



**UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Análisis de poblaciones bacterianas degradadoras de fracción
orgánica en residuos sólidos urbanos a diferentes regímenes de
recirculación de lixiviados**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

presenta el

I.B.Q. Christian Omar Martínez Cámara

Director de Tesis:

Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Co-Director de Tesis:

Dra. Liliana Márquez-Benavides

**Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-
biológicas y Laboratorio de Residuos Sólidos y Medio Ambiente del Instituto de
Investigaciones Agropecuarias y Forestales**

Morelia, Michoacán, Febrero del 2011

La presente investigación se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Ambiental** del **Instituto de Investigaciones Químico-biológicas** y en el **Laboratorio de Residuos Sólidos y Medio Ambiente** del **Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales**, dependientes de la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** (UMSNH) bajo la supervisión del **Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez** y la **Dra. Liliana Márquez-Benavides**. Este trabajo fue financiado parcialmente por los proyectos 2.7 y 5.15 (2010) de la **Coordinación de la Investigación Científica** de la **UMSNH**.



ÍNDICE

Lista de tablas	iii
Lista de figuras	v
Abreviaturas	vi
Resumen	vii
1. Introducción	
1.1 Generación de los residuos sólidos urbanos	1
1.2 Composición de los residuos sólidos urbanos	2
1.3 Disposición de los residuos sólidos urbanos	3
1.4 Descomposición bacteriana anaeróbica de los residuos sólidos urbanos	3
1.4.1 Hidrólisis	4
1.4.2 Fase fermentativa o acidogénica	8
1.4.3 Fase acetogénica	9
1.4.4 Fase metanogénica	10
1.5 Justificación	12
1.6 Hipótesis	13
1.7 Objetivo general	13
1.8 Objetivos específicos	13
2. Antecedentes	14
3. Materiales y métodos	18
3.1 Obtención y preparación del material de estudio	18
3.1.1 Toma de muestras de RESA de Pátzcuaro, Michoacán	18
3.1.2 Caracterización de la muestra y reducción de tamaño de subproductos	18
3.1.3 Determinación de humedad de residuos sólidos urbanos	19
3.1.4 Determinación de pH de los residuos sólidos urbanos	20
3.2 Montado de LBX anaeróbicos escala laboratorio	21
3.2.1 Definición del diseño experimental	21
3.2.2 Preparación de mezcla y llenado de LBX	23
3.2.3 Montaje de biorreactores	23
3.3 Puesta en marcha y seguimiento de operación	24
3.3.1 Recirculación de lixiviados y muestreos	24
3.3.2 Obtención de muestra para la cuantificación de las poblaciones bacterianas	25
3.3.3 Métodos microbiológicos para la determinación de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas	25
3.3.3.1 Variables respuesta consideradas	26
3.3.3.2 Preparación del lixiviado como medio de cultivo anaeróbico	27
3.3.3.3 Preparación de medio de cultivo anaeróbico para PC y PHe	27
3.3.3.4 Medio de cultivo para la cuantificación de las	

poblaciones celulolíticas	29
3.3.3.5 Medio de cultivo para la cuantificación de poblaciones hemicelulolíticas	29
3.3.3.6 Enriquecimiento del lixiviado usado como medio anaeróbico para bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas	30
3.3.3.7 Inoculación de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas	30
4. Resultados y discusión	
4.1 Dinámica de pH derivado de la descomposición bacteriana anaeróbica de RSU en matriz y LXS de LBX	31
4.2 Análisis de poblaciones celulolíticas en DBA de RSU a diferentes regímenes de humedad vía recirculación de LXS	32
4.3 Comparación de cuantificación por distintos medios de cultivo	33
4.3.1 Uso de medios de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos para cuantificación de poblaciones celulolíticas	33
4.4 Asignación de positivo con nueva variable respuesta para la prueba NMP	36
4.5 Análisis de poblaciones hemicelulolíticas en DBA de RSU a diferentes regímenes de humedad vía recirculación de LXS	40
4.5.1 Dinámica de la densidad de PHe a diferentes porcentajes de humedad vía recirculación de lixiviados en medios de cultivo estándar	41
5. Conclusiones	46
6. Validación de objetivos	47
7. Validación de hipótesis	48
8. Recomendaciones	49
9. Referencias	50
10. Anexos	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Productos de la descomposición anaeróbica de la celulosa	5
Tabla 2. Reacciones acetogénicas en la descomposición bacteriana anaeróbica de la fracción orgánica de los residuos sólidos orgánicos	10
Tabla 3. Reacciones metanogénicas en la descomposición bacteriana anaeróbica de la fracción orgánica de los residuos sólidos orgánicos	11
Tabla 4. Principales subproductos y concentración utilizada para la mezcla inicial de residuos sólidos urbanos en reactores escala laboratorio para la detección de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas	19
Tabla 5. Tasas de recirculación de lixiviados	21
Tabla 6. Diseño experimental para analizar la densidad de población bacteriana celulolítica y hemicelulolítica durante la descomposición anaeróbica de residuos sólidos urbanos a diferentes regímenes de recirculación de lixiviados	22
Tabla 7. Arreglo de identificación de muestras y días de desmote para la determinación de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas en los residuos sólidos urbanos	25
Tabla 8. Cantidad de inóculo y concentración del medio de cultivo para la cuantificación de las poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas a diferentes niveles de humidificación vía recirculación de lixiviados	26
Tabla 9. Medio de cultivo para determinación poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas en residuos sólidos urbanos	28
Tabla 10. Formulación de medios de cultivo para cuantificación de la población celulolítica y hemicelulolítica	30
Tabla 11. Poblaciones celulolíticas anaeróbicas en suelos usando número más probable	35
Tabla 12. Densidad de poblaciones celulolíticas en lixiviados producidos por la descomposición anaeróbica de fracción orgánica	36

de residuos sólidos urbanos en reactores escala laboratorio a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y medio de cultivo lixiviado enriquecido

Tabla 13. Poblaciones celulolíticas en ambientes sujetos a digestión anaerobia	39
Tabla 14. Densidad de poblaciones celulolíticas en lixiviados producidos por la descomposición anaeróbica de fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en reactores escala laboratorio a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y medio de cultivo lixiviado enriquecido. Variable respuesta 3,5 DNS	40
Tabla 15. Poblaciones hemicelulolíticas anaeróbicas en suelos usando número más probable	42
Tabla 16. Poblaciones hemicelulolíticas en ambientes sujetos a digestión anaerobia	43
Tabla 17. Densidad de poblaciones hemicelulolíticas en lixiviados involucradas en la descomposición anaeróbica de fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en reactores escala laboratorio a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos	43
Tabla 18. Densidad de poblaciones hemicelulolíticas en lixiviados involucradas en la descomposición anaeróbica de fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en reactores escala laboratorio a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos con variable respuesta pH	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Generación de residuos sólidos urbanos en México en 2009	1
Figura 2. Composición de los residuos sólidos urbanos en México en el 2008	2
Figura 3. Dinámica de la descomposición bacteriana anaeróbica en un relleno sanitario	4
Figura 4. Estructura de la celulosa con enlaces β -1,4	6
Figura 5. Estructura de los constituyentes de las hemicelulosas	7
Figura 6. Sistema de recirculación de lixiviados para la determinación de la densidad de las poblaciones celulolíticas y poblaciones hemicelulolíticas en residuos sólidos urbanos	24
Figura 7. Dinámica del pH derivado de la descomposición anaeróbica de la fracción orgánica en residuos sólidos urbanos en lixiviados de reactores escala laboratorio a diferentes regímenes de humedad	32
Figura 8. Comparación de acumulados de poblaciones celulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido	34
Figura 9. Comparación de acumulados de poblaciones celulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido. Variable respuesta utilizada: 3,5-DNS	38
Figura 10. Comparación de acumulados de poblaciones hemicelulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido	42
Figura 11. Comparación de densidades acumuladas de poblaciones hemicelulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido con variable pH	44

ABREVIATURAS

AO = ácidos orgánicos

AGV = ácidos grasos volátiles

ATP = adenosín trifosfato

CE = celulosa

DBA = descomposición bacteriana anaeróbica

DHA = deshidrogenación acetogénica

FO = fracción orgánica

HA = hidrogenación acetogénica

HE = hemicelulosa

LBX= reactores escala laboratorio

LGPGIR = Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos

LXS = lixiviados

NMP = número más probable

PC = poblaciones celulolíticas

PHe = poblaciones hemicelulolíticas

RESA = relleno sanitario

RSU = residuos sólidos urbanos

SEMARNAT = Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales

SUMA = Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente

3, 5-DNS = ácido 3, 5 dinitrosalicílico

Resumen

El manejo adecuado de los residuos sólidos urbanos (RSU) es de interés energético por la producción de biogás y ecológico por el riesgo de contaminar el ambiente con los lixiviados (LXS). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de diferentes regímenes de humidificación vía recirculación de LXS sobre la densidad bacteriana de poblaciones celulolíticas (PC) y hemicelulolíticas (PHe) en la descomposición bacteriana anaeróbica (DBA) de la fracción orgánica (FO) de RSU.

Para ello se utilizaron reactores escala laboratorio (LBX) que simularon la composición y propiedades de un relleno sanitario (RESA), la cuantificación de las PC y PHe se basó en el método del número más probable (NMP) con medios de cultivo estándar y LXS enriquecidos. Las variables respuesta para la PC fueron: la turbidez y liberación de azúcares reductores, para la PHe: la turbidez y cambio de pH.

Los resultados mostraron una disminución en la densidad de PC y PHe independiente del régimen de humificación empleado conforme el tiempo. El decremento en la densidad bacteriana de ambas poblaciones, fue consecuencia del consumo de celulosa (CE) y hemicelulosas (HE) usadas como fuente de carbono y energía; que causó la liberación de ácidos orgánicos (AO) con la aparición de azúcares reductores, aumento en la turbidez y la acidificación del medio de cultivo.

Palabras clave: **polímero de azúcares vegetales, actividad bacteriana anaeróbica, lixiviados**

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto 2.7 y 5.15 (2008-2010) de la Coordinación General de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al laboratorio de Residuos Sólidos y Medio Ambiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A la empresa BIONUTRA (2008-2010), S.A. de C.V.

A los integrantes del Comité Tutoral, Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez, Dra. Liliana Márquez Benavides, Dr. Otoniel Buenrostro Delgado, Dr. Eduardo Valencia Cantero y Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga por su gran apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez y la Dra. Liliana Márquez Benavides, por su entera disposición, su apoyo y su valioso tiempo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generación de los residuos sólidos urbanos

Las diferentes actividades humanas en la sociedad generan desechos sólidos, líquidos y gaseosos con efecto negativo sobre el ambiente y la calidad de vida de personas y animales.

Los RSU se producen en casas habitación, por cualquier actividad en establecimientos, vía pública debido a la limpieza, consumo de bienes y servicios según la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR).

La generación total de RSU en México se incrementó un 19.24% de 1999 al 2009, en este año se obtuvieron de 38, 325, 000 Ton con una producción diaria de 0.98 RSU kg/hab/día, en la Figura 1 se muestra la distribución de la generación de RSU (SEMARNAT, 2010).



Figura 1. Generación de residuos sólidos urbanos en México en 2009

1.2. Composición de los residuos sólidos urbanos

Paralelamente al aumento, la generación y composición de los RSU ha cambiado mientras que en la década de los años cincuenta el porcentaje de FO oscilaba entre 65 y 70% para 2008 se había reducido al 52%. En la Figura 2 se muestra la composición de los RSU en México (SEMARNAT, 2010).

La FO está constituida por: CE 40-50%, HE 10-12%, lignina 10-15%, proteínas 5-11%, grasas, aceites y ceras 4-7% además de constituyentes solubles: azúcares simples, aminoácidos y ácidos orgánicos 3-5% (Palmisano *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994) es razonable que en la DBA de CE y HE se estime una producción potencial de metano (CH₄) superior al 85% (Barlaz *et al.*, 1989).

