

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN REACTOR DE DIGESTIÓN ANAERÓBICA SECA (DAS) PARA LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL MEDIANTE CEPAS FÚNGICAS QUERATINOLÍTICAS

Tesis presentada por el Bachiller:

Munive Talavera, Cesar Augusto

Para optar el Título Profesional de

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Barreda del Carpio, Jaime Ernesto

Arequipa- Perú

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2017000003792
N° Trámite en Fac. 327-2017
Fecha Recep. Fac. 24-01-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **MUNIVE TALAVERA, Cesar Augusto**



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNOLOGO**

“DISEÑO, CONSTRUCCION Y EVALUACION DE UN BIORREACTOR PARA LA DEGRADACION DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA TEXTIL MEDIANTE CEPAS FUNGICAS QUERATINOLITICAS”

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Fredy Molina Rodríguez 2) Ing. Cinthia Córdova Barrios

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **“DISEÑO, CONSTRUCCION Y EVALUACION DE UN REACTOR DE DIGESTION ANAEROBICA (DAS) PARA LA DEGRADACION DE RESIDUOS SOLIDOS PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL MEDIANTE CEPAS FUNGICAS QUERATINOLITICAS”** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 03-04-17

ASESOR: **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **“CONSTRUCCION Y EVALUACION DE UN REACTOR DE DIGESTION ANEROBICA SECA (DAS) PARA LA DEGRADACION DE RESIDUOS SOLIDOS PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL MEDIANTE CEPAS FUNGICAS QUERATINOLITICAS”**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

FIRMA




FECHA 04-12-18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**
- 3) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

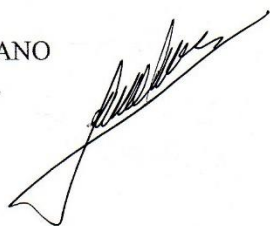
Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 13-12-18

JURADOS: PRESIDENTE **DR. JOSE VILLANUEVA SALAS**
VOCAL **DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**
SECRETARIO **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**

FECHA 27/12/18 HORA 19.00 LOCAL C-401

FIRMA DEL DECANO

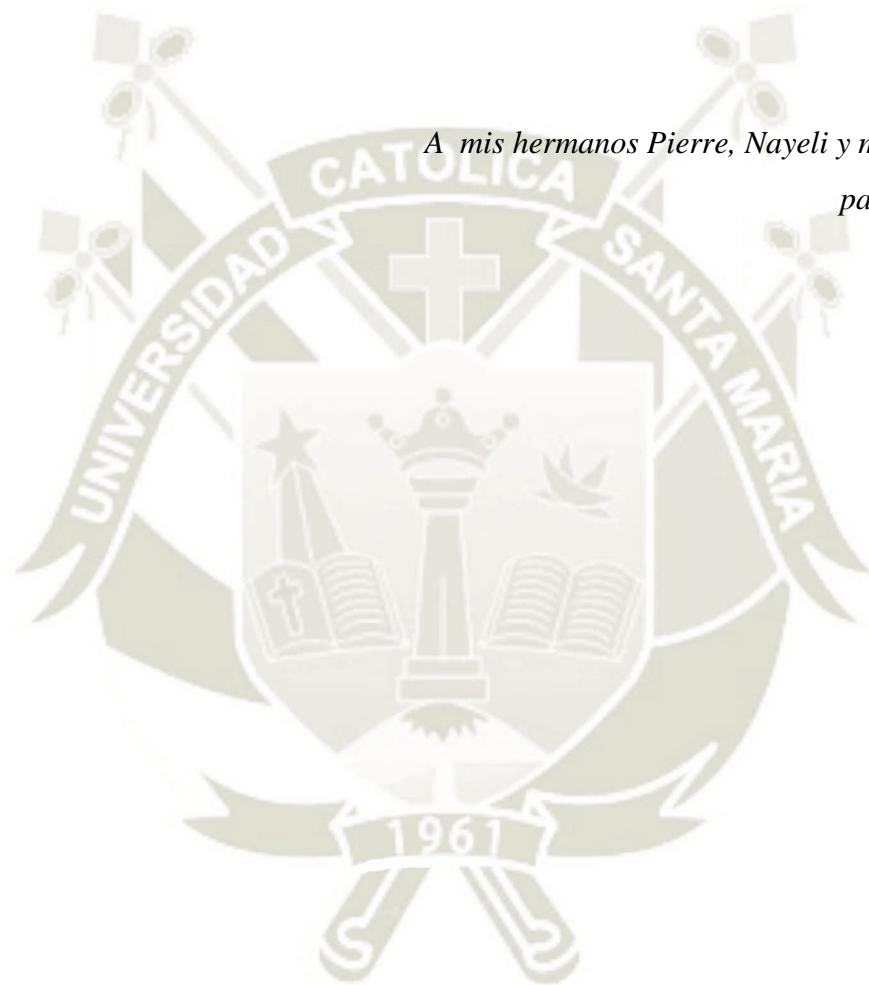


FECHA 18-12-18

Dedicatoria

*A mis padres Víctor y Luz, por su apoyo e invaluable
enseñanzas que me ofrecen y ofrecerán durante toda mi
vida.*

*A mis hermanos Pierre, Nayeli y mi Abuela por su
paciencia y cariño.*



Agradecimiento

Agradezco a Dios por guiar mi camino y por permitirme concluir con mi objetivo.

A mis padres quienes son mi motor y mi mayor inspiración, que a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino.

A mis hermanos Pierre y Nayeli por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso.

A mi enamorada Maria Alejandra por ser el apoyo incondicional, que con su amor y respaldo, me ayuda alcanzar mis objetivos.

A toda mi familia, porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Al Dr. José Villanueva Salas, por sus consejos y palabras de aliento para culminar este trabajo.

Al Ing. Jaime Barreda del Carpio, por su importante labor como asesor de este trabajo y a la vez por el buen ejemplo, guía y motivación ofrecida durante los últimos años.

A mis amigos, Jimmy y Paulo; por acompañarme siempre en mis años de estudio y por la ayuda para terminar este trabajo.

