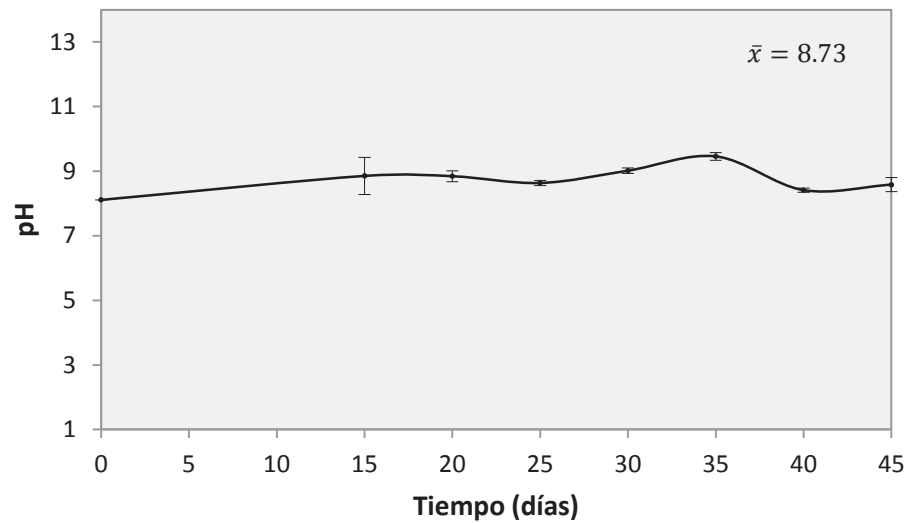


b)

Figura 5. Dinámica de la producción de biogás en los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido RDASS durante de 45 días a 35° C con alimentación cada 5 días. **a)** Volumen generado de biogás. **b)** Composición de CH_4 en el biogás.



a)



b)

Figura 6. Dinámica de la conversión de la fracción orgánica durante la estabilización de los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido RDASS a 35° C y alimentación cada 5. Parámetros: a) % humedad, % sólidos totales (ST), % sólidos totales volátiles (STV), b) Dinámica del pH de la mezcla inóculo. (%)= por ciento

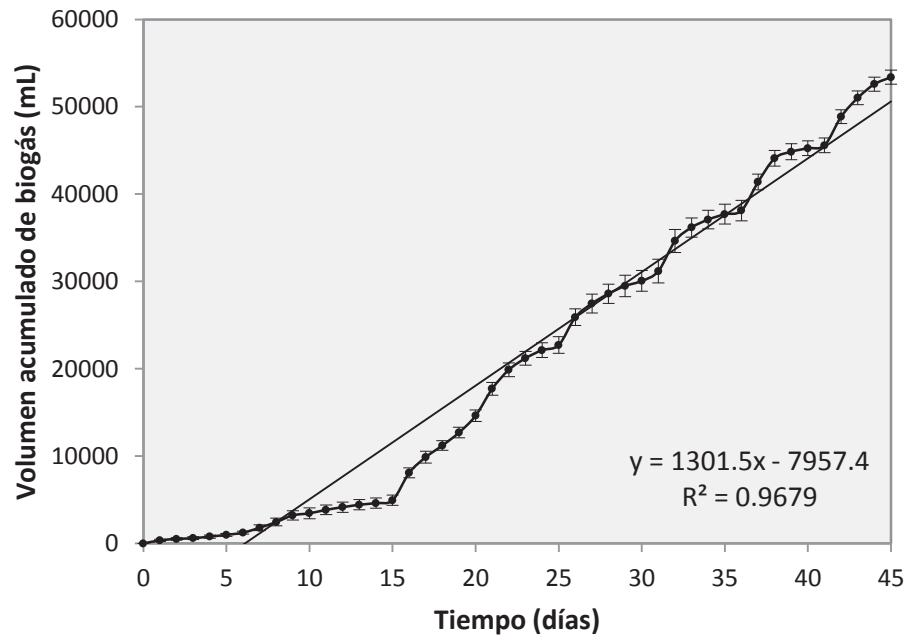


Figura 7. Dinámica de la producción acumulada de biogás en los reactores de digestión anaerobia en 45 días a 35° C con alimentación cada 5 días.

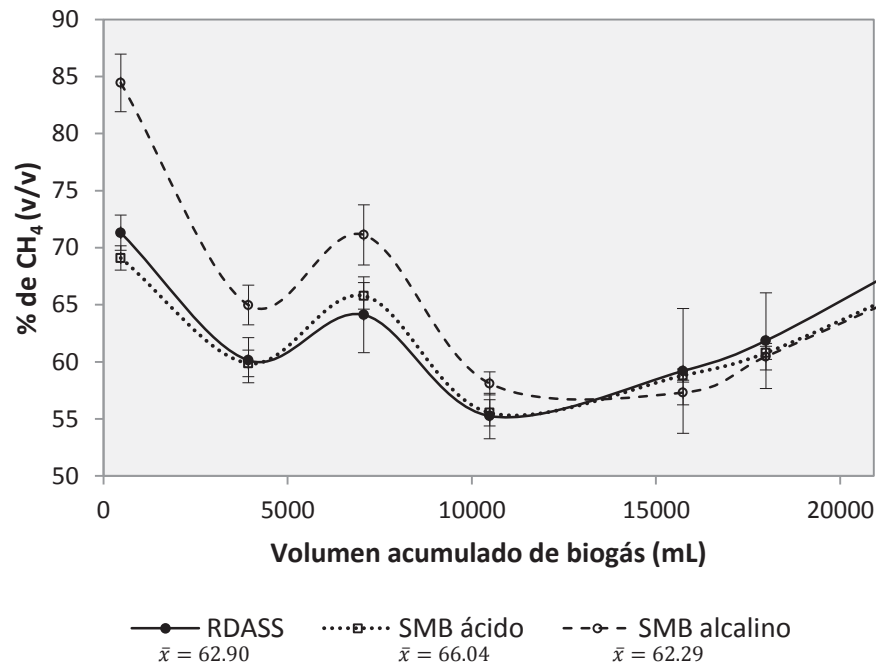
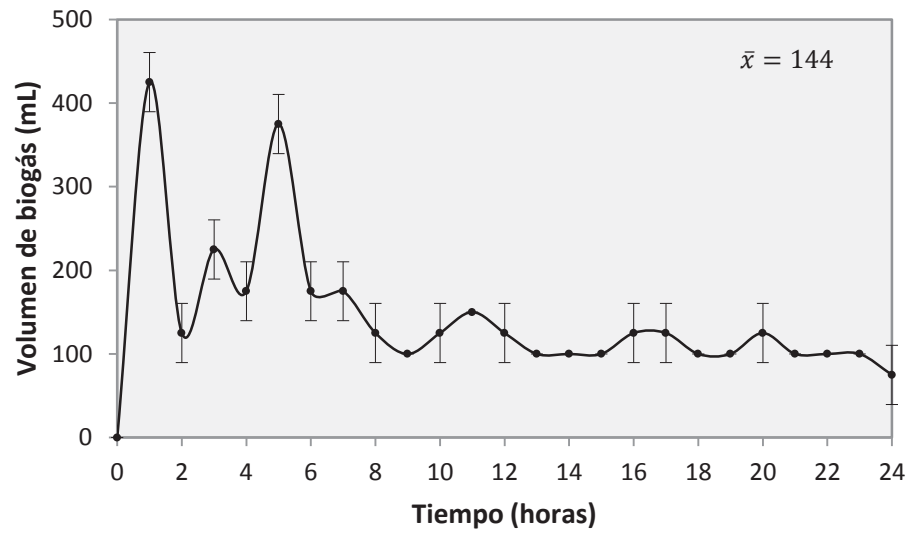
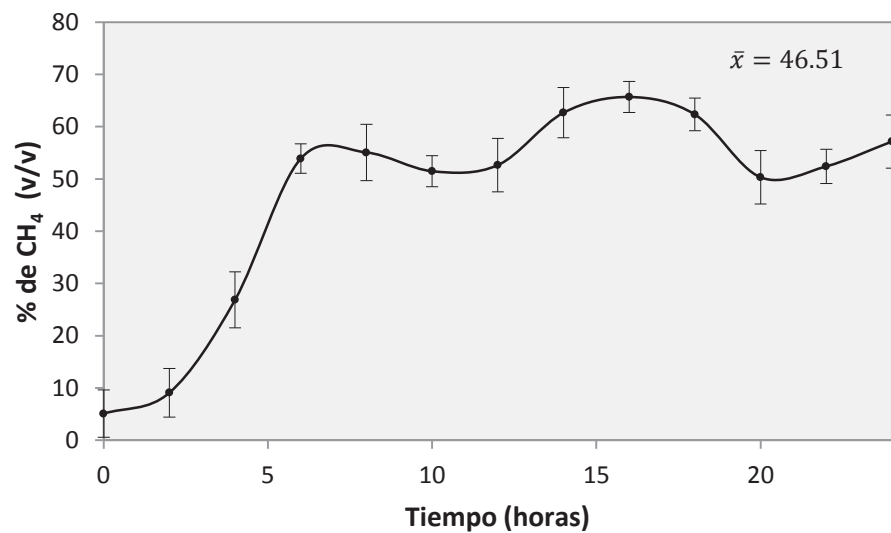