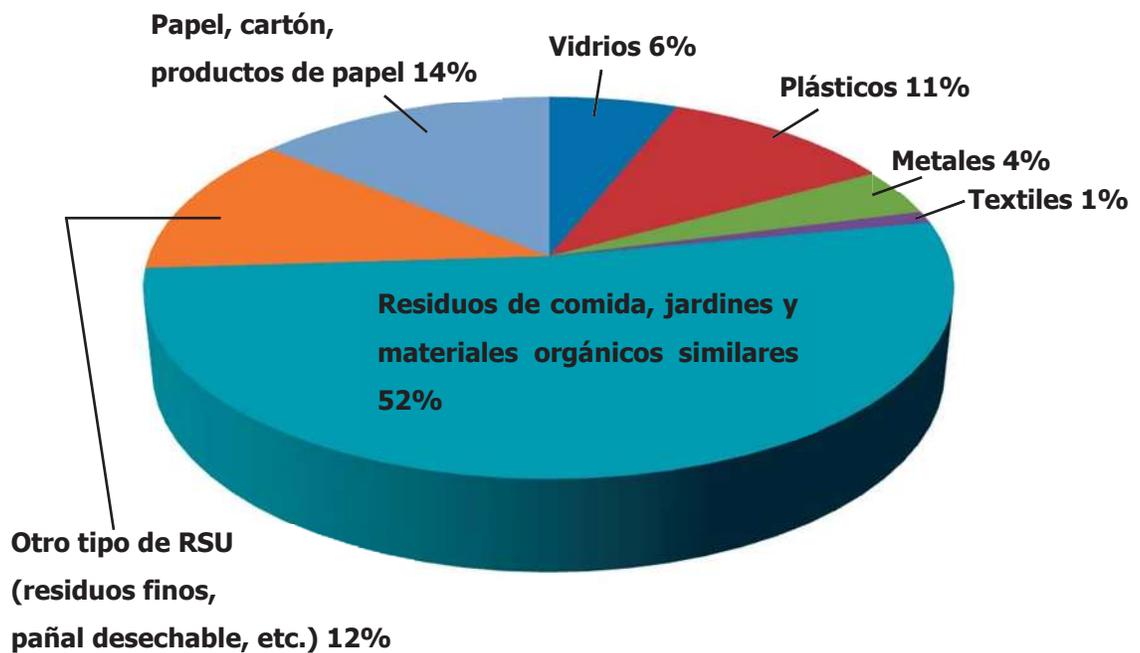


Figura 2. Composición de los residuos sólidos urbanos en México en el 2008

1.3. Disposición de los residuos sólidos urbanos

La adecuada disposición de los RSU es de importancia para minimizar los problemas ambientales que afectan las zonas urbanas, para lo que se requieren elevada cantidad de recursos económicos tecnológicos para su gestión en recolectarlos y evacuarlos a un RESA; que se define como una instalación de ingeniería planeada, construida y operada para evitar los riesgos de salud pública y del ambiente. En el RESA los RSU se clasifican, reciclan y/o se confina la fracción no reciclable (Tchobanoglous *et al.*, 1993; Jokela *et al.*, 2002; Davis & Masten, 2005).

El estado de Michoacán pertenece a la región centro del país que contribuye con el 50% de la generación nacional de RSU, tiene 2 RESA y un relleno de tierra controlado, aunque se estima que existen 321 sitios no controlados o tiraderos a cielo abierto, con riesgos de contaminación ambiental por tóxicos y transmisión de infecciones derivadas de esa deficiente gestión de RSU (SEMARNAT, 2006) en consecuencia en el 2008 la Secretaria de Urbanismo y Medio Ambiente en el estado reportó una generación de 2,522 Ton/día de RSU (SUMA, 2010).

1.4. Descomposición bacteriana anaeróbica de los residuos sólidos urbanos

El modelo convencional de la DBA divide las reacciones bioquímicas de la FO en fases realizadas por distintos grupos bacterianos, como se muestra en la Figura 3.

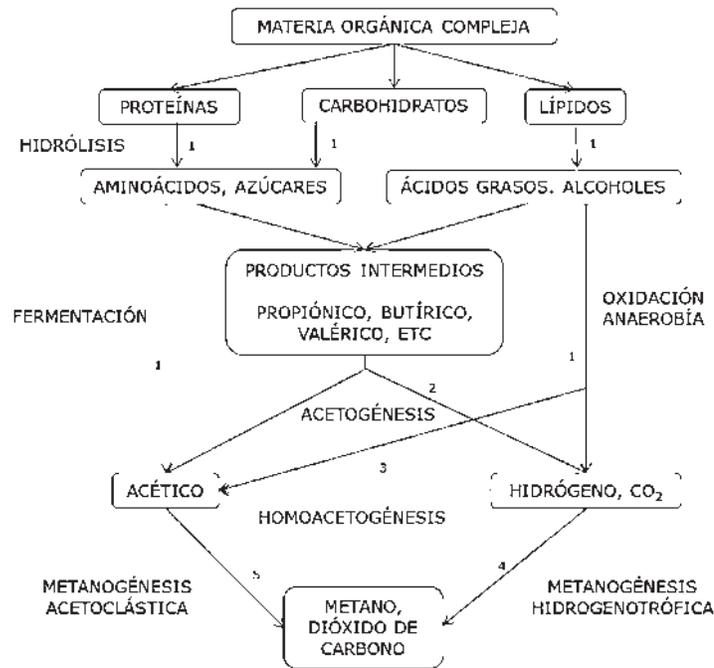


Figura 3. Dinámica de la descomposición bacteriana anaeróbica en un RESA

(Siegrist et al., 1993). Los números indican el grupo específico bacteriano responsable: 1: fermentativas; 2: acetogénicas productoras de hidrógeno (H₂); 3: homoacetogénicas; 4: metanogénicas hidrogenotróficas; 5: metanogénicas acetoclásticas.

1.4.1. Hidrólisis

La materia orgánica vegetal está constituida en un alto porcentaje por CE y HE, estos son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza y su descomposición tiene importancia en el ciclo del carbono. La hidrólisis de la CE y HE durante la DBA se realiza por grupos bacterianos específicos, cuya velocidad depende de factores ambientales como: pH, temperatura, concentración de biomasa y tamaño de partícula de los RSU (Pavlostathis & Giraldo-Gómez, 1991; Hills & Nakano, 1984).

Algunos de los principales componentes de la FO de los RSU son los materiales lignocelulósicos una mezcla de: lignina, CE y HE. La primera es recalcitrante a la DBA y afecta la hidrólisis de CE y HE por un efecto físico derivado de los enlaces estructurales entre ellos en la pared celular vegetal (Alexander, 1980; Sleat & Mah, 1987; Pavlostathis & Giraldo-Gómez, 1991; Veeken & Hamelers, 1999).

Las bacterias aerobias generalmente convierten la CE en dos productos principales: biomasa y dióxido de carbono (CO₂). No existe acumulación significativa de intermediarios carbonados y la concentración de AO raramente alcanza un nivel apreciable. En condiciones anaeróbicas las bacterias son incapaces de metabolizar completamente estos sustratos, siendo los principales productos de acumulación: CH₄, H₂, etanol y ácidos: acético, fórmico, succínico, butírico y láctico como se muestra en la Tabla 1. Los primeros microbiólogos reportaron el descubrimiento de un tercer gas durante la fermentación bacteriana, CH₄, pero en investigaciones con cultivos puros se determinó que ninguno de los anaerobios celulolíticos produce este gas, sin embargo en cultivos enriquecidos como el suelo y los RSU, la ruptura anaeróbica de los carbohidratos está acompañada por CH₄ formado por la microbiota secundaria.

Tabla 1. Productos de la descomposición anaeróbica de la celulosa

Bacterias	Productos
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Mesófila: etanol, ácidos: acético, láctico y fórmico. CO ₂ y H ₂ .
<i>Cl. thermocellum</i>	Termófila: etanol, ácidos: láctico, fórmico y succínico. CO ₂ y H ₂ .

El paso inicial en la destrucción de la CE es su hidrólisis enzimática. A este grupo de diferentes enzimas se le ha dado el nombre de *celulasa*, que cataliza su conversión de polímero insoluble a mono y disacáridos sencillos solubles en agua, una reacción característica de la microbiota celulolítica, los pasos que siguen a la hidrolisis inicial varían con los microorganismos responsables.

La célula microbiana es impermeable a la molécula de CE de manera que debe excretar enzimas extracelulares para aprovecharla como fuente de carbono, estos catalizadores convierten el material insoluble en azúcares solubles que penetran la membrana celular y proveen de energía a las reacciones biosintéticas.

La glucosa está unida entre el carbono y 1 de un azúcar y el 4 del adyacente, esta unión es conocida como β -1,4. La CE se une por puentes de H₂ de estos dos tipos y dan lugar a una estructura polimórfica como se muestra en la Figura 4.

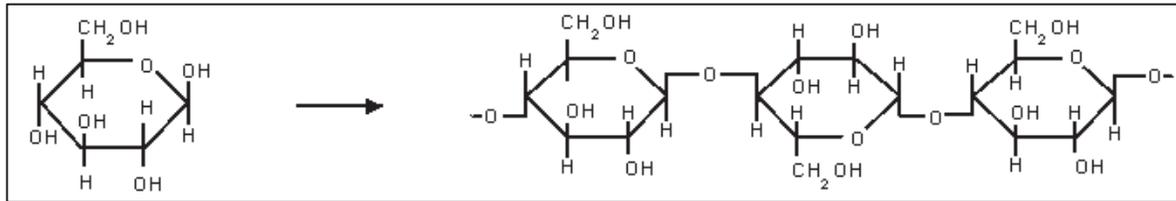


Figura 4. Estructura de la celulosa con enlaces β -1,4

El grupo incluye: celobiosa, celotriosa, celotetrosa, moléculas que contienen dos, tres y cuatro unidades de glucosa. Estos oligómeros son importantes por ser intermediarios en la conversión de la CE a glucosa.

El sistema catalítico que requiere un microorganismo para convertir CE a glucosa esta constituido por 3 tipos de enzimas:

- a) Endoglucanasa (C_1 , C_2), rompe los enlaces transversales entre cadenas.
- b) $1,4 \beta$ -glucano celobiohidrolasa (C_x), degrada CE a celobiosa.
- c) β -glucosidasa, degrada celobiosa a glucosa.

La mayoría de las HE están físicamente asociadas con la CE en la pared de las plantas, pero aunque estos polisacáridos estén relacionados estructuralmente, el termino *hemicelulosa* está mal empleado pues esta molécula no tiene relación estructural con la CE. A los polisacáridos en la pared celular de las plantas superiores con excepción de la CE y la pectina, se les conoce como HE. Estas se dividen en dos categorías: homoglicanos con un solo tipo de monosacáridos como: xilano, manano o galactano y los heteroglicanos con más de una clase de monosacárido o ácido urónico representados por: glucomananos, arabinoxilanos, arabinogalacanos o arabinoglucoronoxilanos. En estos polímeros los monosacáridos o los ácidos urónicos

están unidos en una molécula de estructura compleja, algunos pueden tener de 50 a 200 unidades de diversos azúcares de la pared celular vegetal. Los constituyentes de las HE están representados en la Figura 5.

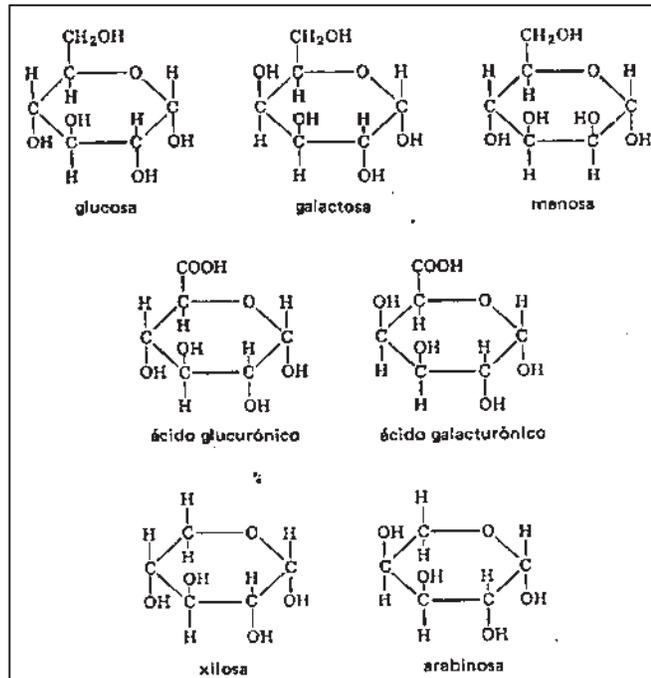


Figura 5. Estructura de los constituyentes de las hemicelulosas

Al igual que con la CE, las HE tienen alto peso molecular y no pasan a través de la membrana celular microbiana, deben ser convertidas en compuestos simples para usarse como fuente de carbono y energía. La microbiota activa debe hidrolizar el polisacárido con enzimas extracelulares para que la célula los asimile. Las PHe catalizan la hidrólisis inicial de HE. Después de la ruptura aparecen poblaciones sobre los intermediarios metabólicos, el último grupo de microbios responde a los compuestos liberados de los polímeros de alto peso molecular por las PHe; como regla general están involucradas tres tipos de enzimas en la degradación de las HE:

- a) Endoenzimas, rompen al azar los enlaces entre las partes constitutivas del polímero.
- b) Exoenzimas, extraen un solo dímero o monómero del extremo de la cadena del polisacárido.
- c) Glicosidasas, hidrolizan los oligómeros o disacáridos y generan pentosas, hexosas o ácidos urónicos.

Además de los polímeros vegetales de la FO de RSU, existen proteínas que son hidrolizadas por proteasas en proteosas, peptonas, péptidos y aminoácidos, posteriormente estos son transformados en ácidos grasos volátiles (AGV), CO_2 , H_2 , amonio (NH_4) y H_2S , la rapidez de hidrólisis de proteínas es menor que la de carbohidratos.

En anaerobiosis durante la degradación de lípidos intervienen lipasas que rompen las grasas en ácidos grasos de cadena larga y glicerol para generar glucosa. Así una molécula de fosfolípidos origina una molécula de ácido fosfórico, una de glicerol y dos de ácidos grasos (Pavlostathis & Giraldo-Gómez, 1991).

1.4.2. Fase fermentativa o acidogénica

Varios grupos bacterianos fermentan la glucosa y producen ácidos grasos como: acetato, butirato, formato, lactato, propionato, valerato, etanol e H_2 . Las proporciones entre estos productos de la fermentación dependen del consumo de H_2 . Cuando se usan por grupos de fermentativas no generan compuestos reducidos como el etanol, se favorece la liberación de ATP (Pavlostathis & Giraldo-Gómez, 1991).