A Innóvate Peru por hacerme parte de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
INTRODUCCIÓN.....	XVIII
OBJETIVOS	XX
HIPÓTESIS.....	XXI
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Biorreactores	1
1.1.1. Diseño de biorreactores anaerobios	2
Reactor de digestión anaerobia seca.....	2
1.1.2. Uso de reactores de plástico para digestión anaeróbica seca.....	2
1.2. Desechos Orgánicos	3
1.2.1. Proceso de descomposición	3
1.3. Residuos sólidos como recursos potenciales de biomasa.	4
1.3.1. Emisiones de residuos sólidos.....	5
Residuos agrícolas	5
Plumas de pollo.....	6
Estiércol animal	6
Residuos forestales y de cultivos.	7
Residuos sólidos municipales (RSU).....	7
Residuos industriales	8
1.4. Digestión anaerobia	8
1.4.1. Comparación de la digestión anaerobia húmeda y seca.	9
1.5. Tecnologías de digestión anaeróbica	10
1.5.1. Digestión anaeróbica seca (DAS)	10
1.5.2. Digestión anaeróbica seca - Proceso continuo.....	11
1.5.3. Digestión anaeróbica seca - Proceso por lotes.....	12
1.6. Cepas fúngicas en el tratamiento de biomasa	12
1.6.1. Hongos anaeróbicos.....	13
1.6.2. Filogenia, género y especie.....	14
1.6.3. Distribución.....	15
1.7. Estructura y propiedades de la fibra de lana.	15

1.7.1.	Estructura de fibra	15
1.7.2.	Propiedades de la fibra	17
1.7.3.	Queratina.....	17
CAPÍTULO II.....		19
MATERIALES Y MÉTODOS		19
2.1	Lugar de Ejecución	19
2.2	Material.....	19
2.2.1	Material Biológico	19
2.2.2	Material de laboratorio.....	20
2.2.3	Material de vidrio.....	20
2.2.4	Reactivos	20
2.2.5	Medios de cultivo.....	20
2.2.6	Equipos.....	21
2.2.7	Otros	21
2.3	Métodos.....	21
2.3.1	Aislamiento de microorganismos nativos de residuos sólidos textiles y de rumen de vaca.	21
	Recolección de muestra de los desechos sólidos del procesamiento de fibra de alpaca y lana oveja	21
	Aislamiento y purificación de cepas fúngicas de desechos sólidos textiles...22	
	Aislamiento y purificación de cepas fúngicas obtenidas del rumen de vaca22	
2.3.2	Selección y caracterización de cepas fungicas con capacidad queratinolítica para la degradación de residuos sólidos textiles	23
	Selección de microorganismos con capacidad de degradación	23
	Análisis cuantitativo.....	23
	<input type="checkbox"/> Prueba de ninhidrina para Grupos Amino Libres	23
	<input type="checkbox"/> Análisis gravimétrico	23
	Caracterización macroscópica de cepas fúngicas.....	24
	Caracterización e identificación molecular de especies fúngicas seleccionadas con capacidad de degradación	24
	<input type="checkbox"/> Aislamiento de ADN	24
	<input type="checkbox"/> Amplificación del gen ITS para Hongos.....	24
	<input type="checkbox"/> Electroforesis y purificación de productos de PCR.....	25

□	Secuenciación de productos de PCR	25
□	Filogenia molecular.....	25
	Elaboración de curvas de crecimiento de cepas fúngicas.	25
2.3.3	Configuración y construcción de un bioreactor DAS para el tratamiento biológico de los residuos sólidos textiles.....	26
	Puesta en marcha de los reactores.	28
2.3.4	Evaluación de la degradación de la biomasa en el reactor de digestión anaeróbica seca	28
□	Composición de la biomasa	28
CAPÍTULO III		29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		29
3.1.	Aislamiento de microorganismos nativos de residuos sólidos textiles y de rumen de vaca	29
3.1.1.	Aislamiento y purificación de cepas fúngicas de desechos sólidos textiles	29
3.1.2.	Aislamiento y purificación de cepas fúngicas obtenidas del rumen de vaca	30
3.2.	Selección y caracterización de cepas fúngica con capacidad queratinolítica para la degradación de residuos sólidos textiles	30
3.2.1	Prueba de ninhidrina para grupos amino libres	30
3.2.2.	Análisis gravimétrico	32
3.2.3	Caracterización macroscópica de cepas fúngicas.....	34
3.2.4	Caracterización e identificación molecular de especies fúngicas seleccionadas con capacidad de degradación	36
	Secuenciación de productos de PCR.....	36
	Las secuencias de las cepas seleccionadas se muestran en el Anexo 6	36
	Filogenia molecular	36
3.2.5	Elaboración de curvas de crecimiento de cepas fúngicas.	43
3.3	Configuración y construcción de un biorreactor para el tratamiento biológico de los residuos sólidos textiles.....	45
3.3.1	Configuración	47
	En la configuración del reactor se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:.....	45