Figura 8. Contenido de CH₄ monitoreado en el reactor de digestión anaerobia (RDASS), sistema de medición de biogás (SMB) con solución de salmuera ácida y alcalina en función del volumen acumulado de biogás durante 15 días.



a)



b)

Figura 9. Dinámica de la degradación anaerobia de la fracción orgánica en los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido RDASS en las 24 h posteriores a su alimentación a 35° C. **a)** Volumen de biogás y **b)** % de CH₄ en el biogás.

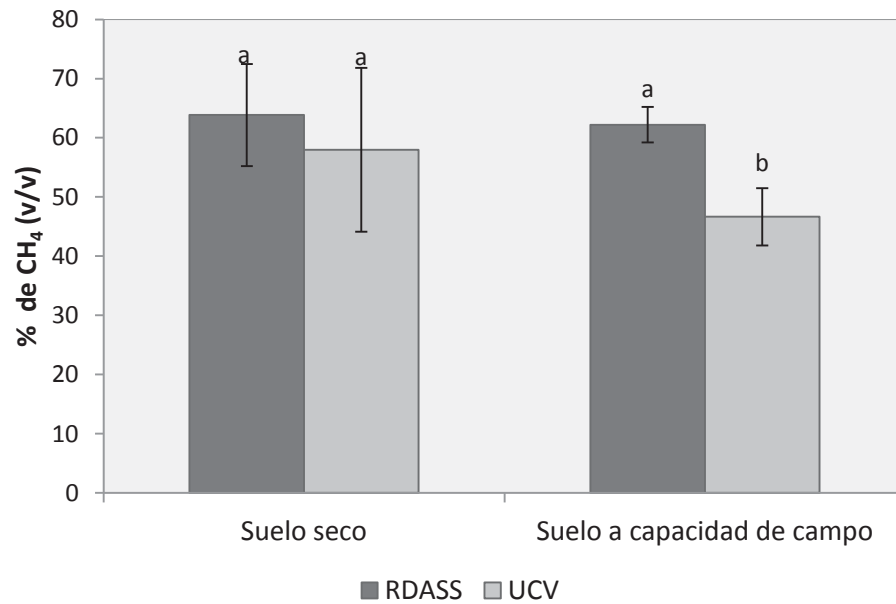


Figura 10. Composición de biogás en el reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido RDASS y la unidad de crecimiento vegetal UCV a diferente humedad: suelo seco y a capacidad de campo.

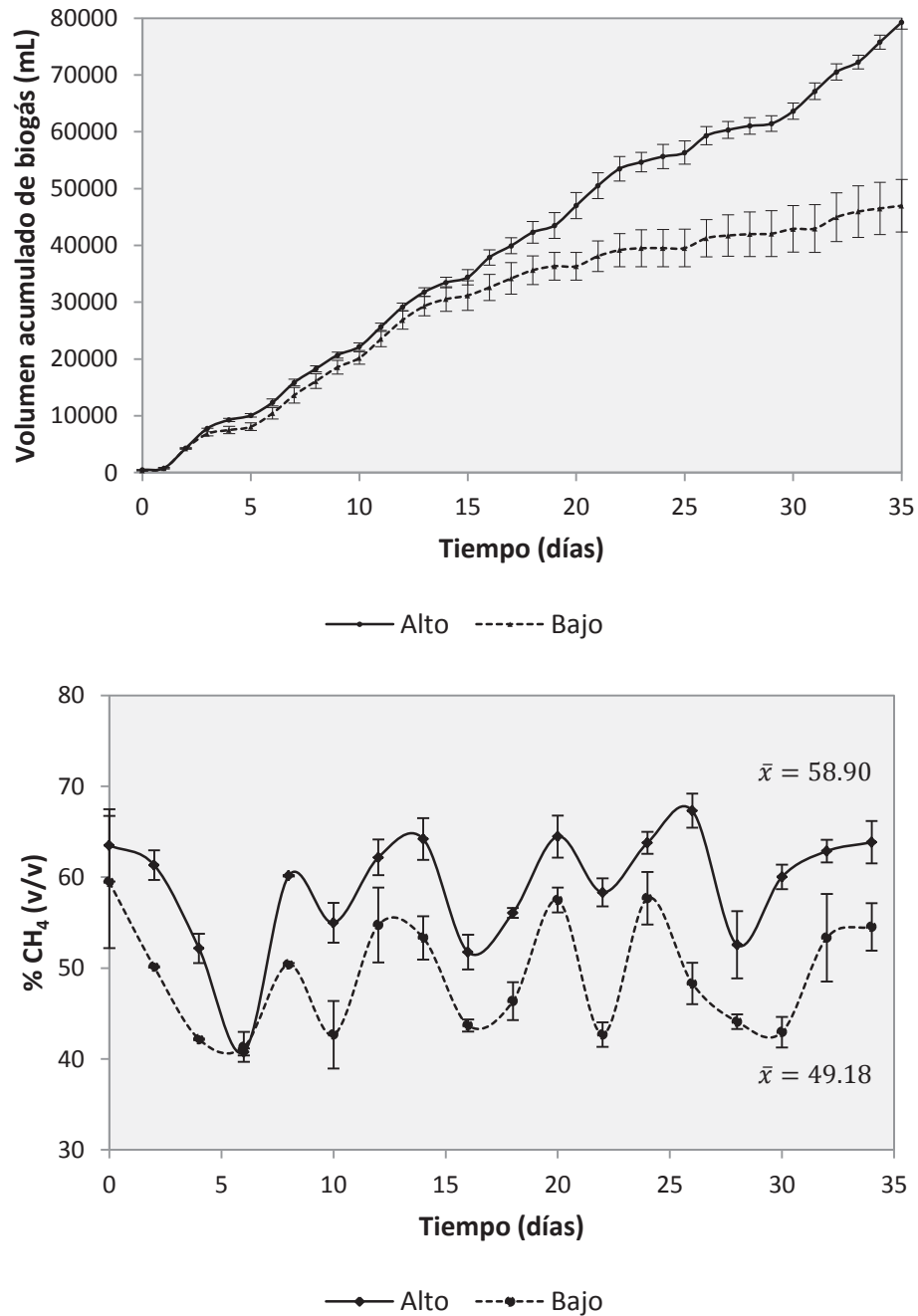
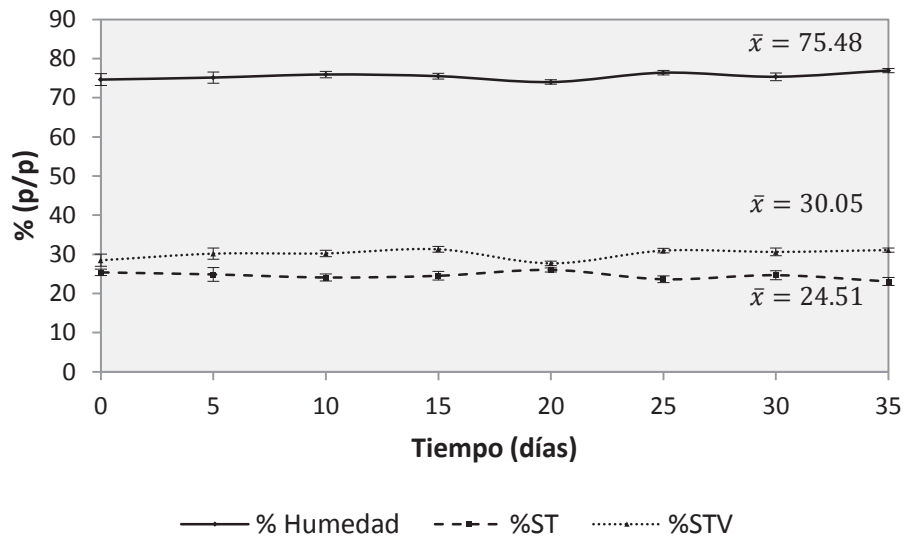
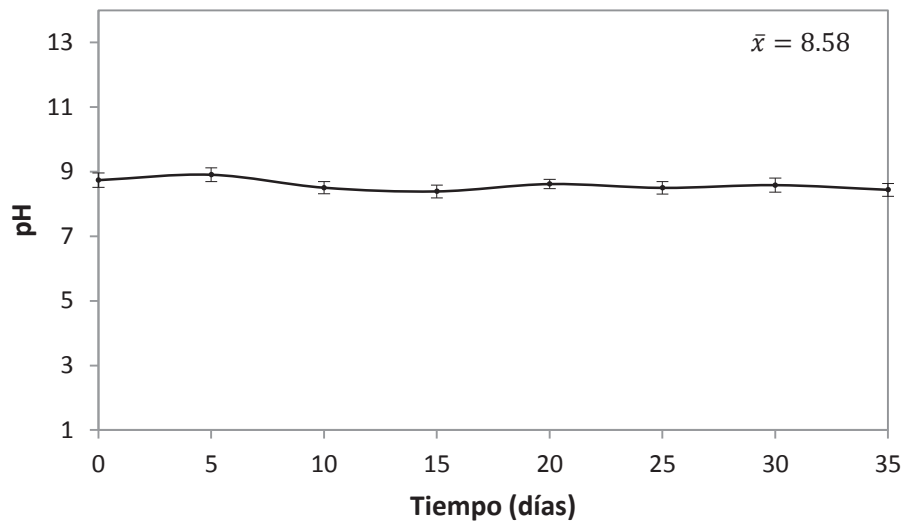