Algunas vías metabólicas sólo son posibles a baja presión de H_2 , con una concentración de entre 5-50 ppm se forma acetato y CO_2 , en alta presión de H_2 se sintetiza propionato y butirato (Mosey, 1986).

En la hidrólisis y acidogénesis de los RSU se genera una elevada concentración de H_2 y se alcanza una proporción de entre 20-25% respecto al volumen del biogás liberado. La excesiva acumulación de H_2 inhibe la DBA (Sparling, 1997).

1.4.3. Fase acetogénica

Algunos productos de la fermentación son metabolizados por grupos de metanógenos a H_2 u acetato, mientras que otros como: valeriato, butirato, propionato y algunos aromáticos, son transformados en acetato e H_2 por los acetógenos según se indica en la Tabla 2 cuyos principales representantes son: *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolini* (Boone & Bryant, 1980). El proceso cetogénico es energéticamente difícil, se necesita la acción de los metanógenos y otros consumidores de H_2 , la energía libre de esta reacción depende de la presión parcial de H_2 (Stams, 1994).

Los productos de la acidogénesis se transforman en acetato por dos rutas: deshidrogenación acetogénica (DHA) e hidrogenación acetogénica (HA). En la DHA se genera acetato a partir de ácidos grasos y algunos alcoholes, la formación de acetato depende de la concentración de H_2 . La degradación del propionato a acetato se inhibe con una cantidad de H_2 del orden de 500-50.000 ppm en el biogás. Boone *et al.*, en 1987 describieron dos tipos de grupos de bacterias que realizan la DHA: acetogénicas reductoras obligadas (ARO) y fermentativas acidogénicas, ambas generan H_2 , CO_2 y acetato, la diferencia se da en que el grupo fermentativo crece independientemente del efecto del H_2 , mientras que los grupos de ARO sólo crecen a baja concentración de H_2 .

En la HA los homoacetogénicos sintetizan acetato de H_2 y CO_2 , estos realizan la función de los metanogénicos que utilizan H_2 , cuando son inhibidas a pH ácido (Schink, 1997; Chynoweth, 1987).

Tabla 2. Reacciones acetogénicas en la descomposición bacteriana anaeróbica de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

Reacciones acetogénicas	ΔG° (KJ)
Etanol y láctico	
$Etanol + H_2O \rightarrow Acetato + H^+ + 2H_2$	+9,6
$Lactato^{-1} + 2H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + H^+ + 2H_2 + HCO_3^{-}$	-4,2
Ácidos Grasos	
$Acetato^{-1} + 4H_2O \rightarrow H^+ + 4H_2 + 2HCO_3^{-}$	+104,6
$Propionato^{-1} + 3H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + HCO_3^{-} + H^+ + 3H_2$	+76,1
$Butirato^{-1} + 2H_2O \rightarrow 2Acetato^{-1} + H^+ + 2H_2$	+48,1
$Valerato^{-1} + 3H_2O \rightarrow 3Acetato^{-1} + 2H^+ + 4H_2$	+96,2
Aminoácidos	
$Alanina + 3H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + HCO_3^{-} + NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	+7,5
$Aspartato^{-1} + 4H_2O \rightarrow Acetato^{-1} + 2HCO_3^{-} + NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	-14,0
$Leucina + 3H_2O \rightarrow isovalerato^{-1} + HCO_3^{-} - NH_4^+ + H^+ + 2H_2$	+4,2
$Glutamato^{-1} + 4H_2O \rightarrow propionato^{-1} + 2HCO_3^{-} - NH_4^+ - H^+ + 2H_2$	-5,8
$Glutamato^{-1} + 7H_2O \rightarrow acetato^{-1} + 3HCO_3^{-} + NH_4^+ + 3H^+ + 5H_2$	+70,3

(Stams, 1994)

1.4.4. Fase metanogénica

Los grupos metanogénicos completan la DBA con la formación de CH₄ a partir de acetato, H₂/CO₂, formato, metanol y algunas metilaminas; los metanogenos se clasifican en el dominio *Archaea* tienen propiedades genéticas y bioquímicas distintas de otros procariontes, un ejemplo son sus coenzimas M que participan en la síntesis de CH₄.

Las principales reacciones de las metanogénicas se muestran en la Tabla 3, estos grupos emplean H₂ como aceptor de electrones, mientras que sólo dos grupos utilizan acetato. En reactores anaeróbicos el acetato es el compuesto precursor del CH₄ con el 70% producido (Ferguson & Mah, 1983). Los géneros y especies más conocidos son: *Methanosarcina barkeri* y *Methanosaeta thermophila*; estos crecen con H₂, CO₂, acetato, metanol, metilaminas y CO (Cairó & París, 1988).

Tabla 3. Reacciones metanogénicas en la descomposición bacteriana anaeróbica de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

<i>Reacciones hidrogenotróficas</i>	$\Delta G^{\circ}(\text{KJ})$
$4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \rightarrow \text{Acetato} + 4H_2O$	-104.6
$4H_2 + 4S^{\circ} \rightarrow 4HS^- + 4H^+$	-112
$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6
$4H_2 + 4SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-151.9
$4H_2 + 4 \text{ fumarato} \rightarrow 4 \text{ succinato}$	-344.6
$4H_2 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$	-599.6
<i>Interconversión formato-hidrógeno</i>	
$H_2 + HCO_3^- \rightarrow \text{formato} + H_2O$	-1.3
<i>Metanogénesis acetoclástica</i>	
$\text{Acetato} + H_2O \rightarrow HCO_3^- + CH_4$	-31.0
<i>Metanogénesis a partir de otros substratos</i>	
<i>Fórmico</i>	
$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	
<i>Metanol</i>	
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	
<i>Trimetil-amina</i>	
$4(CH_3)_3N + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$	
<i>Dimetil-amina</i>	
$2(CH_3)_2NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$	
<i>Monometil-amina</i>	
$4(CH_3)NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_3$	

(Adaptada de Stams, 1994 y Ferguson & Mah, 1983)

El resultado de la DBA de RSU en RESA es una mezcla físico-química-biológica conocida como LXS. Estos perfunden por la matriz de los RSU por gravedad desde la parte superior hasta la inferior del reactor.

1.5. Justificación

Existe investigación sobre la actividad microbiana anaeróbica hidrolítica y fermentativa de acuerdo con los productos de su metabolismo en la DBA de FO en RSU. Sin embargo mínima información se ha publicado en relación a la dinámica de PC y PHe durante este proceso, además no se habían usado LXS enriquecidos como medio de cultivo a diferentes regímenes de humedad simulando las condiciones en RESA. Las variables respuesta convencionales para la actividad celulolítica no son muy precisas, por lo tanto se propuso cuantificar la desaparición de los polisacáridos y formación de monosacáridos como prueba de la PC por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-DNS). Para las PHe se implementó la variación en pH como evidencia de su actividad.

1.6. Hipótesis

En un bioreactor a escala de un relleno sanitario, el volumen de lixiviados recirculados influye en la densidad de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas.

1.7. Objetivo general

Analizar los cambios de densidad bacteriana celulolítica y hemicelulolítica en la descomposición de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos a diferentes regímenes de recirculación de lixiviados.

1.8. Objetivos específicos

Estudiar cambios en las poblaciones bacterianas dominantes en función del régimen de recirculación de lixiviados.

Evaluar la liberación de azúcares reductores como variable respuesta para la cuantificación de poblaciones celulolíticas y el uso del pH para las hemicelulolíticas.

2. ANTECEDENTES

La identificación y enumeración de bacterias hidrolíticas y fermentativas es un tópico que se ha investigado usando distintas estrategias, entre ellas métodos: enzimáticos, genéticos, bioquímicos, consumo de sustrato o producción de metabolitos y medios de cultivo.

Se han investigado géneros de PC implicadas en la hidrólisis de la FO de RSU en RESA. Westlake *et al.* (1995) analizaron esta fase con la finalidad de los autores fue establecer las mejores condiciones para la degradación de la CE en la DBA. Los productos derivados de la CE fueron identificados por el método de Hungate con monitoreo de temperatura y pH. Reportaron que un *Clostridium sp* celulolítico y tres especies de *Eubacterium* anaerobio estricto crecen mejor a temperatura termófila entre 37-50°C y pH entre 6.8-7.7. Se concluyó que las propiedades biológico-físico-químicas en la DBA de la FO de RSU favorecen una mayor diversidad de PC que acelera la DBA de los RSU

La actividad enzimática ha sido un método recurrido para la determinar rápida y fiablemente la concentración de CE y HE en RESA además de evidenciar su desaparición como sustrato. Rodríguez *et al.* (2004) evaluaron la actividad de la endoglucanasa y β -glucosidasa en la DBA de la CE y HE. Realizaron la cuantificación de monosacáridos y biogás por medio de cromatografía líquida y gaseosa. La actividad enzimática fue analizada por el método de Novo Nordisk. Los resultados señalaron que la actividad enzimática fue efectiva para determinar la disponibilidad de CE y HE en RSU en RESA. Encontraron que la concentración de monosacáridos fue directamente proporcional a la de CH₄.

Cabe señalar que la producción de metabolitos de las PC también ha sido estudiada y ha tenido importancia debido a la alternativa que proporciona a otros métodos para la medición de estos productos. Lai *et al.* 2001 analizaron la degradación

de RSU con recirculación de LXS en condiciones mesofílicas por medio de la actividad celulolítica. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del intercambio entre LXS de RSU frescos y estabilizados. La actividad celulolítica fue medida por el método de la CE azul. Los productos de la hidrólisis de la CE fueron determinados por medio de la DQO. Los resultados mostraron que cuando los LXS se encuentran estabilizados la DQO no cambia. Además, la adición de LXS frescos mantiene la PC en densidades altas, esto posteriormente favorece la metanogénesis acelerada. Los análisis demostraron que la actividad celulolítica de las muestras de LXS tiene una relación directa con la DQO.

Los métodos genéticos son variados, permitiendo desde el estudio de los cromosomas hasta el análisis de una base nucleotídica y son requeridos con la finalidad de: aislar e identificar bacterias anaerobias termófilas que hidrolizan rápidamente la CE y analizar los productos de su descomposición. Lv *et al.* (2008) analizaron la degradación de CE en abono utilizando como fuente de carbono papel filtro. El aislamiento se realizó mediante la técnica de superposición de placa. La identificación se llevó a cabo por medio de secuenciación de ARDr 16S. Los productos de la degradación de la CE fueron analizados por cromatografía de gases. Los resultados mostraron que la técnica de superposición de placa es confiable para aislar géneros celulolíticos. Además, los géneros *Clostridiaceae* y *Acetivibrio spp* podrían poseer características genéticas, físicas y bioquímicas para degradar más rápidamente la CE. Encontraron que la producción de estas poblaciones bacterianas da lugar principalmente a acetato, propionato y butirato.

Pourcher *et al.* (2000) cuantificaron y caracterizaron la PC de los RSU de un RESA francés. Se analizaron 2 muestras frescas, 19 de un año y 8 de cinco años de haber sido recolectadas. La cuantificación de la PC se realizó por cuenta en placa utilizando celobiosa como única fuente de carbono, cuyo consumo se detectó por fluorescencia bajo luz UV; las placas donde detectó fluorescencia se transfirieron a un medio que contenía tiras de papel para cigarrillo y la degradación de la CE se detectó por

desaparición del papel. La identificación de las poblaciones se realizó por secuenciación de ADNr 16s. Los resultados mostraron cinco grupos celulolíticos predominantes, correspondientes a la familia *Bacillaceae* y los géneros *Cellulomonas*, *Microbacterium* y *Lactobacillus*. El número de PC varió de 1.1×10^6 a 2.3×10^8 UFC/g peso seco, siendo más bajas en las muestras de cinco años, donde básicamente había bacterias de la familia *Bacillaceae*.

Barlaz *et al.* (1997) caracterizaron la DBA de la fracción orgánica de los RSU empleando reactores anaeróbicos de 2 L. Las variables-respuesta fueron el consumo de la FO de los RSU, producción de CH_4 y la identificación de los componentes orgánicos con una mayor carga microbiana mineralizadora de dicha FO por NMP. Los autores reportaron una tendencia al incremento en la producción de CH_4 al aumentar el contenido de CE y HE, donde las PHe estuvieron presentes en todos los sustratos probados y la PC principalmente en pasto, hojas y tallos. En los desechos de comida no hubo PC ni metanogénicas.

El antecedente directo de este trabajo planteo el análisis en LBX del crecimiento de los grupos bacterianos: hemicelulolíticos, celulolíticos, acetogenos productores de H_2 , acetato y metanogenos de $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, implicados en la conversión de los RSU en CH_4 . Barlaz *et al.* (1989) el objetivo de su estudio fue caracterizar y hacer una nueva descripción de las fases de la DBA. Los estudios microbianos se hicieron por número más probable (NMP). Los metabolitos del proceso fueron analizados por cromatografía de gases y líquido. Los resultados mostraron que se consumió el 72% de la FO de los RSU con una correlación directa entre la densidad de PC y PHe con las fases de la DBA de RSU en LBX. La disminución inicial del pH de 7.5 a 5.7 fue derivada de la hidrólisis de la CE y HE que generan AO. El análisis microbiológico de las PC y PHe mostró una densidad de poblaciones de 5 y 7.5 NMP/mL respectivamente. Además, estas poblaciones aumentan después del establecimiento de las acetogénicas y metanogénicas cuando se redujo la concentración de AO.