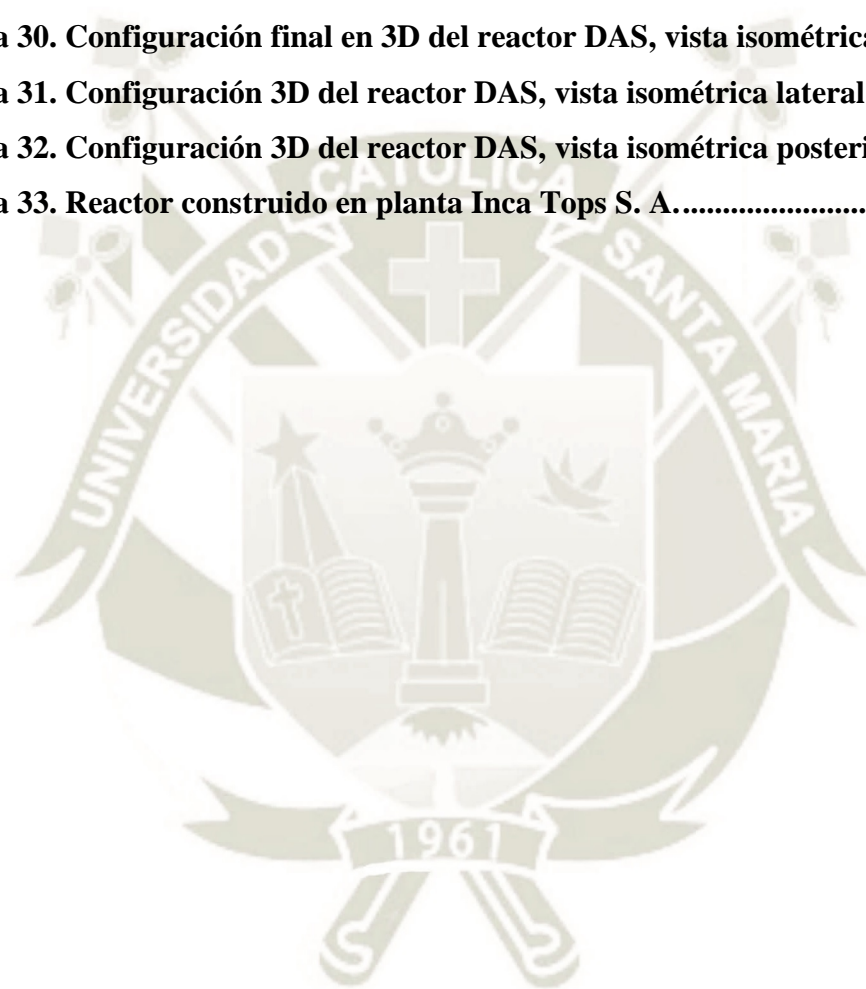
3.3.2	Construcción:.....	53
3.4	Evaluación de la degradación de la biomasa en el reactor de digestión anaeróbica seca	54
3.4.1	Análisis de biomasa y puesta en marcha del reactor	54
	CONCLUSIONES	57
	RECOMENDACIONES	58
	ANEXOS	69
	83
	83



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de residuos con agua.....	4
Figura 2. Tecnología DAS.....	11
Figura 3. Estructura de la queratina.....	16
Figura 4. Placas madre.....	22
Figura 5. Frascos inoculados.....	23
Figura 6. Esquema de disposición de puertos y accesorios, headplate.....	26
Figura 7. Degradación de biomasa a los 40 días por cuantificación de grupos amino libres.....	32
Figura 8. Peso de la biomasa degradada por cepa.....	32
Figura 9. Apariencia macroscópica de la cepa MB-4.....	34
Figura 10. Apariencia macroscópica de la cepa MC-1.....	34
Figura 11. Apariencia macroscópica de la cepa P-X.....	35
Figura 12. Apariencia macroscópica de la cepa P-1.....	35
Figura 13. Apariencia macroscópica de la cepa P-2.....	35
Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen ITS de la cepa aislada PX y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.....	36
Figura 15.Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada P-1 y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.....	38
Figura 16.Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada P-2 y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.....	40
Figura 17. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada MB-4 y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.....	41
Figura 18. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada MC-1 y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.....	41
Figura 19 Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa P-X.....	43
Figura 20. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa P-1.....	43
Figura 21. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa P-2.....	44
Figura 22. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa MB-4.....	44

Figura 23. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa MC-1.....	45
Figura 24. Diseño 2D de vessel y chaqueta.....	47
Figura 25. Plano 3D del headplate, vista superior.....	48
Figura 26. Plano 3D del headplate, vista inferior.....	48
Figura 27. Diseño 2D del reactor DAS, vista frontal.....	49
Figura 28. Diseño 2D del reactor DAS, vista lateral.....	50
Figura 29. Diseño 2D del reactor DAS, vista superior.....	51
Figura 30. Configuración final en 3D del reactor DAS, vista isométrica frontal.....	51
Figura 31. Configuración 3D del reactor DAS, vista isométrica lateral.....	52
Figura 32. Configuración 3D del reactor DAS, vista isométrica posterior.....	53
Figura 33. Reactor construido en planta Inca Tops S. A.....	54



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de descomposición de residuos sólidos.	4
Tabla 2. Codificación uso de los puertos y accesorios.	27
Tabla 3. Elementos del reactor DAS descritos a detalle	27
Tabla 4. Resultados de las cepas aisladas de la planta IV de Inca Tops.	30
Tabla 5. Resultados de las cepas aisladas del rumen de vaca.	30
Tabla 6. Medición de la absorbancia para prueba de Ninhidrina.	31
Tabla 7. Datos del método gravimétrico.	33
Tabla 8. Descripción macroscópica de cepas fúngicas aisladas de los residuos sólidos de la planta de Inca Tops S.A	34
Tabla 9. Descripción macroscópica de cepas fúngicas aisladas del rumen de vaca.	35
Tabla 10. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada PX.	37
Tabla 11. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada P1.	38
Tabla 12. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada P-2	39
Tabla 13. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada MB-4.	40
Tabla 14. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada MC-1	42
Tabla 15. Resultados del análisis inicial de la biomasa	55
Tabla 16. Resultados del análisis final de la biomasa.	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Plano de ubicación de la planta IV de la empresa de Inca Tops S.A ...	69
Anexo 2. Agar Sabouraud.....	70
Anexo 3. Caldo papa dextrosa	71
Anexo 4. Prueba de la ninhidrina	72
Anexo 5. Panel fotográfico de prueba de ninhidrina para selección de cepas con capacidad de degradación.....	73
Anexo 6. Secuencia de cepas con capacidad de degradación.....	74
Anexo 7. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: MC-1	76
Anexo 8. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: P-X...	77
Anexo 9. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: P-1....	78
Anexo 10. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: MB-4	79
Anexo 11. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: P-2..	80
Anexo 12. Análisis de la biomasa inicial.....	81
Anexo 13. Panel fotográfico de construcción del reactor.....	82

Lista de Abreviaturas

Abs: Absorbancia

DA: Digestión anaeróbica

DAS: Digestión anaeróbica seca

DQO: Demanda química de oxígeno

MBS: Medio basal salino

pH: Potencial de hidrógeno

RS: Residuos Sólidos

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos volátiles

TR: Tiempo de residencia





RESUMEN

Dada la creciente demanda por tratar residuos sólidos de distinta naturaleza, fácilmente disponibles, de composición variable y de difícil degradación es que se tiende a buscar estrategias para el tratamiento de estos.