Figura 11. Dinámica de la producción de biogás en reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) a alta y baja concentración, a 35° C y alimentación cada 5 días durante la difusión en el sustrato de crecimiento de la calabaza. **a)** Volumen acumulado de biogás. **b)** Composición de CH₄ en el biogás.



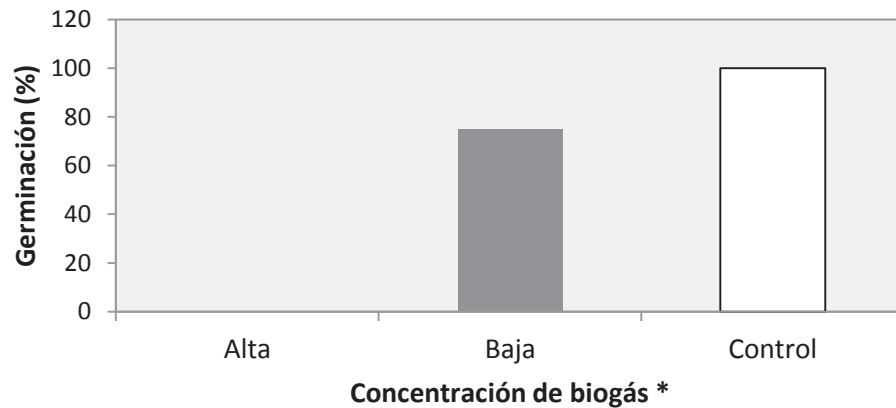
a)



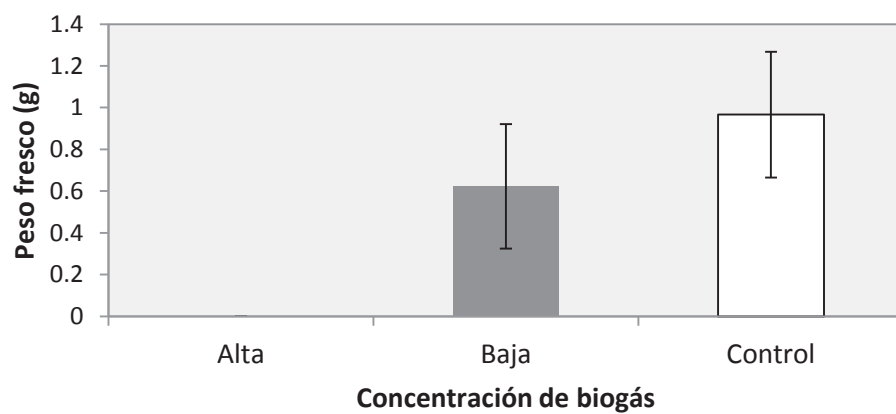
b)

Figura 12. Dinámica de la conversión de la fracción orgánica en reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) a 35° C y alimentación cada 5 días durante la difusión de biogás en el sustrato de crecimiento de la calabaza.

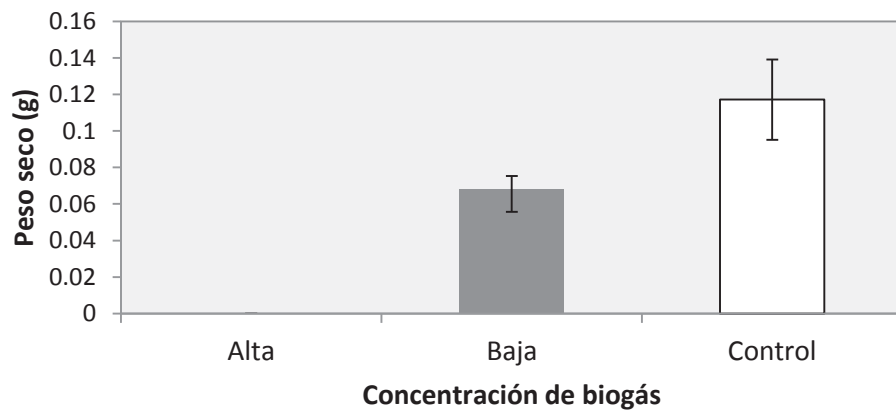
Parámetros a) %humedad, % sólidos totales (ST), % sólidos totales volátiles (STV), b) Dinámica del pH de la mezcla inóculo del RDASS. (%) = por ciento.



a)



b)



c)

Figura 13. Efecto del biogás en la germinación de calabaza expuestas a concentración de biogás: alta (80 L/mes, CH₄ 58.9%) y baja (45 L/mes, CH₄ 49.18%). **a)** Porcentaje de germinación (*La germinación en alta ocurrió 4 días después que en la de baja y la control) **b)** Promedio peso fresco de plántulas de 5 días, **c)** Promedio peso seco.