Sin embargo, el reporte no responde que efecto causa las recirculación de lixiviados sobre las PC y PHe además de las que variables respuestas comúnmente utilizadas podrían estar arrojando resultados no muy certeros de la densidad de estas poblaciones, en esta investigación se pretende abordar estos puntos para intentar llenar los espacios vacíos en este tipo de estudios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y preparación del material de estudio

3.1.1. Toma de muestras de RESA de Pátzcuaro, Michoacán

Para la obtención de una muestra representativa de RSU de RESA de Pátzcuaro, se utilizó el método de cuarteo descrito en la NMX-AA-015-1985 (SEMARNAT, 2008) se obtuvieron 50 kg de RSU de la capa superficial del RESA, este material se colocó en bolsas de plástico negras selladas herméticamente y llevadas al laboratorio, cada bolsa se pesó, identificó y conservó a 4°C hasta su utilización.

3.1.2. Caracterización de la muestra y reducción de tamaño de subproductos

Para la caracterización los RSU se separaron en 27 subproductos con base en la NMX-AA-022-1985 (SEMARNAT, 2008) se homologó a lo realizado por el personal del Centro Integral de Tratamiento de Residuos (CITIRS). Pesada la muestra se obtuvo el porcentaje de cada subproducto y se reagruparon de acuerdo a sus propiedades químicas en los 15 rubros más representativos. Después de la caracterización y separación de los subproductos se les redujo el tamaño; papel, cartón, trapo, plástico, metales y pañal desechable se cortaron de manualmente hasta tener un tamaño menor a 1 cm, los materiales de construcción y vidrio se trituraron a un tamaño ≤ 0.5 cm, por último los residuos de jardinería y alimenticios se redujeron en un molino de cuchillas a un tamaño de ≤ 0.1 cm, de cada subproducto se pesó 28 veces la cantidad correspondiente al porcentaje de la caracterización y se almacenaron en bolsas de plástico independientes a 4 °C hasta el montado de los LBX. La Tabla 4 muestra los pesos y porcentaje de la mezcla de subproductos con los que se empacaron los LBX.

Tabla 4. Principales subproductos y concentración utilizada para la mezcla inicial de residuos sólidos urbanos en reactores escala laboratorio para la detección de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas

SUBPRODUCTOS	RSU	
	% p/p	g
Residuos alimenticios	34.25	73.71
Residuos de jardinería	31.86	68.56
Papel	5.97	12.84
Plástico de película	4.74	10.20
Poliétileno de alta densidad	3.81	8.21
Vidrio	3.48	7.49
Trapo	3.31	7.12
PET	2.67	5.75
Material de construcción	1.91	4.10
Pañal desechable	1.89	4.06
Material ferroso	1.76	3.78
Material no ferroso	1.31	2.83
Envase de cartón encerado	1.21	2.60
Cartón	1.07	2.30
Unicel	0.76	1.64
Total	100.00	215.19

% p/p, por ciento peso base húmeda

3.1.3. Determinación de humedad de residuos sólidos urbanos

El porcentaje de humedad en RSU se realizó conforme a la técnica 2540 G del Standard Methods de APHA, AWWA and WEF, 1998. Se requirió del siguiente equipo y material: balanza analítica (Explorer^R Pro), cápsulas de aluminio de 300 ml a peso constante, horno de secado circulación forzada (RIOSSA HCF-41) y desecador. Cada determinación se realizó por duplicado con 10 g de la muestra preparada de los 15 subproductos de RSU seleccionados; para el pesado se consideraron los cuatro dígitos

de la balanza analítica, las muestras se secaron en la estufa a 105°C/12 h, transcurrido el tiempo se colocaron en un desecador 30 min.

El porcentaje de humedad se determinó mediante el uso de la siguiente fórmula (Ecuación 1); para obtener G y G₁ se restó el peso de la cápsula de aluminio:

Ecuación 1.

$$H = \frac{G - G_1}{G} \times 100$$

Dónde:

H= Humedad en %

G= Peso de la muestra en g

G₁= Peso de la muestra seca en g

3.1.4. Determinación de pH de los residuos sólidos urbanos

El pH de la muestra de los RSU se realizó según la NMX-AA-25-1984 (SEMARNAT, 2008) con el siguiente equipo y material: potenciómetro (Conductronic PC18), balanza granataria (Socouth), agitadores magnéticos (HANNA Instrument), barras magnéticas octagonales recubiertas de teflón (Cienceware), vasos de precipitados de 250 ml, papel absorbente, solución amortiguadora pH 4.0 y 7.0 y agua destilada. El análisis se efectuó por duplicado después de calibrar el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras, se emplearon 10 g de la preparación de RSU, las muestras se colocaron en vaso de precipitados, se pesaron en la balanza granataría, se les agregó 90 ml de agua destilada y se agitaron 10 minutos (min), se dejaron reposar 30 min y se midió el pH.

3.2. Montado de LBX anaeróbicos escala laboratorio

3.2.1. Definición del diseño experimental

Para la fase experimental se consideró un diseño aleatorio con un número de repeticiones igual al número de tratamientos (Mongomery *et al.*, 2003). Para ello se prepararon 28 LBX; 7 como control y 21 con recirculación de LXS 2 veces por semana con bombas peristálticas de doble flujo (MASTERFLEX C/L 77120-62) o manualmente, para mantener la humedad en los RSU al 40, 60 y 80% (v/v de reactor) de acuerdo a la Tabla 5. El diseño experimental para el análisis de las PC y PHe se muestra en la Tabla 6.

Nota: Estas humedades se refieren a una humedad operacional. Los RSU inicialmente cargados contaban con un 50% de humedad (base húmeda) por lo que la recirculación de LXS significó para ellos un aumento en la humedad del sistema

Tabla 5. Tasas de recirculación de lixiviados

Tasa de recirculación (%V)	Volumen utilizado (2 mL/min)	Contenido de humedad teórica inicial (%Hbh)
40	165	88.34
60	248	107.62
80	330	126.68

Tabla 6. Diseño experimental para analizar la densidad de población bacteriana celulolítica y hemicelulolítica durante la descomposición anaeróbica de residuos sólidos urbanos a diferentes regímenes de recirculación de lixiviados

Periodos	Niveles de recirculación de lixiviados (% volumen)				Días de desmontado
	Control	40	60	80	
1					15 días
2					45 días
3					75 días
4					105 días
5					135 días
6					165 días
7					195 días

Los LBX fueron contruidos en PVC cédula 40 de 5 cm de diámetro por 18 cm de altura, cada uno contó con: domo, cuerpo, fondo, dos distribuidores con perforaciones de 3/8, 4 juntas de neopreno y 12 tornillos de 1/4 con tuercas y arandelas.

3.2.2. Preparación de mezcla y llenado de LBX

Se tomó una bolsa de cada uno de los 15 subproductos pesados, se vertieron en un vaso de precipitados de 2 L y se mezclaron, esto se realizó 1 vez por reactor. Cada LBX se empacó con la mezcla de RSU previamente descrita, se colocó una capa superficial de 32.15 g del mismo suelo usado en el CITIRS como material de cobertura y se compactó a 600 kg/m^3 . Los LBX se cerraron herméticamente sometidos a inyección con N_2 para desplazamiento del aire.

3.2.3. Montaje de biorreactores

Los 28 LBX se colocaron sobre una estructura metálica de cuadrado de $2.20 \times 2.20 \text{ m}$ mediante tensores de acero, cada LBX se conectó a un sistema de medición de biogás por desplazamiento de salmuera que consistió en dos frascos de vidrio; uno con 120 mL de salmuera saturada a pH 4.0 y otro vacío graduado de 10 en 10 hasta 120 mL, se les colocó tapones de hule con 2 varillas de vidrio y se conectaron entre sí.

Los LBX en la parte inferior tenían un frasco de vidrio graduado para medir la cantidad de LXS drenado, para la recirculación de LXS se unió el conector central de cada LBX con mangueras de látex y taygón a una bomba peristáltica de doble flujo como se muestra en la Figura 6 que esquematiza el sistema de recirculación de LXS y medición de biogás.

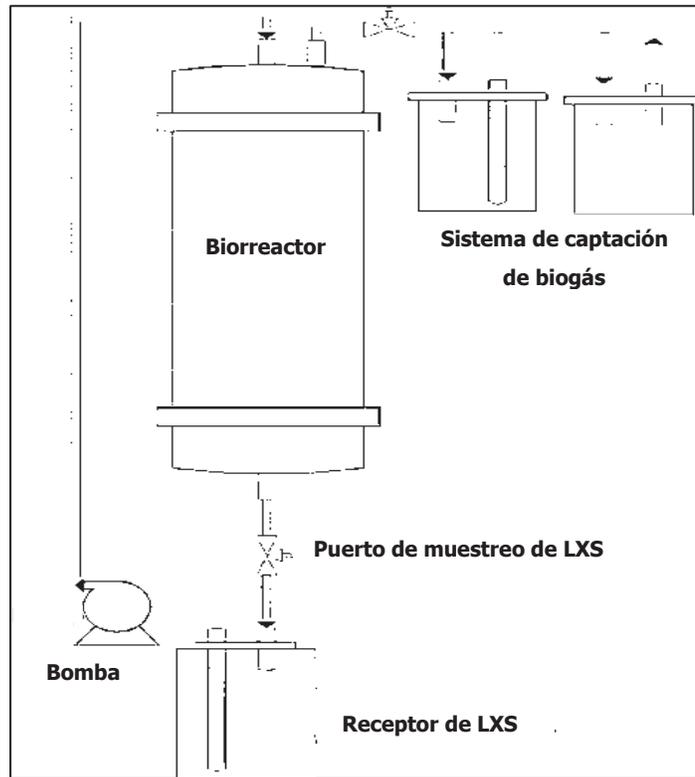


Figura 6. Sistema de recirculación de LXS para la determinación de la densidad de las PC y PHe en RSU

3.3. Puesta en marcha y seguimiento de operación

3.3.1. Recirculación de lixiviados y muestreo

La recirculación de LXS inició con adición de agua potable a cada LBx al 65, 70 y 75% Hbh con una velocidad de 2 mL/min, los LXS producidos se captaron en los frascos conectados en el fondo de cada LBx, de estos se tomaron respectivas muestras para c/análisis y el resto se vertió en el vitrolero de cada LBx donde inicialmente se habían depositado 4.12 L de H₂O, volumen equivalente a 10 veces el interno del cuerpo de un LBx, los primeros mL de agua adicionada a los LBx se tomaron de sus garrafas de vidrio previamente dispuestas. La recirculación de LXS se realizó c/lunes y jueves por 23

semanas, para ello los frascos con LXS colectados se desconectaron del fondo de los LBX, se tomó la muestra para análisis y se vertió lo restante en sus garrafas de vidrio. Cada recipiente se agitó para mezclar los LXS y se midió con una probeta los mL de recirculación, cada día de muestreo se desmontó 1 LBX de cada diferente régimen de humedad + 1 control, la toma se realizó hizo como se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Arreglo de identificación de muestras y días de desmote para la determinación de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas en los RSU

Identificación de muestra	Muestreo-desmote (día)	No. de LBX
T ₀ cobertura*	0	28
T ₀	3 (Sin desmote)	28
T ₁	15	24
T ₂	45	20
T ₃	75	16
T ₄	105	12
T ₅	135	8
T ₆	165	4
T ₇	195	0

*Suelo de cobertura del RESA.

3.3.2. Obtención de muestra para la cuantificación de las poblaciones bacterianas

Las muestras se obtuvieron el día del desmote de LBX. Se tomaron los frascos recibidores de LXS, se midió el volumen de líquido y se mezclaron los LXS del mismo régimen de humidificación en un vaso de precipitados de 1 L, se recibieron 80 mL de la mezcla de LXS en frascos Schott-Duran de 250 mL con tapa roscada de plástico estériles y etiquetados para almacenarse a 4°C hasta su uso.

3.3.3. Métodos microbiológicos para la determinación de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas

Para el análisis de las PC y PHe se emplearon medios de cultivo estándar y LXS enriquecidos. Los LXS de cada muestreo y el material de cobertura de RESA se usaron como inóculo. El conteo de las PC y PHe se realizó por NMP con 3 viales de 2ml por dilución, la repetición y cantidad de inóculo se efectuó según la Tabla 8.

Tabla 8. Cantidad de inóculo y concentración del medio de cultivo para la cuantificación de las poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas a diferentes niveles de humidificación vía recirculación de lixiviados

Concentración del medio de cultivo (0.9 mL)/cantidad de inóculo									
Humedad	Doble/1.0 mL			Normal/0.1 mL			Normal/0.01 mL		
	Replica			Replica			Replica		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
65%									
70%									
75%									

3.3.3.1. Variables respuesta consideradas

Para la cuantificación de PC se determinó la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-DNS, que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5-DNS bajo determinadas condiciones y que genera una coloración que se intensifica con la concentración de glucosa, la lectura de absorbancia se realizó en espectrofotómetro HACH DR2500 a 540 nm (Anexo I). También se tomaron como variables respuesta la desaparición o cambios en la celulosa y turbidez –nefelometría-en el medio de cultivo, en el caso de las PHe las variables respuesta fueron: el cambio en el pH y la turbidez.