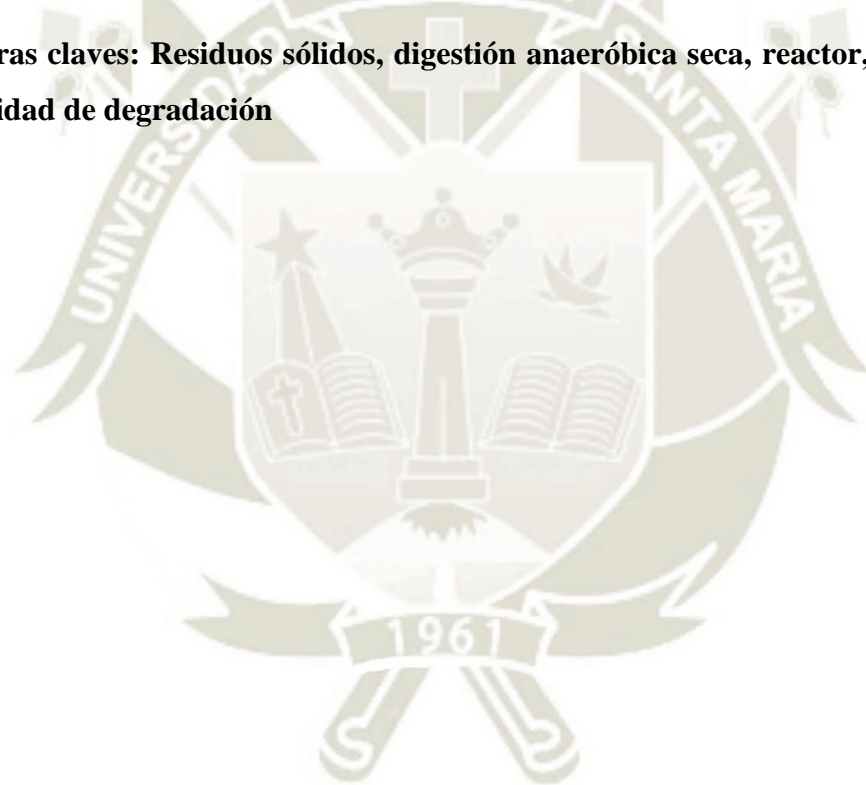
La presente investigación tuvo como propósito construir y evaluar un reactor de digestión anaeróbica seca (DAS) para la degradación de residuos sólidos procedentes de la industria textil mediante cepas fúngicas queratinolíticas. La investigación se realizó en las instalaciones de la de la Universidad Católica de Santa María y la planta IV de la empresa Inca Tops S.A y fue financiada por Innóvate Perú.

Se aislaron 23 cepas fúngicas a partir de muestras de los desechos sólidos generados en el procesamiento de fibra de alpaca y lana de oveja de le empresa Inca Tops y del rumen de vaca. Para determinar su capacidad de degradación, cada una de las cepas fueron inoculadas en medio basal salino (MBS) complementado con la fibra y se realizaron análisis cuantitativos dando como resultado la selección de 5 cepas (P-X, P-1, P-2, MB-4 y MC-1), estas se caracterizaron molecularmente obteniendo: *Aspergillus sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.* respectivamente.

Se construyó un reactor de digestión anaeróbica seca DAS experimental de 20 litros de capacidad, y 11 L de capacidad efectiva, la configuración de este se realizó teniendo en cuenta lo siguiente: sistema bach de una etapa con recirculación de influente, relación del influente y biomasa de 2:1 y temperatura mesofila.

La evaluación del digester anaerobio seco se realizó comparando la biomasa inicial y final, después de trabajar durante 60 días, dando como resultado una disminución en el porcentaje de sólidos totales de 37.91 % a 28.82 %, sólidos volátiles de 19.64 % a 15.71 %, demanda química de oxígeno de 2080.19 mg/Kg a 1414.63mg/Kg y el pH de 7.35 a 7.15

Palabras claves: Residuos sólidos, digestión anaeróbica seca, reactor, cepas fungicas, capacidad de degradación





ABSTRACT

Given the growing demand for treating solid waste of different nature, easily available, variable composition and difficult degradation is that you tend to seek strategies for the treatment of these.

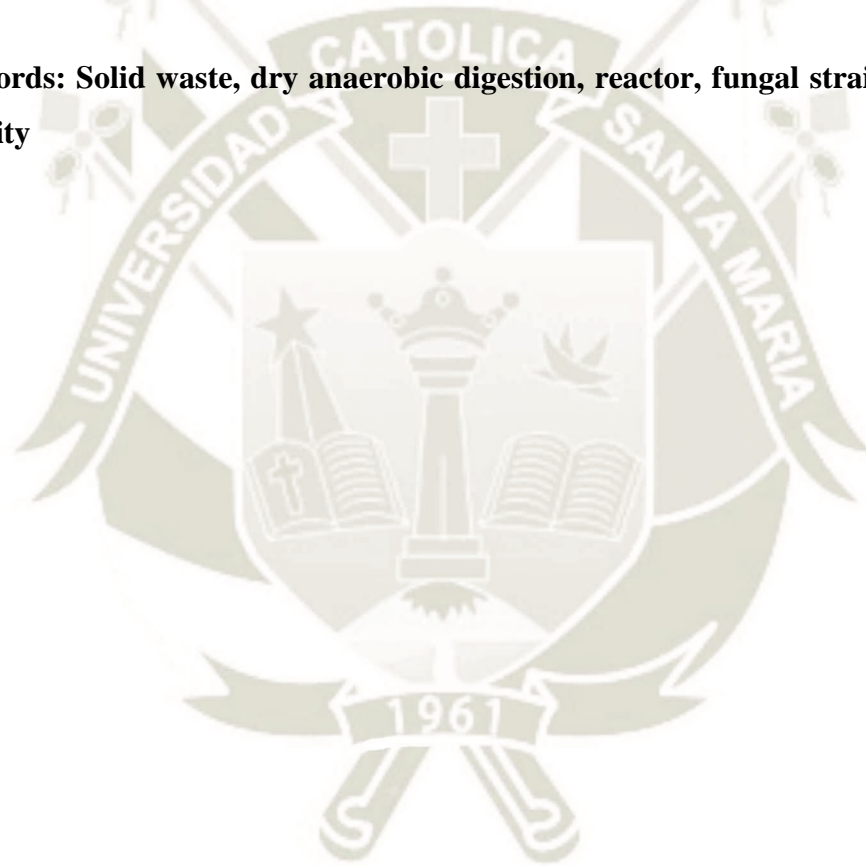
The purpose of the present investigation was to build and evaluate a dry anaerobic digestion reactor (DAS) for the degradation of solid waste from the textile industry by keratinolytic fungal strains. The research was conducted at the facilities of the Catholic University of Santa Maria and the IV plant of the company Inca Tops S.A and was funded by Innóvate Peru.