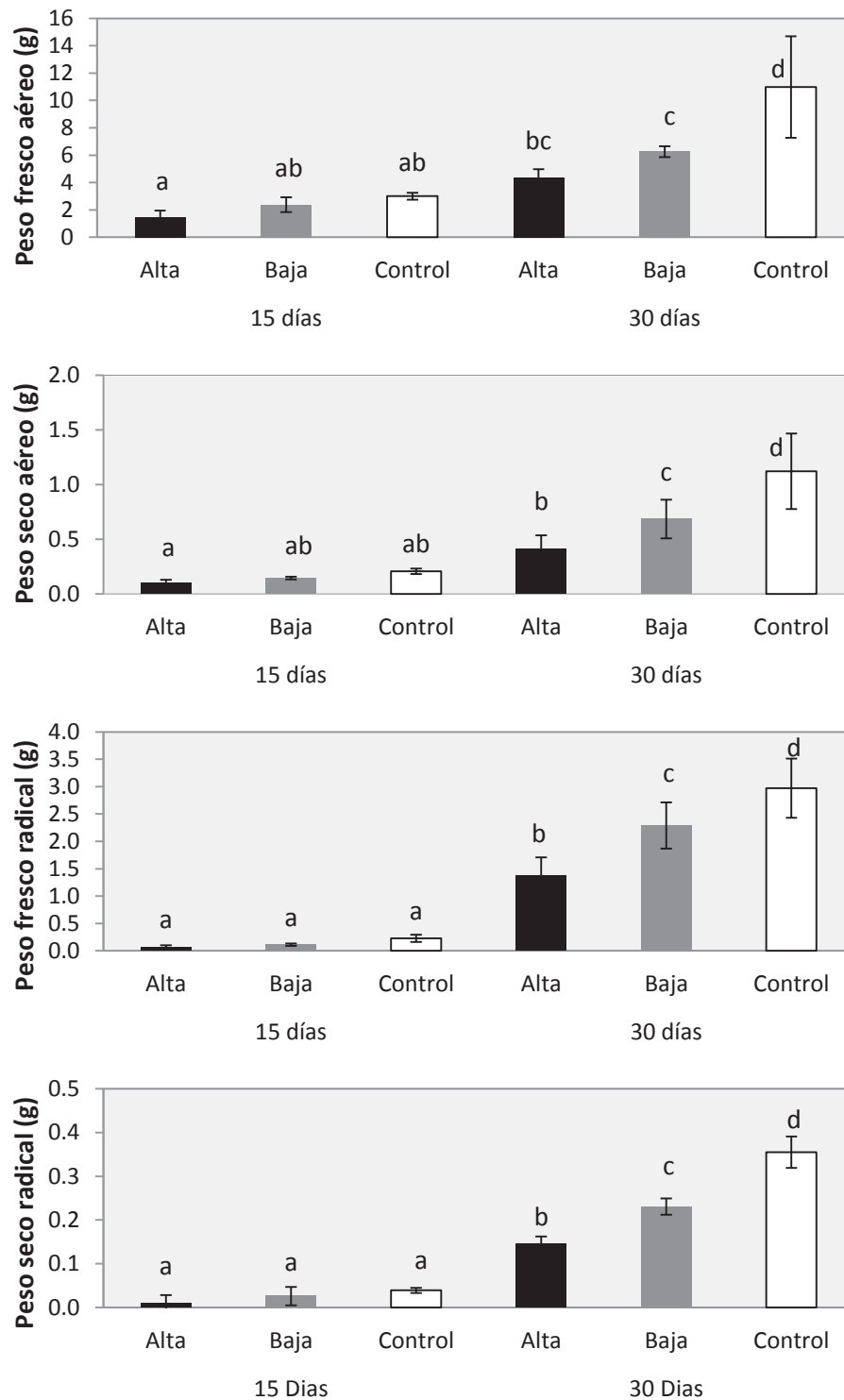


Figura 14. Promedio del peso seco y fresco de la parte aérea y radical de plántulas de calabaza a los 15 y 30 días de crecimiento sometidas a alta concentración (80 L/mes, CH₄ 58.9%) y baja (45 L/mes, CH₄ 49.18%) de biogás generado en los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS).

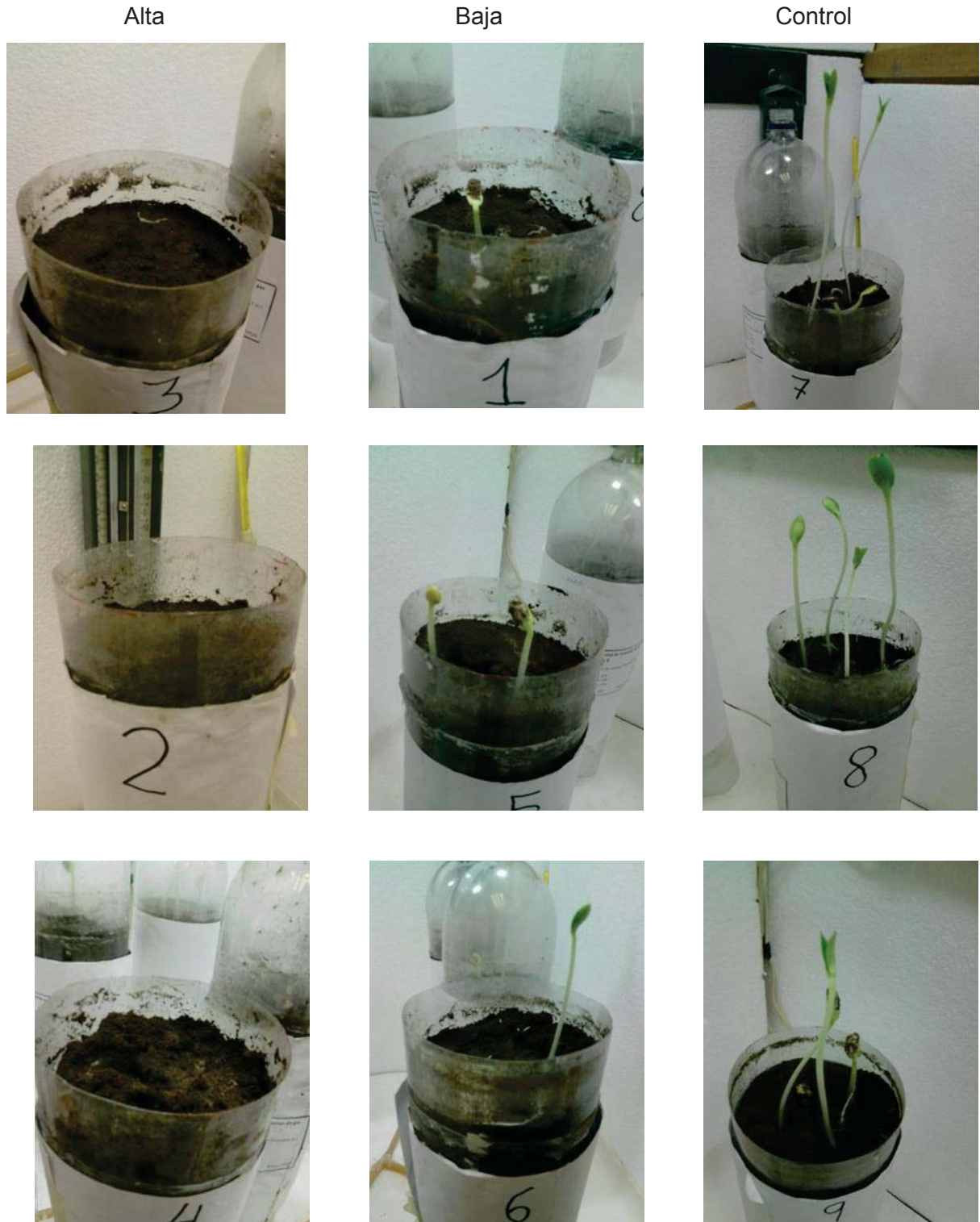


Figura 15. Efecto del biogás en la germinación (día 4). De izquierda a derecha: alta concentración alta, baja, control sin exposición a biogás.