3.3.3.2. Preparación del lixiviado como medio de cultivo anaeróbico.

Para el uso de LXS como medio de cultivo, este se esterilizó con filtros Millipore de 0.2 μm estéril. El LXS se guardó en un frasco Schott-Duran de 100mL estéril para su uso posterior con los viales.

3.3.3.3. Preparación del medio de cultivo anaeróbico para PC y PHe.

El medio de cultivo para las PC y PHe se preparó con base a Barlaz *et. al.*, en 1989 y se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Medio de cultivo para determinación poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas en RSU

Solución Mineral (g/L)	Ácido Nitrilotriacético, 15; FeSO ₂ ·7H ₂ O, 0.1; MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0.1; CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.17; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.1; ZnCl ₂ , 0.1; NiSO ₄ ·6H ₂ O, 0.026; CuCl ₂ , 0.02; H ₃ BO ₃ , 0.01; NaMoO ₄ ·2H ₂ O, 0.01; NaCl, 1.0; y Na ₂ SeO ₃ , 0.016.
Solución de Vitaminas (mg/L)	Biotina, 2; Ácido Fólico, 2; Hidrocloruro de Piridoxina, 10; Riboflavina, 5; Tiamina, 5; Acido Nicotínico 5; Ácido Pantoténico, 5; Vitamina B ₁₂ , 0.1; Ácido p- aminobenzoico, 5; y Ácido Tiótico, 5. (Puede ser sustituida por 1gr/L de extracto de levadura).
Solución de fosfatos (g/L)	KH ₂ PO ₄ , 16.1 y K ₂ HPO ₄ , 20.7. Almacenar bajo N ₂ , el agua destilada usada debe estar libre de CO ₂ .
Solución M3 (g/L)	NH ₄ Cl, 10; NaCl, 9; MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 g; y CaCl ₂ ·2H ₂ O, 1. Será almacenada bajo N ₂
Ácidos grasos volátiles (En 100 ml)	Ácido acético, 17ml; ácido fenilacético, 0.0068g; ácido 3- fenilpropionico, 0.0075g; ácido propiónico, 6ml; ácido butírico, 4ml; ácido isobutírico, 1ml; ácido n- valérico, 1ml; ácido iso-valérico, 1ml. El pH de la solución debe ser ajustado a 7.5 con NaOH.
Resazurin	Solución al 0.1% (w/v)
Hidrocloruro de Cisteína	Solución al 5% (w/v)
Na₂CO₃	Solución al 8% (w/v)

3.3.3.4. Medio de cultivo para la cuantificación de las poblaciones celulolíticas

La preparación se realizó de acuerdo a lo descrito en la Tabla 10, el pH se ajustó a 7.2 con NaOH al 6.5%. El medio de cultivo se hirvió 20 min con una corriente de N₂ en la parte superior hasta que el resazurin cambió de azul a rosa brillante. Una vez frío se agregó el Na₂CO₃ e hidrocloreuro de cisteína, se ajustó el pH a 6.6 con de HCl al 13.5%. Se vació en los viales y esterilizó en autoclave a 121°C/20 min. Se realizó una prueba de esterilidad a 41°C/24 h.

3.3.3.5. Medio de cultivo para la cuantificación de poblaciones hemicelulolíticas

Se utilizó el método de xilano basado en lo que reportaron Barlaz *et al.*, 1989 la preparación del medio de cultivo se describe en la Tabla 10. En la cuantificación de las PHe se empleó xilano como fuente de carbono y energía, su composición química fue la siguiente: glucosa 5.3%, xilosa 70.5%, arabinosa 8.6%, galactosa 2.2%. El pH se ajustó a 7.2 con NaOH al 6.5%, el medio de cultivo se hirvió 20 min con una corriente de N₂ en la parte superior hasta que el resazurin cambió de azul-violeta a rosa brillante. Una vez frío se agregó el Na₂CO₃ e hidrocloreuro de cisteína, se ajustó el pH a 6.6 con HCl al 13.5%. Se dispensó en los viales y se esterilizó en autoclave a 121°C/20 min. Se realizó una prueba de esterilidad a 41°C/24 h.

3.3.3.6. Enriquecimiento del lixiviado usado como medio anaeróbico para bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas

Para la cuantificación, se ajustaron las necesidades nutricionales de las PC y PHe en los LXS como medio de cultivo. Esto se hizo formulando el medio de la siguiente manera: 50% volumen de lixiviado y 50% de medio de cultivo estándar.

Tabla 10. Formulación de medios de cultivo para cuantificación de la población celulolítica y hemicelulolítica

Solución (ml/L de medio)	Medio de cultivo	
	Celulolítico	Hemicelulolítico
Fosfatos	100	100
M3	100	100
Mineral	10	10
Vitaminas	10	10
Resazurin	2	2
AGV	10	10
Celulosa/Xilano (g)	5	8
Na ₂ CO ₃	50	50
HC-Cisteína	10	10

3.3.3.7. Inoculación de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas

Esta maniobra se llevó a cabo en una campana estéril con flujo de aire laminar, luz ultravioleta y presencia de mechero de Bunsen. En los cultivos de PC y PHe los LXS se usaron como inóculo a excepción de la muestra T₀ en la que se empleó material de cobertura del RESA con medio de cultivo artificial. En la inoculación el LXS se trabajó a temperatura ambiente, se tomó el vial con medio de cultivo identificado recién esterilizado y se añadió el volumen correspondiente de LXS, se utilizó una capa de aceite mineral para asegurar la ausencia de O₂. Se incubó a 41°C/30 días.

4. Resultados y discusión

4.1. Dinámica de pH derivado de la descomposición bacteriana anaeróbica de RSU en matriz y LXS de LBX

El movimiento del pH determina el tipo de población involucrada a lo largo de las distintas etapas del proceso de descomposición bacteriana anaeróbica. El pH es un factor que establece la tasa de DBA, cada grupo bacteriano involucrado tiene un valor óptimo para su crecimiento y un intervalo fuera del cual la proliferación celular no se efectúa. En particular muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosas cuando el pH se encuentra entre neutro y alcalino (Jiunn-Jyi Lay *et al.*, 1996), esta fase hidrolítica es fundamental para el proceso de DBA.

Por otro lado, los grupos bacterianos que participan en la DBA se desarrollan favorablemente dependiendo del contenido de humedad, por lo que esta es una variable crítica en este proceso. El contenido de agua beneficia el movimiento de biomasa y nutrientes a través de la matriz de RSU (Ghosh, 1985), diluye la concentración de ácidos orgánicos y reduce la inhibición provocada por el descenso del pH (Barlaz, 1988). La presencia de agua en un RESA viene de diferentes fuentes: de manera intrínseca por la participación de los diferentes grupos bacterianos, descargas pluviales y la recirculación de LXS (Wreford, 2000).

La Figura 7 muestra la dinámica de pH de los LXS producidos por reactores bajo diferentes regímenes de recirculación. Los resultados corresponden con los valores típicos de pH donde valores ácidos iniciales se recuperan para permitir el establecimiento de la fase metanogénica. Es importante señalar que esta dinámica es semejante para todos los regímenes de humedad.

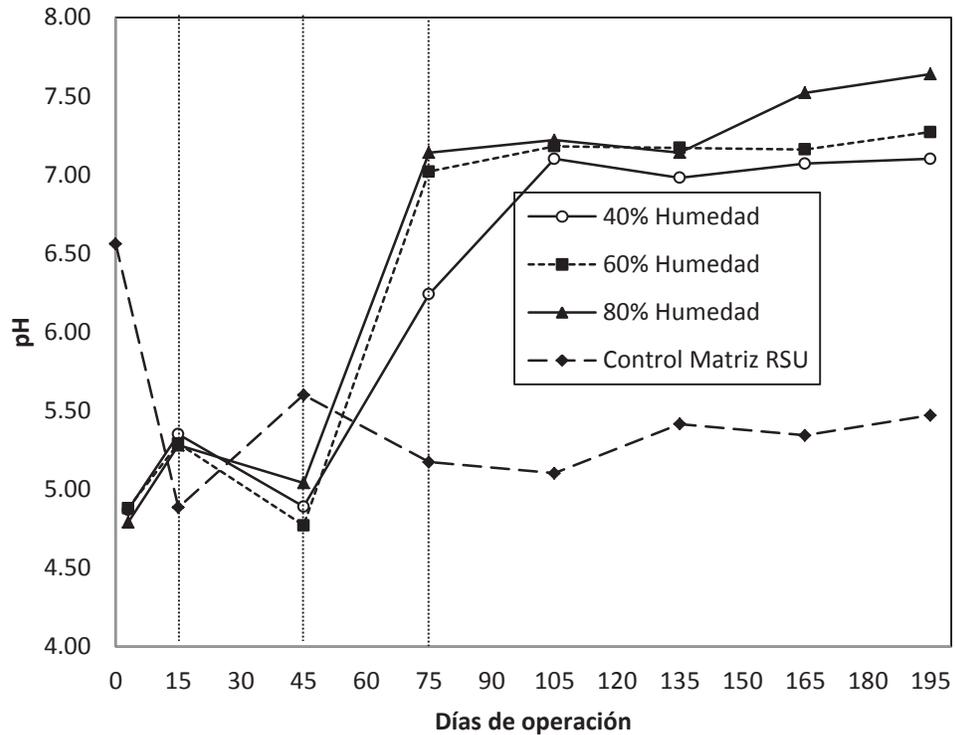


Figura 7. Dinámica del pH derivado de la descomposición anaeróbica de la fracción orgánica en RSU en lixiviados de LBX a diferentes regímenes de humedad

4.2. Análisis de poblaciones celulíticas en DBA de RSU a diferentes regímenes de humedad vía recirculación de LXS

La DBA de RSU se efectúa en varias fases –dependiendo del autor- pueden ser 4 ó 5 e incluyen la fase de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Pohland, 1992; Barlaz, 1989). En este trabajo en particular se considera la primera fase o de hidrólisis que es donde se lleva la lisis de polímeros orgánicos convirtiéndose estos a dímeros y monómeros: azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc. Las bacterias involucradas en esta fase se clasifican según el complejo multienzimático que generan.

Durante la hidrólisis participan los grupos bacterianos encargados de la descomposición de la CE, estos rompen los enlaces transversales entre cadenas para

dar paso a la celobiosa y posteriormente a la glucosa que terminará formando ácidos orgánicos. En el caso de las hemicelulosas se fragmentan los polímeros al azar para posteriormente extraer un solo dímero o monómero del extremo de la cadena del polisacárido y generar pentosas, hexosas y ácidos urónicos (Alexander, 1980). La FO de los RSU está constituida por CE 40-50%, HE 10-12%, entre otros compuestos, de ahí el interés de este estudio.

4.3. Comparación de cuantificación por distintos medios de cultivo

4.3.1. Uso de medios de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos para cuantificación de poblaciones celulolíticas

Los medios de cultivo estándar son ambientes artificiales diseñados por el hombre para proporcionar todas las sustancias necesarias para el crecimiento microbiano, este apartado refiere al medio descrito en la sección 3.3.3.3.

En la Figura 8 se muestra la dinámica de acumulado de densidades de PC a diferentes porcentajes de humedad utilizando medios de cultivo estándar y LXS enriquecidos para el cultivo. En 8a se indica que independientemente del régimen de humedad las poblaciones crecen en menor proporción conforme transcurre el experimento. Esto se relaciona con las fases de la DBA esquematizadas por la dinámica de pH (Figura 7) donde se muestra que el proceso de digestión incluyó al menos la fase de hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis acelerada y estable. Por su naturaleza la fase de hidrólisis se relaciona con los valores más elevados de poblaciones celulolíticas, por ejemplo la densidad al 40% de humedad fue de 21 NMP/mL. Además, el NMP/g para el suelo de cobertura fue de 460 lo que indica que el suelo interviene como fuente de bacterias celulolíticas, como lo reportan diversos autores (Tabla 11). Es importante señalar que en la Figura 8b en donde se muestran las densidades de PC con medio de cultivos LXS enriquecidos, se observa que las poblaciones crecen constantemente

conforme transcurre el experimento en todos los regímenes de humedad; y aunque las tendencias también muestran que las mayores poblaciones se encuentran en el régimen del 40%, todas las cuantificaciones son menores cuando se usa el medio de cultivo con lixiviado enriquecido (Figura 8b). Estos resultados fueron inesperados dado que la presencia del LXS en el medio de cultivo aceleran el proceso de adaptación a los diferentes porcentajes de humedad de las PC además de reducir del choque inicial ocasionado por la recirculación de LXS y el ajuste del pH entre el medio estándar y los LXS (Barlaz, 1989).