23 fungal strains were isolated from samples of the solid waste generated in the processing of alpaca fiber and sheep wool from the company Inca Tops and from the cow rumen. To determine their degradation capacity, each of the strains were inoculated in basal saline medium (MBS) supplemented with fiber and quantitative analysis was carried out, resulting in the selection of 5 strains (PX, P-1, P-2, MB -4 and MC-1), these were molecularly characterized obtaining: *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp. respectively.

An experimental DAS dry anaerobic digestion reactor with a capacity of 20 liters and an effective capacity of 11 L was built. This configuration was made taking into account the following: one-stage batch system with influent recirculation, influent and biomass ratio of 2: 1 and mesophyll temperature.

The evaluation of the dry anaerobic digester was performed comparing the initial and final biomass, after working for 60 days, resulting in a decrease in the percentage of total solids from 37.91 % to 28.82 %, volatile solids from 19.64 % to 15.71 %, demand Oxygen chemistry of 2080.19 mg / Kg at 1414.63mg / Kg and the pH of 7.35 to 7.15

Keywords: Solid waste, dry anaerobic digestion, reactor, fungal strains, degradation capacity



INTRODUCCIÓN

El tratamiento de residuos sólidos se ha convertido en una prioridad política en muchos países. Uno de los principales problemas de hoy en día es hacer frente a una cantidad cada vez mayor de residuos primarios de una manera ambientalmente aceptable. Los residuos biológicos, es decir, los residuos orgánicos municipales, agrícolas o industriales, así como los suelos contaminados. Tradicionalmente se han depositado en vertederos o incluso se han vertido en el mar o lagos sin mucha preocupación ambiental. En los últimos tiempos, los estándares ambientales de la incineración de residuos y el relleno controlado de la tierra han mejorado gradualmente, y se han desarrollado nuevos métodos de clasificación de residuos y recuperación de recursos / energía. El tratamiento de residuos biológicos mediante procesos de digestión anaeróbica es, en muchos casos, la forma óptima de convertir los residuos orgánicos en productos útiles como la energía (en forma de biogás) y un producto fertilizante. Otras opciones de manejo de desechos, como el relleno de tierras y la incineración de desechos orgánicos, se han vuelto menos deseables, y la legislación, tanto en Europa como en otros lugares, tiende a favorecer el tratamiento biológico como una forma de reciclar los desechos orgánicos¹.

Los residuos sólidos en el Perú, producen aproximadamente 117.53 mil toneladas de residuos textiles al año, siendo una preocupación el tratamiento de estos, es por ello, que la nueva normativa ambiental, los incentivos tributarios y la iniciativa por parte del Estado, así como las nuevas tendencias como la economía circular, que a través de sus “4 R” que son: (a) reusar, (b) reciclar, (c) recircular, y (e) reutilizar; mejoraría la calidad de vida de la población, garantizando los derechos y libertades de sus habitantes como el de vivir en un ambiente sano y equilibrado, a las empresas dándoles las herramientas necesarias para generar inversión, además de ser competitivos y agresivos en temas comerciales, incorporando e implementando nociones como: (a) ecoefectividad, (b) economía verde, y (c) etiqueta verde.

Los residuos sólidos necesitan un tratamiento biológico que requiere contacto entre microorganismos y el sustrato, que en el presente caso, es el agua residual y la biomasa, y los microorganismos aislados con capacidad queratinolítica presentes en el sistema; es por ello que el interés de desarrollar reactores que permitan tratar nuevos sustratos ha aumentado

dando como resultado diferentes tipos de sistemas como son los de crecimiento suspendido, de película fija o una combinación de ambos¹.

Al tratar los residuos sólidos se realiza generalmente en condiciones húmedas (materia prima con una concentración de sólidos entre 0.5 % y 15 %)² y seco (materia prima con concentración sólida más del 20%)³.

Los tratamientos de digestión anaerobia de los desechos orgánicos aceleran la descomposición natural del material orgánico en ausencia de oxígeno, si la temperatura, el contenido de humedad y el pH se mantienen cercanos a los valores óptimos.

En la digestión anaerobia más del 90 % de la energía disponible por oxidación directa se transforma en metano, consumiéndose sólo un 10 % de la energía en el crecimiento bacteriano frente a un 50 % consumido en el proceso aerobio⁴. Por otro lado, la masa restante degradada por las bacterias puede utilizarse como abono para la fertilización de suelos⁴.

El presente trabajo tiene como objetivo principal la construcción de un reactor de digestión anaeróbica seca DAS teniendo como base la digestión anaerobia y la materia orgánica procedente de la industria textil Inca Tops mediante el uso de microorganismos anaerobios con capacidad queratinolítica para la degradación de desechos sólidos generados y de esta manera aportar al desarrollo tecnológico regional y nacional.



OBJETIVOS

General

Construir y evaluar un reactor de digestión anaeróbica seca (DAS) para degradar residuos sólidos procedentes de la industria textil mediante cepas fúngicas queratinolíticas.

Específicos

1. Aislar microorganismos nativos de residuos sólidos textiles y del rumen de la vaca
2. Seleccionar y caracterizar cepas fúngicas con capacidad queratinolítica para la degradación de residuos sólidos textiles.
3. diseñar y construir un reactor de digestión anaeróbica seca DAS para el tratamiento biológico de residuos sólidos textiles.
4. Evaluar la degradación de la biomasa en el reactor de digestión anaeróbica seca.