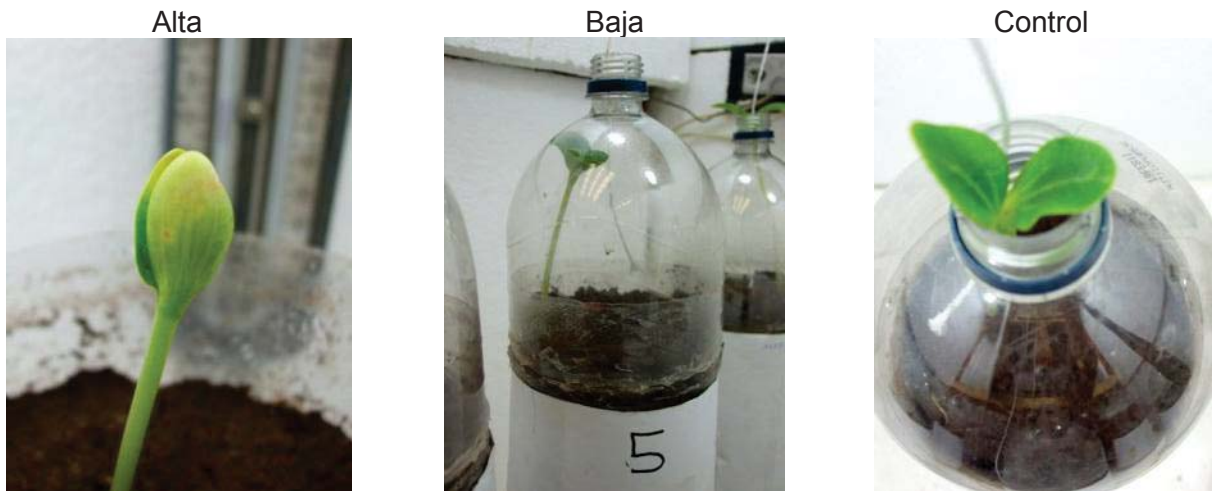


Figura 16. Efecto del biogás durante la germinación (día 7, 1er cosecha). De izquierda a derecha: plántula con cotiledones con daño por elevada concentración, baja, control sin exposición a biogás.

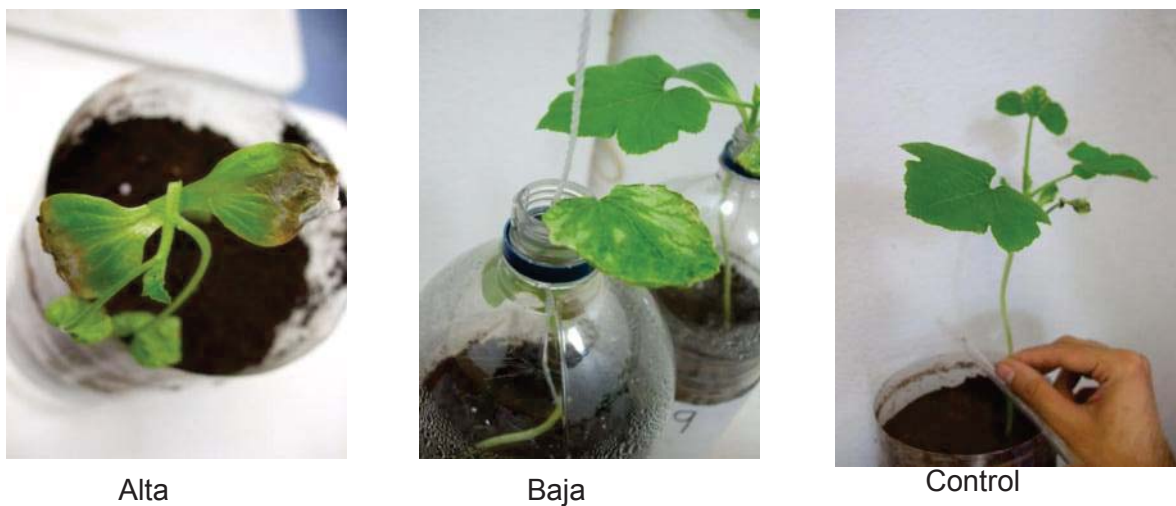
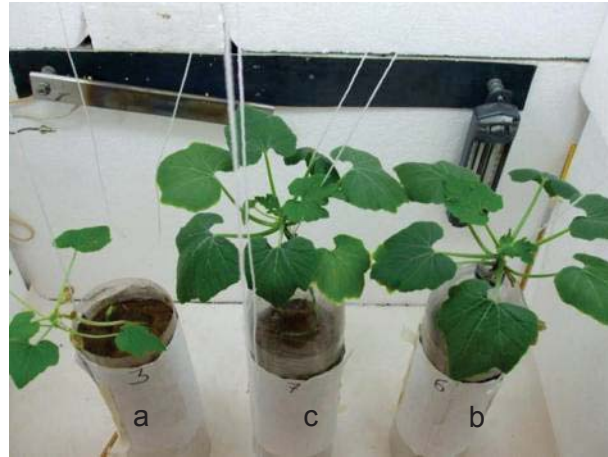


Figura 17. Efecto del biogás en plántulas de 15 días (2ª cosecha). Izquierda a derecha: en alta concentración alta, baja, control sin exposición a biogás.



a-alta, b-baja, c-control



Alta



Baja



Control

Figura 18. Efecto del biogás en plántulas de 30 días (3^a cosecha). Arriba: comparativa del crecimiento de plántulas. Debajo de izquierda a derecha: en concentración alta, baja, control sin exposición a biogás.



14. CUADROS



Cuadro 1. Producción de biogás en 45 días por los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) mesofílicos.

Tiempo (Días)	Volumen (mL)	DE	Acumulado (mL)	DE	CH ₄ (%)	DE	Alimentación
0	0	0	0	0	0.00	0.00	
1	350	122	350	122			
2	167	52	517	147	0.00	0.00	
3	83	41	600	167			
4	183	75	783	183	0.00	0.00	
5	200	63	983	160			
6	250	84	1233	175	24.08	4.17	
7	567	163	1800	316			
8	650	176	2450	432	47.25	2.14	
9	767	103	3217	519			
10	233	103	3450	609	61.18	5.48	
11	400	126	3850	536			
12	300	63	4150	589	68.43	4.71	
13	283	41	4433	579			
14	183	98	4617	585	76.31	2.91	
15	333	151	4950	589			Si
16	3133	273	8083	560	56.80	4.25	
17	1800	237	9883	674			
18	1333	197	11217	553	64.12	3.32	
19	1483	75	12700	613			
20	1933	378	14633	665	55.26	2.00	Si
21	3083	183	17717	736			
22	2167	103	19883	778	59.20	5.47	
23	1317	98	21200	792			
24	933	121	22133	841	61.85	4.19	
25	583	194	22717	962			Si
26	3183	41	25900	951	68.40	4.07	
27	1567	242	27467	1065			
28	1133	52	28600	1099	63.07	6.48	
29	883	194	29483	1212			
30	567	234	30050	1191	72.21	4.00	
31	1133	250	31183	1359			Si
32	3450	138	34633	1329	65.40	3.05	
33	1550	295	36183	1102			
34	900	167	37083	1046	64.22	4.65	
35	617	194	37700	1130			
36	417	271	38117	1162	68.69	3.83	Si
37	3267	372	41383	902			
38	2717	172	44100	908	65.51	1.95	
39	750	138	44850	918			
40	400	110	45250	855	52.41	7.33	
41	333	52	45583	842			Si
42	3283	98	48867	799	64.29	3.89	
43	2150	55	51017	783			
44	1567	82	52583	794	57.62	4.72	
45	800	0	53383	794			
Promedio	1161				52.88		
n = 6							



Cuadro 2. a) Caracterización de los mezcla inóculo del reactor de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) y de los materiales usados en su alimentación cada 5 día.