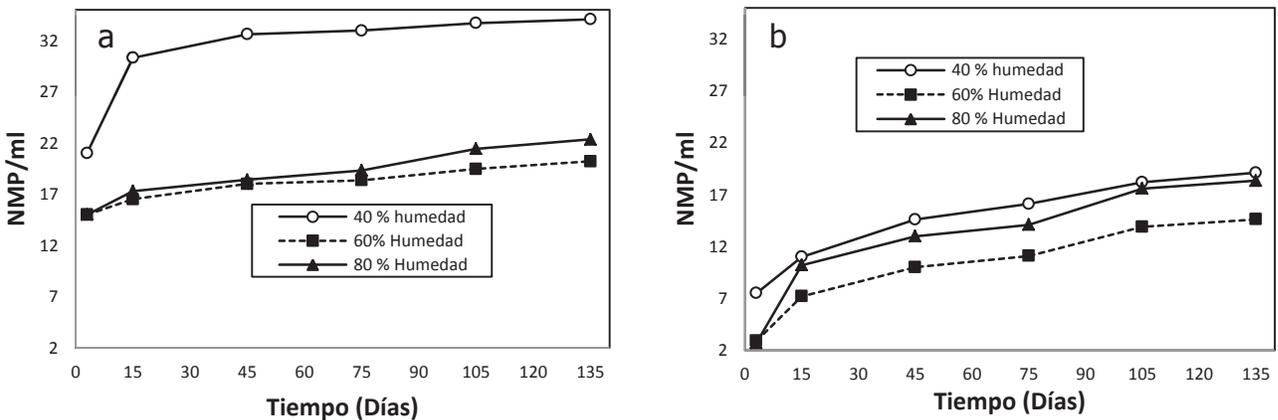


Figura 8. Comparación de acumulados de poblaciones celulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido

Tabla 11. Poblaciones celulolíticas anaeróbicas en suelos usando NMP

Material	Densidad de poblaciones (g suelo seco)	Método	Referencia
Material de cobertura RESA	460 NMP	NMP	Este trabajo
Material de cobertura RESA	3.6×10^2 UFC	NMP	Qian & Barlaz, 1996
Suelo cultivado con trigo	409×10^3 UFC	NMP	Carillo, 2003
Suelo cultivado con trigo	10×10^3 NMP	NMP	Dioma & Ballati, 1998

Con el medio de cultivo estándar, la PC del régimen de humedad al 40% crecieron en mayor cantidad durante los primeros 15 días. Sin embargo, este aumento en las poblaciones a partir de este punto y hasta el día 135 solo fue de 30 a 34 NMP/mL. En los regímenes de humedad del 60 y 80% el crecimiento de las poblaciones fue constante desde el día 3 al 135 aunque con un incremento de tan solo 15 a 20 NMP/mL en el régimen del 60% y de 15 a 22 NMP/mL en régimen del 80% (Tabla 12). Independiente al medio de cultivo, la cuantificación de PC fue menor que en su contraparte del 40%, es posible que esto se deba a que en el régimen de 40% de humedad -en las condiciones de este experimento-, la humedad proporcionada al sistema significa que la matriz de RSU tiene una humedad de 90% (Hbh) suficiente para permitir un crecimiento de PC mayor que en los biorreactores en que las humedades rebasaban el 100% (Jiunn-Jyi Lay *et al.*, 1996) como se muestra en la Tabla 5. Adicionalmente la Tabla 12 muestra las diferencias significativas que existen entre los distintos regímenes de humedad y medios de cultivo.

Tabla 12. Densidad de poblaciones celulolíticas en lixiviados producidos por la descomposición anaeróbica de FO de RSU en LBX a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y medio de cultivo lixiviados enriquecidos.

Día de muestreo	Medio de cultivo estándar			Medio de cultivo lixiviado enriquecido		
	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)
<i>Hidrólisis</i>						
3	21 ^a	15 ^b	15 ^b	7.5 ^a	2.9 ^b	2.7 ^c
15	9.3 ^a	1.5 ^b	2.3 ^c	3.5 ^a	4.3 ^b	7.5 ^c
<i>Acidogénesis</i>						
45	2.3 ^a	1.5 ^b	1.1 ^c	3.6 ^a	2.8 ^b	2.8 ^b
<i>Metanogénesis</i>						
75	0.36 ^a	0.36 ^a	0.92 ^b	1.5 ^a	1.1 ^b	1.1 ^b
105	0.74 ^a	1.1 ^b	2.1 ^c	2.1 ^a	2.8 ^b	3.5 ^c
135	0.36 ^a	0.74 ^b	0.92 ^c	0.92 ^a	0.72 ^b	0.74 ^b

**Tukey 0.05 letras iguales = no existe diferencias significativas entre regímenes. La división por fases de DBA se hizo de acuerdo a lo reportado por Hernández-Berriel, 2010*

4.4. Asignación de positivo con nueva variable respuesta para la prueba NMP

El método de NMP es una estrategia eficiente de estimación de densidades bacterianas cuando una evaluación cuantitativa de células no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (+/-) en réplicas de diluciones consecutivas de microorganismos. En esta investigación el inoculo y los LXS presentan interferencias visuales que enmascaran o entorpecen las lecturas de los positivos comúnmente usados, además, estas consideraciones visuales pueden ser subjetivas o parcializadas de acuerdo al criterio del analista, al igual que cuando se determina de manera visual la desaparición física de la CE y la turbidez en los tubos. De aquí la necesidad de implementar nuevas variables respuestas, en el caso de las PC se propuso utilizar (i) la formación de azúcares reductores derivados de la degradación de la CE por el método del 3,5-DNS y (ii) el cambio de pH producto de la descomposición de las HE.

El método de 3,5-DNS se basa en la reducción del DNS (amarillo) por la glucosa al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse por lectura de absorbancia en la zona de 540-570 nm (Casablanca-Alarcón *et al.* 2009). Al mejor conocimiento del autor este método no se ha utilizado para proveer una respuesta al usar NMP.

En la Figura 9 se muestra la dinámica de densidades de PC a diferentes porcentajes de humedad utilizando medios de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos para el cultivo con variable respuesta 3,5-DNS. Las enumeraciones revelan valores mayores en comparación con los obtenidos con la variable respuesta anterior en todos los regímenes de humedad con los dos medios de cultivo. Es evidente que el método de NMP puede usarse con una mayor sensibilidad usando el método 3,5-DNS como variable respuesta, en comparación con lo obtenido de forma visual. Además, las PC se detectaron en mayor cantidad en el medio de cultivo estándar.

En la Figura 9a se observa que las mayores poblaciones se encuentran en el régimen del 40% seguidas del 60 y 80%, es decir, mientras menor sea el volumen de recirculado, mayor son las PC detectadas. El análisis estadístico (Tabla 14) muestra que solo en el día 3 y 45 las PC de los regímenes de humedad del 60 y 80% no tienen diferencias significativas. La Figura 9b señala lo inverso a 9a; lo cual indica que cuando el método se vuelve más preciso es posible identificar el efecto real de la inclusión de lixiviados en el medio de cultivo. Más aun, a pesar de que las enumeraciones en medio con lixiviado son menores, el régimen del 60% mantiene un resultado similar a aquel identificado usando el medio de cultivo estándar y las diferencias entre los regímenes de humedad son menores. En 9b también se observan menores diferencias entre regímenes de humedad durante la fase hidrolítica, posiblemente debido a que los LXS del medio de cultivo aceleraron el proceso de adaptación de la PC a los diferentes porcentajes de humedad además de reducir del choque inicial ocasionado por la recirculación de LXS y el ajuste del pH entre el medio estándar y los LXS (Gildardo,

2001; Flotats *et al.*, 1997). Se observa que en los regímenes de humedad del 40 y 80% no existe diferencia estadística significativa en los días 3 y 105. Esto mismo ocurre con los valores del 60 y 80% de humedad los días 15, 75 y 135 (Tabla 13).

La Tabla 13 muestra algunos valores de PC reportados en diversos ambientes anaerobios. Es importante señalar que (al mejor conocimiento del autor), existen muy pocos reportes donde se enumere PC en RSU y son virtualmente inexistentes en lixiviados, los reportes son más abundantes se refieren a PC en rumiantes, suelos, intestinos de cerdos y aguas residuales. Además, existe una amplia heterogeneidad en las unidades reportada, lo que dificulta la comparación. De cualquier manera, las poblaciones enumeradas a partir de RSU son sensiblemente menores que en las contrapartes mencionadas. Las enumeraciones reportadas en este trabajo se llevaron a cabo en lixiviados y debe señalarse que se incluye la fase hidrolítica de la DBA, mientras que otros trabajos estudian mayoritariamente RSU frescos.

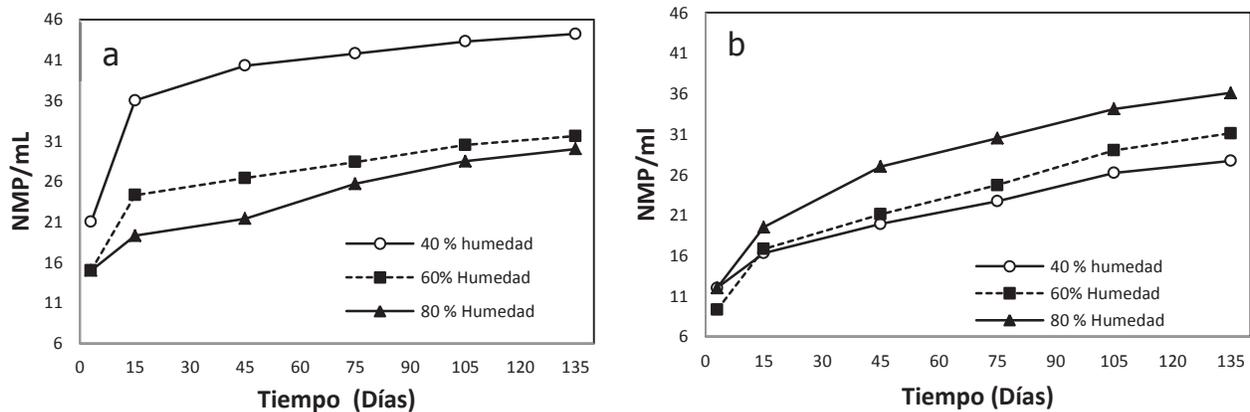


Figura 9. Comparación de acumulados de poblaciones celulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido. Variable respuesta utilizada: 3,5-DNS.

Tabla 13. Poblaciones celulolíticas en ambientes sujetos a digestión anaerobia

Material	Densidad de poblaciones	Método	Referencia
Lixiviados de RSU - 40% humedad	41 NMP/mL	NMP	Este trabajo
Lixiviados de RSU - 60% humedad	31 NMP/mL	NMP	Este trabajo
Lixiviados de RSU - 80% humedad	30 NMP/mL	NMP	Este trabajo
Rumen	9.5 log células/mL	Tubos de Hungate	Frédérique <i>et al.</i> , 2001
Desechos de ingenios	7.5x10 ³ NMP/g seco	NMP	Sánchez-Gómez, 2009
Rumen	3.4x10 ⁷ UFC/g	Tubos de rollo	Varel <i>et al.</i> , 1989
Intestino de cerdos	5.2x10 ⁹ bacteria/g seco	Platos de agar	Tala <i>et al.</i> , 1989
Suelo	409x10 ³ UFC/ g seco	NMP	Carrillo, 2003
RSU	1.83 log células/g seco	NMP	Márquez-Benavides, 2004
RSU de vehículo/recolección	3 log células/g seco	NMP	Jones <i>et al.</i> , 1983
RSU de vehículo/recolección	< 0.6 log células/g seco	NMP	Qian & Barlaz, 1996
RSU de RESA	2.4 log células/g seco	NMP	Qian & Barlaz, 1997
RSU de RESA	5 log células/g seco	NMP	Barlaz <i>et al.</i> , 1989
RSU de RESA	No detectado	Tubos de Hungate	Suflita <i>et al.</i> , 1992
RSU de matriz de RESA	No detectado	Tubos de rollo	Palmisano <i>et al.</i> , 1993
RSU frescos de RESA	4.4x10 ⁷ UFC/g seco	Platos de agar	Pourcher <i>et al.</i> 2001
RSU 5 años de RESA	0.56x10 ⁷ UFC/g seco	Platos de agar	Pourcher <i>et al.</i> 2001

Tabla 14. Densidad de poblaciones celulolíticas en lixiviados producidos por la descomposición anaeróbica de FO de RSU en LBX a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y medio de cultivo lixiviados enriquecidos. Variable respuesta 3,5 DNS.

Día de muestreo	Medio de cultivo estándar			Medio de cultivo lixiviado enriquecido		
	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)
<i>Hidrólisis</i>						
3	21 ^a	15 ^b	15 ^b	12 ^a	9.3 ^b	12 ^a
15	15 ^a	9.3 ^b	4.3 ^c	4.3 ^a	7.5 ^b	7.5 ^b
<i>Acidogénesis</i>						
45	4.3 ^a	2.1 ^b	2.1 ^b	3.6 ^a	4.3 ^b	7.5 ^c
<i>Metanogénesis</i>						
75	1.5 ^a	2 ^b	4.3 ^c	2.8 ^a	3.6 ^b	3.5 ^b
105	1.5 ^a	2.1 ^b	2.8 ^c	3.5 ^a	4.3 ^b	3.6 ^a
135	0.92 ^a	1.1 ^b	1.5 ^c	1.5 ^a	2.1 ^b	2 ^b

*Tukey 0.05 letras iguales = no existe diferencias significativas entre regímenes. La división por fases de DBA se hizo de acuerdo a lo reportado por Hernández-Beriel, 2010

4.5. Análisis de poblaciones hemicelulolíticas en DBA de RSU a diferentes regímenes de humedad vía recirculación de LXS.

Las hemicelulosas consisten de polímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico). Son representadas principalmente por el xilano y este es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La estructura del xilano no es homogénea y dependiendo de la fuente natural su estructura varía desde una cadena lineal hasta polisacáridos altamente ramificados (Casablanca *et al.*, 2009; Mayorga *et al.*, 2005). La degradación del xilano requiere de un complejo de enzimas que actúan de una manera cooperativa para convertirlo en constituyentes más simples. La corteza de los árboles y la paja contienen hasta 30% de xilano, la madera de coníferas 7-12%, la de árboles de hojas caducas 20-

25% y representa hasta el 12% de la FO de RSU de RESA (Carillo, 2003). Derivado de esto es la importancia de su estudio.