HIPÓTESIS

Si los residuos sólidos procedentes de la industria textil presentan un alto contenido de queratina en su composición es posible utilizar cepas fúngicas queratinolíticas en un reactor de digestión anaeróbica seca para su degradación.



CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1. Biorreactores

Los biorreactores son tanques construidos de diferentes formas, tamaños y materiales donde se almacenan los residuos orgánicos como sobrantes de cocina, estiércol de animales y humanos, material vegetal, etc. Estos elementos forman una mezcla que es descompuesta biológicamente por microorganismos.

En el proceso de digestión se forma el biogás, por lo que el tanque debe disponer de algún sistema que le permita capturarlo controlando su presión y evitando su mezcla con aire atmosférico. Como resultado de la descomposición biológica, los residuos almacenados se transforman en abono, el cual es de fácil absorción para las plantas y tiene un alto contenido de nitrógeno, fósforo y potasio libre de microorganismos patógenos dañinos para las plantas⁵.

1.1.1. Diseño de biorreactores anaerobios

Para el diseño de un biorreactor se debe tener en cuenta variables como la alta carga orgánica, si tiene tiempos de retención hidráulica reducida y si tienen alta producción de metano. Parámetros operacionales como el tiempo de retención hidráulico, la mezcla, el número de tanques, unidades o etapas y la temperatura aunada con las propiedades de la materia prima forman la base primordial para un buen diseño de un biodigestor. Más aun, para la digestión anaerobia de sustratos con altos contenidos de lignocelulosa como el residuo de poda, el contenido de materia seca (sólidos totales), la solubilidad y la tasa de hidrólisis, juegan un papel importante para seleccionar el tipo de biodigestor y su respectivo diseño⁶.

Varias clases de configuraciones se emplean para este tipo de digestión anaerobia como por ejemplo digestores de una etapa o de dos etapas⁷, digestores húmedos, secos y semisecos⁸, digestores por lotes o continuos⁹ y digestores de alta tasa⁹.

Reactor de digestión anaerobia seca

Esta tecnología es amigable con el medio ambiente para convertir residuos orgánicos sólidos y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos en energía renovable. La degradación y estabilización de esta materia orgánica compleja es llevada a cabo mediante un consorcio de microorganismos¹⁰.

La digestión anaerobia es un proceso natural que ocurre en¹¹ ambientes anóxicos que se encuentran en la naturaleza como: estiércol, residuos de procesamiento de alimentos¹¹, sedimentos, intestinos de los mamíferos¹², pantanos¹³ formando parte del ciclo biológico¹⁴.

Los reactores anaeróbicos, más conocidos como biodigestores, son utilizados generalmente para tratar sustratos concentrados con alto contenido de sólidos. Pueden clasificarse al igual que los reactores aerobios en sistema de biomasa suspendida y en sistemas con biomasa fija¹³. Los procesos anaerobios han sido aplicados con éxito en el tratamiento de residuos industriales destacándose la factibilidad del reactor anaerobio¹⁵.

1.1.2. Uso de reactores de plástico para digestión anaeróbica seca

La construcción de reactores de biogás a partir de plásticos es una opción alternativa para resolver desafíos asociados con reactores de cúpula fija y tambor flotante; la tecnología

evolucionó desde la necesidad para tratar nuevos materiales que no sean corrosivos, que sean buenos aislantes, más baratos y más fáciles de construir¹⁶.

Se han utilizado materiales plásticos flexibles y rígidos para la construcción de reactores de biogás, gas soportes, almacenamiento de digestato y cubiertas de membrana; los materiales poliméricos utilizados incluyen polietileno. (PE), cloruro de polivinilo (PVC), polipropileno (PP), poliestireno (PS), polimetacrilato de metilo (PMMA), acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) y plásticos reforzados con fibra¹⁷. Se han desarrollado y probado varios reactores plásticos de biogás en países como China, India, Vietnam, Kenia, Bolivia, Bangladesh, Ruanda, Taiwán, Tanzania, Etiopía, Colombia y Honduras¹⁸.

1.2. Desechos Orgánicos

Los tratamientos de digestión anaerobia de los desechos orgánicos aceleran la descomposición natural del material orgánico en ausencia de oxígeno, si la temperatura, el contenido de humedad y el pH se mantienen cercanos a los valores óptimos¹⁹.

1.2.1. Proceso de descomposición

El producto de interés al momento de llevar a cabo un proceso de digestión anaerobia es la degradabilidad del sustrato, sin embargo existen un número de parámetros que influyen la formación del metano, como son: Temperatura, tipo de sustrato, nivel de pH, tiempo de retención. La máxima producción se obtiene cuando estos parámetros se mantienen en los rangos óptimos¹⁹.

La materia orgánica de los residuos también se descompone en ausencia de oxígeno (condiciones anaerobias), pero más lentamente que en condiciones aerobias. La descomposición anaerobia llega a prevalecer, después del agotamiento del aire atrapado, en las partes interiores del sitio de disposición final, que están aisladas de la recarga del aire proveniente de la atmósfera. La influencia del ambiente externo aquí ya no prevalece; por lo tanto, los procesos bioquímicos de metabolismo microbiano pueden mantener la temperatura elevada, en estos niveles no hay posibilidad de evaporación al ambiente, y además la temperatura de 35 a 50 °C es inferior a la de las condiciones de oxidación²⁰.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las condiciones y resultados de los procesos de descomposición de los residuos en un sitio de disposición final²¹.

Tabla 1. Tipos de descomposición de residuos sólidos.²¹

Procesos	Descomposición Aerobia	Descomposición anaerobia
Requisitos	Oxígeno disponible, menos humedad	Falta de oxígeno, mas humedad
Temperatura	50-70° C	35-50° C
Reacciones	Oxidación, nitrificación	Reducción, desnitrificación
Consecuencias	Mineralización, esponjamiento	Consolidación, solidificación
Productos	CO ₂ , H ₂ O, productos de oxidación	Ácidos orgánicos, CH ₄ , CO ₂ , NH ₃ , H ₂ S, Lixiviado

Las transformaciones físico-químicas que se derivan del contacto del agua con los residuos²¹ y como se muestra en la Fig. 1 se observa el importante papel que juega el agua al contacto con la materia orgánica para la generación de productos, por lo que, es importante controlar la cantidad de agua que incide en los residuos²¹.