Material	Humedad (%)	DE	ST (%)	DE	STV (%)	DE	pH
Inóculo							
Lodo residual	99.0955	0.6835	0.9045	0.6835	51.3243	0.7908	7.19
Excreta de vaca	87.4099	0.5341	12.5901	0.5341	85.6281	0.4826	6.82
Mezcla inóculo DASS	65.1782	0.1426	34.8218	0.1426	22.8725	0.1729	8.11
Alimento							
Restos vegetales	84.4680	0.2696	15.5320	0.2696	94.4272	0.1938	6.13
Lodo residual	95.0897	1.4105	4.9103	1.4105	56.8593	0.5086	7.19

b) Monitoreo de los RDASS a lo largo de 45 días. Parámetros: humedad, sólidos totales, sólidos totales volátiles y pH.

Día	% Humedad	DE	%ST	DE	%STV	DE	pH	DE
0	65.1782	0.1426 a	34.8218	0.1426 a	22.8725	0.1729 c	8.11	0.00 c
15	64.5712	0.4179 a	35.4288	0.4179 a	21.1232	0.4412 a	8.85	0.57 bc
20	67.4243	0.6205 b	32.5757	0.6205 b	22.7058	0.4399 b	8.84	0.17 bc
25	67.7711	0.8328 b	32.2289	0.8328 b	22.6852	0.6988 b	8.64	0.08 bc
30	68.5525	0.9026 c	31.4475	0.9026 c	22.7248	0.5034 c	9.02	0.09 ab
35	68.9173	0.9772 c	31.0827	0.9772 c	24.8817	0.7771 c	9.46	0.12 a
40	71.0424	0.9958 d	28.9576	0.9958 d	23.4219	0.6136 c	8.41	0.06 c
45	72.5723	0.4433 e	27.4277	0.4433 e	23.5049	0.5250 d	8.58	0.22 bc
Promedio	68.2537		31.7463		22.9900		8.73	
n = 6								

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

% = por ciento DE = Desviación estándar, ST= Sólidos totales STV = Sólidos totales volátiles



Cuadro 3. Contenido de CH₄ registrado en los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS), en el sistema de medición de biogás (SMB) con solución de salmuera ácida y alcalina en función del volumen acumulado de biogás.

Días	Volumen acumulado biogás (mL)	RDASS		SMB alcalina		SMB ácida	
		CH ₄ (%)	DE	CH ₄ (%)	DE	CH ₄ (%)	DE
2	475	71.31	1.54	84.44	2.52	69.10	1.08
4	3937	60.13	1.98	64.98	1.73	59.87	1.15
6	7167	64.12	3.32	71.12	2.65	65.78	1.15
8	10522	55.26	2.00	58.11	1.00	55.53	1.15
10	15800	59.20	5.47	57.30	1.08	58.80	0.58
12	17157	61.85	4.19	60.45	1.15	60.79	0.58
14	20915	68.40	4.07	65.86	1.10	66.15	1.00
Promedio		62.90	b	66.04	a	62.29	b
n = 12							
Fuente	F	Prob > F					
Días	11.8477	<.0001*					
SMB	56.6165	<.0001*					
Días*SMB	5.0254	<.0001*					

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

% = por ciento DE = Desviación



Cuadro 4. Producción de biogás a corto plazo en las 24 h siguientes a la alimentación de los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) a 35° C.

Tiempo (h)	Volumen de biogás (mL)	DE	Acumulado (mL)	CH ₄ (%)		DE
0	0	0.00	0	5.09	e	4.53
1	425	35.36	425			
2	125	35.36	550	9.09	e	4.67
3	225	35.36	775			
4	175	35.36	950	26.87	d	5.37
5	375	35.36	1325			
6	175	35.36	1500	53.89	bc	2.83
7	175	35.36	1675			
8	125	35.36	1800	55.05	bc	5.37
9	100	0.00	1900			
10	125	35.36	2025	51.47	c	2.97
11	150	0.00	2175			
12	125	35.36	2300	52.64	c	5.09
13	100	0.00	2400			
14	100	0.00	2500	62.66	ab	4.81
15	100	0.00	2600			
16	125	35.36	2725	65.67	a	2.97
17	125	35.36	2850			
18	100	0.00	2950	62.33	ab	3.11
19	100	0.00	3050			
20	125	35.36	3175	50.31	c	5.09
21	100	0.00	3275			
22	100	0.00	3375	52.40	c	3.25
23	100	0.00	3475			
24	75	35.36	3550	57.15	abc	5.09
Promedio	144			46.51		
n = 6						

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

DE= Desviación estándar



Cuadro 5. Composición del biogás generado en los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) y después de fluir a través de la unidad de crecimiento vegetal (UCV) en dos condiciones de humedad suelo seco y capacidad de campo.

Sitio	Seco			Capacidad de campo		
	CH ₄ (%)	DE		CH ₄ (%)	DE	
RDASS	63.86	8.62	a	62.20	3.01	a
UCV	57.98	13.85	a	46.66	4.83	b
Control	0.52	0.18	c	0.47	0.12	c
	n = 6			n = 6		
Fuente	F	Prob > F				
Sitio	131.63	<.0001*				
Suelo	2.04	0.1654				
Sitio*suelo	1.52	0.2380				

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

DE = Desviación estándar % = por ciento



Cuadro 6. Producción de biogás en reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS), usados para la difusión de biogás en la raíz de calabaza. Se agruparon en: alta y baja concentración de biogás en función del volumen generado.

Tiempo (Días)	Flujo alto				Flujo bajo			
	Volumen acumulado de biogás (mL)	DE	CH ₄ (%)	DE	Volumen acumulado de biogás (mL)	DE	CH ₄ (%)	DE
0	500	50	63.50	3.97	383	76	59.45	7.27
1	800	0			767	153		
2	4300	0	61.32	1.63	4267	153	50.13	0.07
3	7800	0			6833	351		
4	9283	275	52.17	1.61	7500	624	42.17	0.08
*5	10083	301			8083	666		
6	12367	603	40.76	0.38	10450	984	41.32	1.64
7	15867	603			13617	1384		
8	18283	539	60.15	0.08	16100	1282	50.39	0.17
9	20700	529			18550	1232		
*10	22173	665	54.98	2.20	20183	1080	42.66	3.70
11	25673	665			23517	1348		
12	29173	665	62.18	1.96	26850	1622	54.74	4.13
13	31790	765			29300	1706		
14	33457	945	64.20	2.29	30533	2155	53.32	2.37
*15	34390	1345			31183	2604		
16	37890	1345	51.75	1.92	32600	2296	43.69	0.67
17	39940	1425			34183	2758		
18	42307	1892	56.07	0.55	35633	2512	46.35	2.09
19	43507	2292			36333	2432		
*20	47007	2292	64.47	2.31	36333	2432	57.48	1.36
21	50507	2292			38100	2687		
22	53490	2145	58.32	1.53	39167	2931	42.68	1.34
23	54657	1691			39500	3260		
24	55640	2123	63.77	1.22	39517	3279	57.68	2.89
*25	56323	2040			39533	3298		
26	59290	1595	67.31	1.87	41267	3299	48.30	2.29
27	60323	1491			41733	3628		
28	61023	1441	52.55	3.69	41967	3938	44.10	0.81
29	61440	1367			42067	4057		
*30	63623	1448	60.03	1.33	42900	4098	42.95	1.67
31	67123	1448			42967	4182		
32	70523	1410	62.86	1.26	44967	4300	53.33	4.80
33	72273	1215			45950	4531		
34	75773	1215	63.83	2.33	46500	4577	54.53	2.61
35	79273	1215			46983	4606		
Promedio	2202	a	58.90	a	1305	b	49.18	b
	n= 6				n = 6			

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$



* = Alimentación, DE= Desviación estándar, % = por ciento

Cuadro 7. Registro de los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS) durante la difusión de biogás en el sustrato de crecimiento de plántulas de calabaza.