4.5.1. Dinámica de la densidad de PHe a diferentes porcentajes de humedad vía recirculación de lixiviados en medios de cultivo estándar.

La Figura 10 muestra la dinámica de densidades de PHe a diferentes porcentajes de humedad utilizando medios de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos para el cultivo. El NMP/g para el suelo de cobertura fue de 210 (Tabla 15). Pero podría ser que una alta densidad de PHe en el suelo de cobertura no participe como fuente de bacterias hemicelulolíticas, contrario a lo encontrado con las PC.

Durante la hidrólisis de los RSU las PHe presentan valores de 1 – 8 NMP/mL, con valores máximos en la fase metanogénica de 13 NMP/mL, menores a lo encontrado con las PC.

En la Figura 10a las PHe tienen una relación inversamente proporcional al volumen usado para recircular. De acuerdo a la Tabla 17, no existe diferencia significativa entre los regímenes del 40 y 60% de humedad en la primera y última medición. En el medio de cultivo estándar al 80% de humedad las PHe detectadas fueron las más bajas con tan solo 5 NMP/mL. De igual manera, la Figura 10b muestra los resultados obtenidos al usar medio de cultivo de LXS enriquecido, de donde se observa una mayor detección que al usar solo el medio estándar. En este caso, las mayores poblaciones detectadas pertenecían al régimen de 60%. En la fase hidrolítica las poblaciones del 60 y 80% no muestran diferencia estadísticas significativas (Tabla 17).

En 10b se encuentra que las poblaciones que están en mayor cantidad son las del régimen de humedad del 60% seguida del 80 y 40%. Es interesante observar que estas dos últimas alcanzan valores similares para el día 135. La Tabla 16 muestra algunos valores de PHe reportados en diversos ambientes anaerobios.

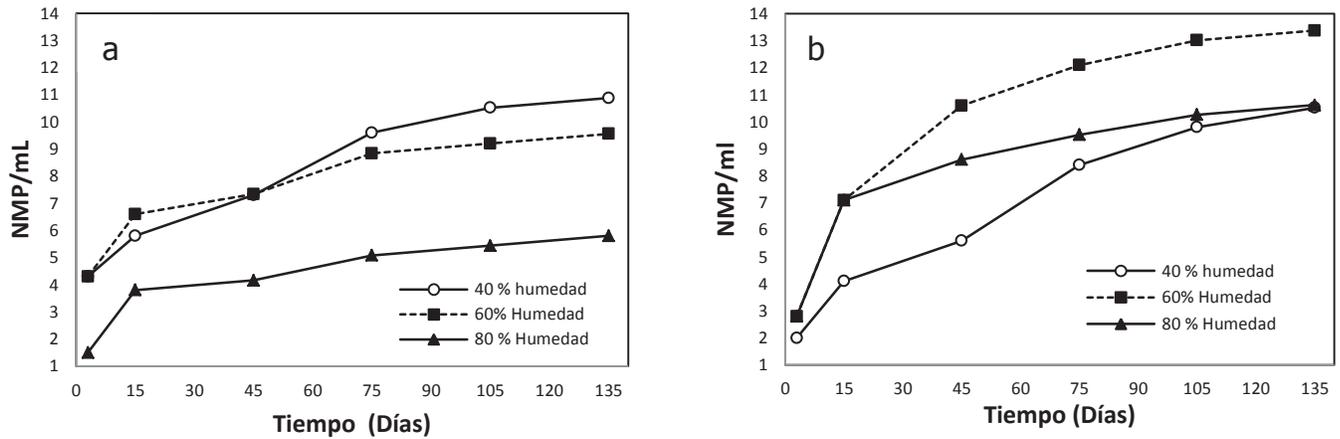


Figura 10. Comparación de acumulados de poblaciones hemicelulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido

Tabla 15. Poblaciones hemicelulolíticas anaeróbicas en suelos usando NMP

Material	Densidad de poblaciones (g suelo seco)	Método	Referencia
Suelo de cobertura RESA	210 NMP	NMP	Este trabajo
Suelo de cobertura RESA	160 células	NMP	Qian & Barlaz, 1996

Tabla 16. Poblaciones hemicelulolíticas en ambientes sujetos a digestión anaerobia

Material	Densidad de poblaciones	Método	Referencia
Lixiviados de RSU - 40% humedad	10.88 NMP/mL	NMP	Este trabajo
Lixiviados de RSU - 60% humedad	9.56 NMP/mL	NMP	Este trabajo
Lixiviados de RSU - 80% humedad	5.8 NMP/mL	NMP	Este trabajo
RSU de RESA	7.5 log células/g seco	NMP	Barlaz <i>et al.</i> , 1989
Rumen	2.7x10 ⁹ células/mL	Platos de agar	Leedle <i>et al.</i> , 1982
Heces fecales humanas	10.3 NMP/mL	NMP	Wedekind <i>et al.</i> , 1988
Residuos de jardín	1x10 ⁹ células/g seco	NMP	Qian & Barlaz, 1996

Tabla 17. Densidad de poblaciones hemicelulolíticas en lixiviados involucradas en la descomposición anaeróbica de FO de RSU en LBX a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y lixiviados enriquecidos

Día de muestreo	Medio de cultivo estándar			Medio de cultivo lixiviado enriquecido		
	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)
<i>Hidrólisis</i>						
3	4.3 ^a	4.3 ^a	1.5 ^b	2 ^a	2.8 ^b	2.8 ^b
15	1.5 ^a	2.3 ^b	2.3 ^b	2.1 ^a	4.3 ^b	4.3 ^b
<i>Acidogénesis</i>						
45	1.5 ^a	0.74 ^b	0.36 ^c	1.5 ^a	3.5 ^b	1.5 ^a
<i>Metanogénesis</i>						
75	2.3 ^a	1.5 ^b	0.92 ^c	2.8 ^a	1.5 ^b	0.92 ^c
105	0.92 ^a	0.36 ^b	0.36 ^b	1.4 ^a	0.92 ^b	0.74 ^c
135	0.36 ^a	0.36 ^a	0.36 ^a	0.72 ^a	0.36 ^b	0.36 ^b

*Tukey 0.05 letras iguales = no existe diferencias significativas entre regímenes. La división por fases de DBA se hizo de acuerdo a lo reportado por Hernández-Berriel, 2010

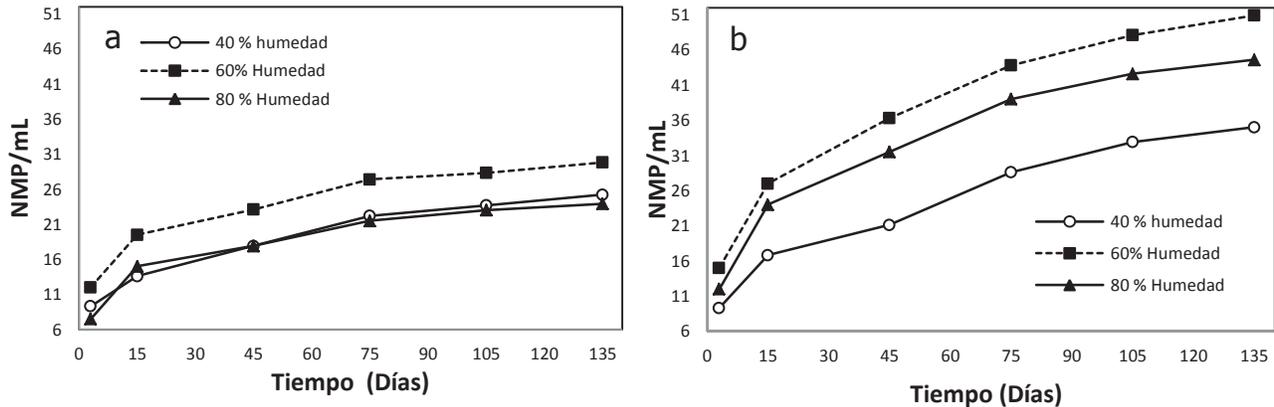


Figura 11. Comparación de densidades acumuladas de poblaciones hemicelulolíticas a diferentes porcentajes de humedad: (a) Medio de cultivo estándar (b) Medio de cultivo lixiviado enriquecido con variable pH

La Figura 11 muestra las enumeraciones de PHe usando el pH como variable respuesta para el método NMP. Esta variable permitió obtener enumeraciones \geq que las obtenidas por el método visual. En general, tras analizar y comparar las PHe usando ambos medios y ambos métodos de variable respuesta, las PHe del régimen del 60% se presentan en mayor cantidad, a excepción del resultado en el medio de cultivo estándar y método visual; aunque la sensibilidad de usar pH como variable respuesta respalda de manera consistente el resultado. La Tabla 18 muestra que al inicio de la experimentación todas las poblaciones detectadas tienen diferencias significativas, y de igual manera lo son al cambiar a la fase acidogénica (día 45).

Tabla 18. Densidad de poblaciones hemicelulolíticas en lixiviados involucradas en la descomposición anaeróbica de FO de RSU en LBX a diferentes porcentajes de humedad con medio de cultivo estándar y lixiviado enriquecido con variable respuesta pH

Día de muestreo	Medio de cultivo estándar			Medio de cultivo lixiviado enriquecido		
	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)	40% (NMP/mL)	60% (NMP/mL)	80% (NMP/mL)
<i>Hidrólisis</i>						
3	9.3 ^a	12 ^a	7.5 ^b	9.3 ^a	15 ^b	12 ^c
15	4.3 ^a	7.5 ^b	7.5 ^b	7.5 ^a	12 ^b	12 ^b
<i>Acidogénesis</i>						
45	4.3 ^a	3.6 ^b	2.9 ^c	4.3 ^a	9.3 ^b	7.5 ^c
<i>Metanogénesis</i>						
75	4.3 ^a	4.3 ^a	3.6 ^c	7.5 ^a	7.5 ^a	7.5 ^a
105	1.5 ^a	0.92 ^b	1.5 ^a	4.3 ^a	4.3 ^a	3.6 ^b
135	1.5 ^a	1.5 ^a	0.92 ^b	2.1 ^a	2.8 ^b	2 ^a

**Tukey 0.05 letras iguales = no existe diferencias significativas entre regímenes. La división por fases de DBA se hizo de acuerdo a lo reportado por Hernández-Berriel, 2010*

5. Conclusiones

El material de cobertura es importante en el proceso de degradación de materia orgánica en LBX en términos de aporte de PC. y es posible que sea un factor para el establecimiento de la fase hidrolítica de la DBA.

La distribución no homogénea de la celulosa y hemicelulosas en la matriz de los LBX y su interacción física con la lignina hacen que diferentes regímenes de recirculación de lixiviados influyan la densidad de PC y PHe durante la DBA.

Las evidencias sugieren que la utilización de un método subjetivo (visual) enmascara los resultados de las tendencias de densidades de PC y PHe genera un enumeración inexacta; mientras que métodos cuantificables para la medición de las variables respuesta permiten una enumeración precisa de las poblaciones en estudio.

En un bioreactor escala laboratorio de residuos sólidos urbanos utilizado para el conteo de variables respuestas visuales, la recirculación de lixiviados del régimen del 40% de humedad permitió la mayor enumeración de poblaciones celulolíticas independientemente del medio de cultivo (estándar y lixiviado enriquecido).

Al utilizar el método del 3,5-DNS para la variable respuesta de la actividad PC con el medio de cultivo estandar, la recirculación de lixiviados del 40% permitió detectar la mayor PC. Al usar el medio de cultivo lixiviado enriquecido, la mayor cuantificación se reflejó con el régimen del 80% de recirculación de lixiviados.

Al comparar las PHe de los diferentes regímenes de recirculación de lixiviados, se demostró que las del régimen de humedad del 60% eran mayores al enumerarse con las variables respuesta pH y detección visual del crecimiento.

6. Validación de objetivos

Objetivo general

Analizar los cambios de densidad bacteriana celulolítica y hemicelulolítica en la descomposición de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos a diferentes regímenes de recirculación de lixiviados.

Objetivos específicos

Estudiar cambios en las poblaciones bacterianas dominantes en función del régimen de recirculación de lixiviados.

- ✓ OBJETIVO CUMPLIDO a través de la técnica del NMP.

Evaluar la liberación de azúcares reductores como variable respuesta para la cuantificación de poblaciones celulolíticas y el uso del pH para las hemicelulolíticas.

- ✓ OBJETIVO CUMPLIDO a través del método del ácido 3,5-DNS y pH potenciométrico.

7 Validación de hipótesis

Hipótesis

En un biorreactor a escala de un relleno sanitario, el volumen de lixiviados recirculados influye en la densidad de poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas.