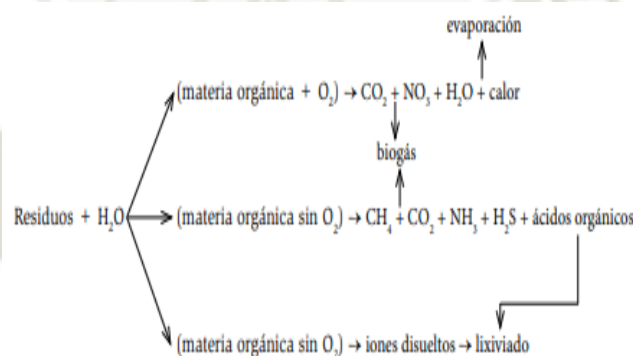


Figura 1. Diagrama de residuos con agua²¹.

1.3. Residuos sólidos como recursos potenciales de biomasa.

Se genera diariamente una cantidad tremenda de desechos sólidos, debido al crecimiento de la población y al aumento de las tasas de consumo, una gran cantidad de estos residuos aún se están eliminando con un reciclaje limitado, combustión sin energía recuperación, y vertederos sin control de gas²², lo que resulta en problemas ambientales globales. Estos residuos son fuentes potenciales para la generación de nuevos materiales y energías renovables si son aprovechados adecuadamente.

Los desechos sólidos son fuentes potenciales de biomasa porque están fácilmente disponibles y su conversión a energía a través de procesos biológicos es factible con una inversión de capital baja. La biomasa proviene de un rango de fuentes, que puede clasificarse

de acuerdo con las actividades que generan estos desechos o las ubicaciones donde se generan estos desechos²³, además los desechos sólidos generados por los sectores agrícolas, las comunidades y las industrias, tienen un potencial como fuentes de energía renovable.

1.3.1. Emisiones de residuos sólidos.

A medida que se eliminan los desechos sólidos de las comunidades municipales y las actividades agrícolas e industriales, la fracción orgánica de estos desechos se degrada durante un período de tiempo, liberando CH₄, CO₂ y otros gases a la atmósfera, lo que contribuye al calentamiento global. Las emisiones globales estimadas de los sitios de desechos sólidos están en el rango de 20 a 40 millones de toneladas de CH₄ por año²⁴ y el sector ganadero también contribuye significativamente a las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero.

Los desechos sólidos a menudo se eliminan en vertederos, lo que produce emisiones de metano y óxidos nitrosos y, por lo tanto, contribuye al efecto invernadero. Otros métodos comunes para el tratamiento de estas corrientes de desechos son el compostaje y la incineración; el compostaje da como resultado emisiones de compuestos volátiles (cetonas, aldehídos, amoníaco y metano)²⁵ y la incineración a menudo produce liberaciones significativas de dioxinas al medio ambiente si el gas de escape no se trata adecuadamente. La digestión anaeróbica es una tecnología prometedora para reducir las emisiones de desechos sólidos: es un método rentable, ingenioso y viable para resolver problemas de desperdicio.

Los estudios han demostrado que la digestión anaeróbica de estos desechos es sostenible y tiene una gran ventaja sobre el tratamiento aeróbico debido a su balance energético mejorado²⁵.

Residuos agrícolas

Los desechos agrícolas representan la mayor materia prima potencial, y una amplia variedad de estos desechos se pueden utilizar como fuentes de energía de biomasa. Las fuentes más comunes (plumas de pollo, estiércol, residuos de bosques y cultivos) se analizan en esta sección.

Plumas de pollo

En la actualidad, el promedio mundial de pollos es de unos 22 mil millones de pollos vivos²⁶, y alrededor del 5–7 % del peso total de un pollo normal son plumas²⁷. Por lo tanto, las plumas de pollo están disponibles en gran cantidad en todo el mundo, causando desafíos ambientales ya que el componente principal de la pluma es la β -queratina²⁸, que es una proteína estructural insoluble, la cadena de polipéptidos, está estrechamente empaquetada y altamente reticulada con enlaces disulfuro, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas²⁹, esta estructura hace que la proteína sea insoluble y resistente al ataque enzimático, que es una limitación importante para el procesamiento biológico de estos desechos³⁰.

La pluma de pollo es una fuente potencial de biomasa para la generación de energía si se aplica un método de pretratamiento adecuado antes de la digestión anaeróbica. El potencial de metano de los residuos de proteínas es tan alto como 0.496 Nm³/KgSV³¹ si todas las proteínas insolubles se convierten en proteínas. En esta investigación, las plumas de pollo se utilizaron como materia prima para la producción de metano en diversas concentraciones, y la naturaleza recalcitrante de las plumas se alteró antes de la digestión anaeróbica utilizando el tratamiento previo biológico.

Estiércol animal

Los animales de granja producen miles de millones de toneladas de estiércol al año, y la cantidad de estiércol empapada con paja aumenta a medida que aumenta el número de animales lecheros alojados. El almacenamiento de estas inmensas cantidades de estiércol puede generar importantes emisiones antropogénicas de metano y N₂O²³.

Además, el estiércol no tratado también puede contener patógenos y virus que pueden disminuir la productividad de las explotaciones ganaderas³² y representar una amenaza para la salud humana cuando se aplican a las tierras agrícolas. Sin embargo, el gran volumen de estiércol animal generado por los sectores agrícolas es una gran fuente de producción de energía; el metano del estiércol se puede capturar y utilizar como fuente de energía, evitando así los daños ambientales causados por estas corrientes de desechos³², la frescura del estiércol es necesaria para la conversión efectiva en energía a través del proceso de digestión anaeróbica: cuanto más viejo es el estiércol, mayor es el grado de descomposición previa y menor la cantidad de materia no descompuesta disponible para la conversión al metano³³.

Residuos forestales y de cultivos.