Día	% Humedad	DE	%ST	DE	%STV	DE	pH	DE
0	74.6268	1.5350	25.3732	1.5350	28.4677	0.8057	8.74	0.22
5	75.1445	1.4288	24.8555	1.4288	30.1543	1.7552	8.91	0.21
10	75.9264	0.8058	24.0736	0.8058	30.2245	0.9250	8.50	0.19
15	75.5020	0.7533	24.4980	0.7533	31.2719	1.1009	8.39	0.20
20	73.9958	0.5791	26.0042	0.5791	27.6826	0.5579	8.62	0.14
25	76.3813	0.5951	23.6187	0.5951	30.9342	0.8547	8.50	0.19
30	75.3469	0.9998	24.6531	0.9998	30.6036	1.1590	8.58	0.21
35	76.9524	0.5360	23.0476	0.5360	31.0827	1.0162	8.44	0.20
Promedio	75.4845		24.5155		30.0527		8.58	
n = 12								

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

ST= Sólidos totales, STV = Sólidos tóales volátiles, DE= Desviación Estándar, % = por ciento



Cuadro 8. Porcentaje de germinación, promedio del peso fresco y seco de plántulas de calabaza de 5 días expuestas a biogás.

Flujo de biogás	Germinación (%)	Peso fresco (g)	DE	Peso seco (g)	DE
Control n = 16	100	0.9663	0.3013	0.1171	0.0220
Baja n = 16	75	0.6232	0.2978	0.0679	0.0074
Alta n = 16	0	0	0	0	0

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

DE = Desviación estándar, % = por ciento

Cuadro 9. Promedio del peso seco y fresco de la parte aérea y radical de calabaza de 15 y 30 días expuestas a concentración alta (80 L/mes, CH₄ 58.9%) y baja (45 L/mes, CH₄ 49.18%) de biogás de los reactores de digestión anaerobia de sustrato sólido (RDASS).

Flujo	Parte aérea				Raíz				
	Peso fresco (g)	DE	Peso seco (g)	DE	Peso fresco (g)	DE	Peso seco (g)	DE	
15 días									
Alta	1.4928	0.4647	a 0.1024	0.0286	a 0.0697	0.0341	a 0.0104	0.0181	a
Baja	2.3787	0.5453	ab 0.1467	0.0126	ab 0.1125	0.0212	a 0.0263	0.0212	a
Control	3.0067	0.2586	ab 0.2079	0.0243	ab 0.2296	0.0660	a 0.0394	0.0061	a
30 días									
Alta	4.3548	0.6240	bc 0.4159	0.1213	b 1.3757	0.3308	b 0.1452	0.0169	b
Baja	6.2501	0.4012	c 0.6854	0.1776	c 2.2901	0.4203	c 0.2306	0.0188	c
Control	10.9781	3.7078	d 1.1222	0.3445	d 2.9722	0.5421	d 0.3550	0.0359	d
Análisis de diferencia mínima significativa									
Fuente	F	Prob >F	F	Prob >F	F	Prob >F	F	Prob >F	
Tiempo	47.2343	<.0001	75.8845	<.0001	109.9669	<.0001	313.2779	<.0001	
Concentración	11.6731	0.0007	12.6877	0.0005	6.6817	0.0144	32.2464	<.0001	
Tiempo*Conc.	5.0343	0.0201	6.9822	0.0066	4.5047	0.0403	18.7134	0.0004	

Las letras indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias a una probabilidad $\alpha 0.05$

DE = Desviación estándar



15. LITERATURA CITADA

- Azcón J., Talón M. Tadeo F. 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. "Fisiología de las plantas y Estrés". Mc-Graw-Hill Interamericana. España. pp: 481-98.
- Baltierra E. Márquez-Benavides L. 2007. Efecto de los residuos de la industria de la construcción y demolición en la metalogénesis anaerobia. Tesis de Licenciatura en Biología U.M.S.N.H. Inédita.
- Brock T., Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. Biología de los Microorganismos. 10ª. Ed. PrenticeHall. Madrid, España 2009. pp. 441-67.
- Boeckx P., Van Cleemput O.. 1996. Methane oxidation in neutral landfill cover soil: influence of moisture content, temperature, and nitrogen turnover. *Journal of Environmental Quality*. 25:178-183.
- Chan G.Y.S., Wong M.H., Whitton B.A. 1991. Effects of landfill gas on subtropical woody plants. *Environmental Management*. 15:411-31.
- Drew M.C. 1990. Sensing soil oxygen. *Plant Cell Environmental*. 13:681-693.
- Evans, 2003, Aerenchyma formation. *New Phytologist*. 161: 35-49
- Fernández I.J., Kosian P.A. 1987. Soil air carbon dioxide concentrations in a New England spruce-fir forest. *Soil Science Society of American Journal*. 51:261-63.
- Flores, V.M., Márquez-Benavides L., Martínez G 2000. Diseño a escala laboratorio de un bioreactor de sustrato sólido. Tesis de Licenciatura Ingeniería Química, inédita
- Flower F.B., Gilman E.F., Leone I.A. 1981. Landfill gas, what it does to trees and how its injurious effects may be prevented. *Journal of Arboriculture*. 7:43-52.
- Flower F.B., Leone I.A., Gilman E.F., Arthur J.J. 1978. A study of vegetation problems associated with refuse landfills. EPA. U.S.A. 600:78-94.
- Franzidis J.P., Héroux M., Nastev M., Guy C. 2008. Lateral migration and offsite surface emission of landfill gas at City of Montreal landfill site. *Waste Management and Research*. 26:121-31.
- Gerardi M.H. 2003. The microbiology of anaerobic digesters. *Wastewater Microbiology Series*. U.S.A. pp:233-45.
- Gilman E.F., Leone L.A., Flower F.B.. 1982. Influence of soil gas contamination on tree root growth. *Plant Soil* 65:3-10.



- Gilman E.F., Leone L.A., Flower F.B.. 1989. Growth and stomatal response of sugar maple in irrigated and non-irrigated landfill cover soil. *Landscape Urban Plants*. 17:215-220.
- Glynn H., Heinke, G. 1999. Ingeniería Ambiental. 2a. ed, PrenticeHall/Pearson. México pp:35-47.
- Guyot, J.P., Noyola A., Monroy O. (1990). Evolution of microbial activities and populations in granular sludge from an UASB reactor. *Biotechnology Letters*. 12:155-60
- Hess D. 1980. Fisiología vegetal. Fundamentos Moleculares y Fisiológicos del Metabolismo y el Desarrollo. Omega. pp:40-3
- Jackson M. 2002. Long-distance signaling from roots to shoots assessed: the flooding story. *Journal of Experimental Botanic*. 53:175-81.
- Leone A., Flower F.B., Arthur J.J., Gilman E.F. 1977. Damage to woody species by anaerobic landfill gases. *Journal of Arboriculture*. 3:221-25.
- Lindroth R.L. 2010. Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *Journal of Chemistry Ecology*. 36:2-2.
- Márquez-Benavides L. 2000. Co-disposición de residuos sólidos y medicamentos caducos en rellenos sanitarios acelerados. Tesis de Maestría en Biotecnología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México D.F. pp. 165.
- Marchiol L., Cesco S., Pinton R., Zerbi G. 2000. Germination and Initial Root Growth of Four Legumes as Affected by Landfill Biogas Atmosphere. *Restoration Ecology*. 8:93–98
- Marchiol L., Mori A., Leit I., Zerbi G. 1999. Gas Exchanges in Soybean as Affected by Landfill Biogas Atmosphere. *Journal of Environmental Quality*. 28:289-293
- McBain M.C., Warland J.S., McBride R.A., Wagner-Riddle C. 2004. Laboratory-scale measurements of N₂O and CH₄ emissions from hybrid poplars (*Populus deltoides* x *Populus nigra*). *Waste Management & Research*. 22:454-465.