- ✓ HIPOTESIS VALIDADA para las poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas.

8 Recomendaciones

- Estandarización del método del 3,5-DNS como variable respuesta para la determinación de PC.
- Implementar el método de 3,5-DNS para la determinación de las PHe.
- Contabilizar el consumo de los sustratos a lo largo de la DBA para encontrar una relación con la densidad de poblaciones.
- Relacionar las densidades bacterianas con la producción de biogás y otros parámetros fisicoquímicos de la DBA.
- Acortar los tiempos de muestreo para la determinación de PC y PHe.
- Utilizar lixiviados frescos y maduros provenientes de un RESA para las recirculaciones.
- Evaluar el impacto de la carga orgánica en las poblaciones bacterianas involucradas en la DBA de RSU.
- Utilizar métodos enzimáticos para medir la actividad de las poblaciones involucradas en la DBA de la FO de RSU.

9 REFERENCIAS

1. Alexander, M. 1980. Introduction to soil microbiology. Microbiology of cellulose. Chapter 10. Edit. John Wiley and Sons, Inc. 163-178
2. Bagnara, C.R., Toci, C.G., Belaich, J.P. 1985. Isolation and characterization of a cellulolytic microorganisms *Cellulomonas fermentans* sp. nov. International journal of systematic bacteriology, 35:502-507.
3. Barlaz, M.A., Ham, R.K. and Schaefer, D. M. 1989. Mass balance analysis of anaerobically decomposed refuse. Journal of Environmental Engineering. 115: 1088–1103.
4. Barlaz, M.A., Qian, X., Eleazer, W.E., Odle, W.S., and Wang Y-S. 1997. Biodegradative analysis of municipal solid waste in laboratory-scale landfills. Research and development. EPA/60D/SR-97/071. 1-6
5. Barlaz, M.A., Schaefer, D. M., and Ham, R.K. 1989^b. Bacterial Population Development and Chemical Characteristics of Refuse Decomposition in a Simulated Sanitary Landfill. Applied and Environmental Microbiology. 55:55-65.
6. Barlaz, M.A., Ham, R.K. & Schaefer, D. M. 1990. Methane production from municipal refuse: A review of enhancement techniques and microbial dynamics. Critical Review of Environmental Control. 19: 557–584.
7. Battersby, N. S. y Wilson, V. 1989. Survey of the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals in Digestion Sludge. Applied and environmental microbiology. 55: 433-4310.

8. Boone, D. & Bryant, M. 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov.gen.nov., from methanogenic ecosystems. Applied and environmental microbiology. 40(3): 626-632.
9. Boone, D., Xun, L. 1987. Effects of pH, temperature and nutrients on propionate degradation by methanogenic enrichment culture. Applied and environmental microbiology. 53(3): 1589-1592.
10. Cairó, J.J. & París, J.M. 1988. Microbiología de la digestión anaerobia, metanogénesis. 4o Seminario de depuración anaerobia de aguas residuales. Valladolid 41-51.
11. Campbell, D. J. V., E. R. Fielding and D. B. Archer. 1985. Understanding refuse decomposition practices to improve landfill gas energy potential, pp. 1151-1155. In W. Palz (ed.), Proceedings of Energy from Biomass, Third EC Conference, Venice, Italy, Elsevier Science Publishing, London, England.
12. Casablanca-Alarcón, E., Ríos-Manríquez N., Álvarez M.A., Terrazas-Siles E. 2009. Optimization of anaerobic thermophilic culture conditions for increasing xylanase enzyme production with encapsulated and free bacteria strains. BIOFARBO. 17(2): 51-59
13. Colberg, P.J. 1998. Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. In: Zehnder A.J.B. (ed.): Biology of Anaerobic Microorganisms, 333–372. Wiley-Liss, New York, USA.
14. Cook, H. A., Cromwell, L. and Wilson, H. A. (1967). Microorganisms in household refuse and seepage water from sanitary landfills. *Proceedings of the West Virginia Academy of Sciences* 39: 107-114

15. Donnelly, F. A., and P. V. Scarpino. 1984. Isolation, characterization and identification of microorganisms from laboratory and full scale landfills. EPA Project Summary. EPA 600/S2-84-119. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. USA
16. Ferguson, T. & Mah, R. 1983. Effect of H₂-CO₂ on Methanogenesis from Acetate or Methanol in *Methanosarcina* spp. Applied Environmental Microbiology. 46(2): 348–355.
17. Fielding, E. T., and D. B. Archer. 1986. Microbiology of landfill. Identification of methanogenic bacteria and their enumeration. Institution of Chemical Engineers Symposium Series. 96: 331-341
18. Francois, V.; Feuillade, G.; Matejka, G.; Lagier, T.; and Skhiri, N., B.E. (2007) Leachate recirculation effects on waste degradation: Study on columns. Waste management, 27: 1259-1272
19. Ghosh, S. 1985. Solid-phase methane fermentation of solid wastes. Journal of energy resources technology. 107: 402-405.
20. Gurijala, K.R. & Suflita, J.M. 1993. Environmental factors influencing methanogenesis from refuse in landfill samples. Environmental Science and Technology. 27: 1176–1181.
21. Hernandez-Berriel M. C. 2010. Estabilización acelerada de residuos sólidos urbanos mediante la recirculación de lixiviados. Tesis Doctoral del Institucional en Ciencias Biológicas, UMSNH (Inédita)-

22. Hill, D.T. 1982. A comprehensive dynamic model for animal waste methanogenesis. *Transactions of the ASAE*, 25: 1374-1380.
23. Hill, D.J. & Nakano, K. 1984. Effects of particle size on anaerobic digestion of tomato solid wastes. *Agricultural Wastes*. 10: 285-295.
24. INEGI (2008). Generación de residuos sólidos urbanos por tipo de basura, 1996 a 2006. <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mamb57&s=est&c=6119>. Último acceso: 09.13.2009
25. Jokela, J.P.Y., R.H. Kettunen, and J.A. Rintala, 2002. Methane and leachate pollutant emission potential from various fractions of municipal solid waste (MSW): Effects of source separation and aerobic treatment. *Waste Management and research* 20: 424–433.
26. Kjeldsen, P. and M. Christophersen, 1999. Composition of Leachate from Old Landfills in Denmark. *Waste management and research*, 19: 249-256.
27. Komilis, D. P., R. K. Ham and R. Stegmann. 1999. The effect of landfill design and operation practices on waste degradation behavior: a review. *Waste Management and research* 17: 20-26.
28. Lay, J.J., Li, Y.Y., Noike, T. 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Research*, 31-6: 1518-1524.
29. Leedle, J. A. Z., Bryant, M.P. and Hespell R.B. 1982. Leedle, J. A. Z., Bryant, M.P. and Hespell R.B. 1982. Diurnal Variations in Bacterial Numbers and Fluid

Parameters in Ruminal Contents of Animals Fed Low- or High-Forage Diets. Applied and environmental microbiology. 44 (2): 402-412

30. Lv, W., Borger, D., Schanbacher, F., Morrison, M. and Yu, Z. 2008. Enrichment and isolation of anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria from mulch. Animal sciences Ohio state university. 6 - 17
31. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1998. Brock Biología de los microorganismos. Edit. Prentice Hall International (UK) Ltd. 8ª ed. 500-545
32. Marquez-Benavides L. 2004. Study of the effect of soil inclusion on the anaerobic degradation of municipal solid waste. University of Strathclyde in Glasgow. Degree thesis
33. Palmisano, A.C., Schwab, B.S. & Maruscik, D.A. 1993. Hydrolytic enzyme activity in landfilled refuse. Applied Microbiology and Biotechnology, 38: 828–832.
34. Palmisano, A.C., Barlaz, M.A. 1996. The Microbiology of Municipal Solid Waste. CRC Press, Inc. Landfills, pp. 9-14. USA
35. Pavlostathis, S.G. & Giraldo-Gómez, E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. Critical reviews in environmental control. 21: 411-490.
36. Pohland, F.G. & Molina, J.F. 1992. Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. Water Quality Management, Vol. 7. CRC Press. Technomic Publishing Co. Lancaster. 9-35

37. Pohland, F.G. & Gould, J.P. 1986. Co-disposal of municipal refuse and industrial waste sludge in landfills. *Water Science and Technology*. 18: 177–192.
38. Pourcher, A., Sutra, L., Hébé, I., Moguedet, G., Bollet, C., Simoneau, P., and Gardan, L. 2001. Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill. *FEMS Microbiology ecology*. 34: 229-241
39. Qian, X. & Barlaz, M.A. 1996. Enumeration of Anaerobic Refuse-Decomposing Micro-Organisms on Refuse Constituents. *Waste Management & Research*. 14 (2): 151-161.
40. Rampersad, K., Goldstone, L.A., and Tivchev, G.N. 1998. Study of methods for the cultivation of anaerobic cellulose-degrading bacteria. *Water SA*. 24 (4): 343-345
41. Reinhart D. R., Al-Yousfi A. B. 1996. The impact of leachate recirculation on municipal solid waste landfill operating characteristics. *Waste Management and Research* 14, 337-346.
42. Rodríguez C., Hiligsmann S., Ongena M., Charlier, R. and Thonart P. 2004. Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation*. 16: 415–422
43. SEMARNAT, 2006. La gestión ambiental en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. ISBN 968- 817 - 799 – 7. México.
44. SEMARNAT, 2010. Módulo de consulta temática, generación de residuos sólidos urbanos por zona geográfica en México. http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_RSM01_01&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce (último acceso: 05.08.2010)

45. Siegrist, H., Renggli, D., Gujer, W. 1993. Mathematical modelling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment. *Water Science and Technology*. 27(2): 25-36.
46. Sleat, R., Mah, R. 1987. "Hydrolytic bacteria", *Anaerobic digestion of biomass*. Applied science LTD. 90-120
47. Spokas, K., Bogner, J., Chanton, J.P., Morcet, M., Aran, C., Graff, C., Golvan, Y.M. & Hebe, I. 2006. Methane mass balance at three landfill sites: What is the efficiency of capture by gas collection systems? *Waste Management*. 26: 516-525.
48. Stams, A.J.M. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 66: 271-294.
49. Swati M., Kurgan J., Nagendran R. 2005. Bioreactor landfill lysimeter studies on Indian urban refuse. *Proceedings Sardinia 2005, Tenth International Waste Management and Landfill Symposium*. CISA, Environmental Sanitary Engineering Centre, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy. pp. 100.
50. Veeken, A., Hamelers, B. 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource technology*. 29: 249-254
51. Wang, Y.S., Byrd, C.S. & Barlaz, M.A. 1994. Anaerobic biodegradability of cellulose and hemicellulose in excavated refuse samples using a biochemical methane potential assay. *Journal of Industrial Microbiology*. 13: 147-153.

52. Westlake, K., Archer, D.B. and Boone D.R. 1995. Diversity of cellulolytical bacteria in landfill. *Journal of applied bacteriology*. 79: 73-78
53. Wedekind, K. J., Mansfield, H. R. and Montgomery L. 1988. Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Applied and environmental microbiology*. 54 (6): 1530-1535
54. Wreford, K.A., Atwater, J. W., Lavkulich, L. M. 2000. The effects of moisture inputs on landfill gas production and composition and leachate characteristics at the Vancouver Landfill Site at Burns Bog. *Waste Management and Research*. 18: 386–392

10 Anexos

Método de ácido 3,5-DNS para azúcares reductores

Preparación del reactivo ácido 3,5-DNS

Solución A: Diluir por calor y agitación 150g de Tartrato de Sodio y Potasio en 250mL de agua destilada.

Solución B: Preparar 100 mL de una solución de NaOH al 8% y agregar 5g de ácido 3,5-DNS, diluir por calor y mezclar las dos soluciones aforando a 500 mL con agua destilada.

Preparación de la curva estándar de glucosa para método del 3,5-DNS.

a) De una solución estándar de glucosa al 0.001M (0.180g en 100 ml de agua destilada = 0.00001M de glucosa/ml), preparar en tubos de 18x150 mm, de acuerdo al Tabla a.

Tabla a. Preparación de la curva estándar de glucosa para el método del ácido 3,5-DNS, para la determinación de poblaciones celulolíticas en RSU.

mL. de solución de glucosa	mL. de agua destilada	Concentración (M)
1	9	1
2	8	2
3	7	3
4	6	4
5	5	5
6	4	6
7	3	7

8	2	8
9	1	9
10	-	1
-	10	Blanco

b) Tomar 1 ml de cada concentración y pasar a un tubo de 13x100 mm, añadir 1 mL/tubo de ácido 3,5-DNS, calentar a ebullición por 30-50 seg e inmediatamente colocar en baño de hielo, añadir 6 ml de agua destilada fría y agitar. Leer en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

c) Realizar una gráfica con los datos para elaborar la curva estándar; absorbancia vs concentración (M/ml).

Preparación de la muestra:

Retirar de cada vial la capa de aceite que recubre al medio de cultivo, tomar con una pipeta Pasteur el sobrenadante de cada vial y colocarlo en un tubo de 13x100 mm, enseguida añadir 1 mL/tubo de ácido 3,5-DNS y continuar como lo indica el punto b)

3) Interpolar los datos de absorbancia de cada muestra en la curva estándar y obtener dato en M/ml

Multiplicar por la dilución de la muestra y transformar las molaridades de gramos a miligramos.