- Muñoz J.D., Camargo D.A., Gallego D. 2009. Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en un Proceso de absorción del CO₂ de un biogás en una solución alcalina. *Dyna*, 76:135-44
- Norma Oficial Mexicana Nom-083-Semarnat-2003. Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. Diario oficial de la Federación, 2004.
- Peñuelas, J., Llusà, J. 2003. Emisiones biogénicas de COVs y cambio global. *Ecosistema*. 12:1-7.
- Poggi H.M., Arce E., Fernández G., Caffarel S. 1997. Inhibition of mesophilic solid substrate anaerobic digestion (DASS) by ammonia rich wastes. 52nd Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan, U.S.A. pp:1-30.
- Rivera G., Sarmiento B.C., 1994. Programa de pruebas de campo para la utilización de biogás del Relleno Sanitario Prados de la montaña. <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/resisoli/mexico/03538e14.pdf>
- Rosiles Castro, Gustavo. 2000. Modelo Mexicano del Biogás – SEDESOL.
- Sallisbury F.B., Ross. C.W. 2005. Fisiología Vegetal. 6ª ed, Editorial Iberoamericana. México. ISBN 970-625-024-7 pp:71-98, 249-313.
- Sánchez-Yañez J.M. 2007. Breve tratado de Microbiología Agrícola “Teoría y práctica”. Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán CIDEM, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo UMSNH. México. ISBN 978-970-95424-1-7. pp:11-30.
- Smith K.L., Colls J.J., Steven M. D. 2005. A facility to investigate effects of elevated soil gas concentration on vegetation. *Water, air, and soil pollution*. 161:75–96.
- Sorensen A.H., Bigitte K.A. 1993. Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester Biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40:427-31.
- Stolwijk A.J., Thimann K.V. 1987. On the uptake of carbon dioxide and bicarbonate by roots, and its influence on growth. *Plant Physiology*. 32:513-20.



- Switzenbaum M.S., Giraldo E., Hickey R.F. 1990. Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme Microbiology Technology*. 12:722-30.
- Tchobanoglous G, Kreith, F. 2005. Handbook of Solid Wasted Management. 2^a ed, McGraw-Hill. New York. U.S.A. Cap.14.
- Wong M. H., Cheung K. C., Lan C. Y. 1992. Factors related to the diversity and distribution of soil fauna on Gin Drinkers' Bay landfill, Hong Kong. *Waste Management & Research*. 10:423-34.



16. ANEXOS



16.1. Métodos analíticos

16.1.1. Determinación de humedad, sólidos totales y sólidos totales volátiles

Humedad y ST: se pesó una en la balanza (Ohaus ExplorerPro: 110g d=0.1mg) 3 g de muestra en una cápsula que previamente fue puesta a peso constante 550°C. Se secó la muestra en horno a 105° C hasta obtener peso constante. Se calculó el contenido de humedad y de sólidos totales con la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{muestra-seco}}{\text{muestra}} \times 100 \quad \%ST = 100 - \% \text{ humedad}$$

STV: se introdujo la cápsula con el residuo a la mufla (Fischer Científica Isotemp) a 550°C durante 3 h. Se seco la cápsula, se enfrió 2 h en desecador hasta peso constante y se determinó su peso (W calcinado) con la formula:

$$\%STV = \frac{\text{seco} - \text{calcinado}}{\text{seco}} \times 100$$

Nota: Peso constante es la masa alcanzada cuando la diferencia entre dos pesadas sucesivas de la muestra a temperatura ambiente, después del proceso de secado, con un intervalo de 2 h entre ellas, no exceda 0.0005 g.

16.1.2. Determinación de pH

Se calibró el potenciómetro (Denver Instrument UB10 ultrabasic, Electrodo # 300728.1 Denver Instrument) con las soluciones amortiguadoras pH 4, 7 y 10 (J.T. Baker). Se pesó 5 g de muestra y se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL. Se añadió 45 mL de agua destilada (dilución 1:10). Se mezcló con agitador magnético durante 10 minutos y se dejó reposar la solución durante 30 minutos. Se determinó la temperatura de la solución. Se sumergió el electrodo en la solución y se realizó la medición de pH. Se secó los electrodos y se lavó con agua destilada. La diferencia máxima permisible en el resultado de pruebas efectuadas por duplicado no excedió de 0.1 unidades de pH.



16.1.3. Determinación de capacidad de campo del suelo artificial

Para determinar la capacidad de campo se colocó 100 g de suelo en un embudo pesado previamente, el cual se secó previamente en horno a 70° C/24h, se agregó agua hasta saturar el suelo y se dejó reposar hasta que el goteo eliminó el exceso de agua, se pesó nuevamente el embudo con el suelo. La capacidad de campo fue la diferencia de los dos pesos.

Un segundo método con el que se estimó a partir de la composición de la textura fue con la fórmula:

$$Cc = 0.48 Ac + 0.162 L + 0.023Ar + 2.62$$

Donde:

Cc

= *humedad a la capacidad de campo, expresada en porcentaje de peso de suelo seco.*

Ac = Contenido en arcilla expresado en porcentaje de peso de suelo seco.

Ar = Contenido en arcilla expresado en porcentaje de peso de suelo seco.

L = Contenido en limo expresado en porcentaje de peso de suelo seco.

Para el coeficiente de retención se tomó 10 g de suelo, se colocó en las cápsulas de aluminio y se deshidrató en un horno (Felisa) a 110° C/24 h. Las diferencias en el peso representaron el porcentaje de humedad. Se hizo un círculo de papel filtro, se colocó sobre el embudo y se pesó toda la unidad (peso 1)- Posteriormente, se colocó sobre el embudo que contiene el papel filtro con una muestra de suelo seco y que se compactó con ligeros golpes, se pesó nuevamente (peso 2), se agregó agua hasta que se observó que el suelo estuvo sin exceso de humedad y se pesó (peso 3)

La fórmula para calcular el coeficiente de retención fue:

$$CR = (\text{peso 1} + \text{peso 2} - \text{peso 3}) \times 100$$



16.1.4. Determinación de CH₄

Se tomó con una jeringa de 5 mL una muestra de biogás, se almacenó en un tubo para centrifuga de 15 mL cerrado herméticamente con un tapón suba-seal #33 que contuvo 10 mL de solución de salmuera acidificada a pH 4 al que se le realizó previamente vacío con una jeringa de 20 mL, se invirtió inmediatamente el tubo, luego se selló con silicón y se guardó hasta su determinación en el CG.

El CG Varian CP-3800, funcionó con un detector FID y una columna empacada HAY-ESEP-Q-80-100-MESH, las temperaturas de operación del inyector, el detector y la columna fueron 200, 210 y 90°C respectivamente. El gas de arrastre utilizó un flujo de 30 mL/min. Para su operación se usó el programa Galaxie Workstation. Se cambió antes de cada determinación el septo del CG (3/8 CR246124, Varian) y se calibró con 10 inyecciones de CH₄ (Praxair grado reactivo). Se tomó 30 µL de la muestra del tubo para centrifuga en el que se almacenó el biogás con una jeringa cromatográfica.



16.2. Cronograma de trabajo

Etapa Mes	Documental	Diseño experimental y preparación	Experimental	Final	Avance
1-2°	Revisión de literatura				√
3-4°	Redacción del proyecto				√
5°		Diseño experimental y métodos.			√
6-7°		Preparación de alimentación de RDASS. Recolección de suelo y semilla.			√
8-9°		Montaje de RDASS Acondicionamiento del solarío. Diseño y construcción del SMB		Reporte de Resultados	√
10-12°		Diseño y construcción de las UCV.	Operación de los RDASS.		√
13-14°			Pruebas en RDASS, SMB y UCV Sembrado de semillas de calabaza.	Reporte de Resultados	√
15-20°			Operación de RDASS, SMB, UCV Medición del crecimiento vegetal y de biogás.	Reporte de Resultados	√
21-22°				Análisis de resultados	√
23°				Redacción de discusión y conclusiones.	√
24°				Presentación de Tesis.	√