Los residuos forestales y de cultivos son biomasa lignocelulosa con una producción anual de aproximadamente 200 mil millones de toneladas³⁴ son la fuente renovable más abundante para la producción de energía los residuos forestales incluyen árboles muertos, caída de basura y residuos generados en el proceso de eliminación y registro. Los residuos de cultivos incluyen paja, cáscara, hoja, tallo, tallo, cáscara, mazorca y bagazo, que provienen de cereales, algodón, maní, frutas, legumbres, aceite de palma y caña de azúcar.

Son difíciles de descomponer como resultado de los polímeros de la matriz (hemicelulosa, pectinas, y lignina) que rodea las micro fibrillas celulósicas en la pared celular de la planta.³⁵, el grado de la resistencia de estos desechos al ataque microbiano varía según el tipo de lignocelulosa, diversos compartimentos de la pared celular, la edad celular y los fenómenos de procesamiento, como el secado y calefacción intervienen en este proceso³⁶.

El procesamiento biológico efectivo de esta biomasa para la producción de energía requiere un pretratamiento para abrir la estructura y aumentar la accesibilidad para la degradación, por ejemplo para la degradación de celulosa, la paja de trigo se usó en la co-digestión de estiércol de ganado para aumentar la C / N del sustrato y por lo tanto mejorar el rendimiento del proceso de digestión anaeróbica, también se usó en la co-digestión seca de diferentes fracciones de residuos sólidos, es decir, pollo Plumas, desechos de cítricos, paja de trigo y estiércol con paja para reducir el efecto inhibitorio de residuos.

Residuos sólidos municipales (RSU)

Los desechos sólidos municipales generalmente incluyen todos los desechos generados en una comunidad, como los desechos residenciales, comerciales e institucionales, las fracciones más concentradas de todas son los que contienen desechos de alimentos, papel, cartón, textiles, plásticos, vidrio, metales, recortes de jardín y otros¹⁰.

A nivel mundial, el volumen de RSU generado es de aproximadamente 1.300 millones de toneladas por año, y se espera que este volumen aumente a aproximadamente 2.200 millones de toneladas por año en 2025³⁷.

Los RSU generalmente contienen una fracción orgánica fácilmente biodegradable de hasta el 40 %, y aproximadamente el 60 % del peso seco de los residuos sólidos municipales promedio está compuesto de lignocelulosas³⁸.

Un desafío importante en el procesamiento biológico de estos desechos es la composición; hay variedades de diferentes fracciones involucradas, dependiendo de la fuente de los desechos, que pueden tener efectos adversos en el proceso de digestión, por lo tanto, los residuos sólidos municipales se deben clasificar mecánicamente, magnéticamente o manualmente para eliminar piedras grandes, plásticos, vidrio, metales y otros residuos y luego triturarlos para reducir su tamaño de partícula para poder acceder y procesar la fracción orgánica.

Residuos industriales

Los principales residuos industriales orgánicos son los que se generan a partir del procesamiento de alimentos y frutas, estas industrias producen grandes volúmenes de desechos sólidos, como cáscaras, pulpa, melaza, semillas, pieles, orujo, alimentos en mal estado y frutas. La composición y cantidad de los residuos sólidos generados varía de una planta a otra y también depende de la tecnología empleada por la industria. Los desechos sólidos generados a partir de estas industrias contienen grandes cantidades de materia orgánica, como carbohidratos, proteínas y lípidos, lo que los convierte en fuentes potenciales de biomasa para la producción de energía a través de procesos biológicos, la principal limitación es que algunos de estos desechos contienen sustancias químicas o sustancias que inhiben la actividad de los microorganismos y, por lo tanto, tienen un efecto adverso en la generación de energía a través de los procesos de digestión anaeróbica^{39,40}, por lo tanto, los desechos a menudo necesitan ser tratados previamente o co-digeridos⁴⁰ con otros sustratos para reducir el efecto inhibitorio sobre el rendimiento de biogás.

La instalación de digestores anaeróbicos puede ser una parte integral de los servicios de la industria para tratar los desechos sólidos y, al mismo tiempo, satisfacer las demandas energéticas de la industria, por ejemplo en esta investigación, los desperdicios de cítricos se co-digirieron con plumas de pollo, paja de trigo y estiércol de ganado para reducir el efecto inhibitorio de D-limoneno en el rendimiento de metano y mejorar la capacidad de amortiguación del proceso de digestión³⁶.

1.4. Digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia se puede definir de acuerdo con el contenido total de sólidos de la materia prima: digestión húmeda para contenidos de sólidos totales entre 0.5 % y 15 %⁴¹ y digestión seca para contenidos de sólidos totales superiores al 20 %⁴².

En las industrias, los procesos de digestión anaerobia húmeda son los más comunes, pero recientemente ha habido una gran preocupación por la gran cantidad de agua utilizada al tratar los desechos orgánicos sólidos para la producción de biogás y el gran contenido de agua del residuo de digestato, además, el uso de desechos sólidos (contenido sólido total entre 15 % y 50 %) de las actividades agrícolas, municipales e industriales, incluidos los bosques y los residuos de cultivos, es cada vez más atractivo, por lo tanto, el ímpetu para desarrollar procesos de digestión anaeróbica seca está aumentando tanto en la investigación como en la industria.

1.4.1. Comparación de la digestión anaerobia húmeda y seca.

La digestión anaerobia húmeda de desechos sólidos requiere mucha agua, lo cual es un desafío para los países con escasez de agua. Actualmente, existe una escasez mundial de agua; aproximadamente 1.400 millones de personas viven en cuencas hidrográficas en las que las tasas de uso del agua superan las tasas de recarga⁴³.

Es obvio que habrá competencia por el agua a medida que la población aumente y el desarrollo industrial progrese, además, el residuo de digestato que queda después de la producción de biogás a través del proceso húmedo contiene mucha agua, y la deshidratación del digestato requiere un alto consumo de energía y provoca la pérdida de nutrientes, por lo tanto, la digestión anaeróbica seca es una tecnología prometedora para evitar estos problemas.

En comparación con los procesos de digestión anaerobia húmeda, la digestión anaerobia seca proporciona una mejor viabilidad económica porque el volumen del reactor se minimiza debido al volumen reducido de agua^{44,45} y también es beneficioso porque es más robusto y flexible en su aceptación de materias primas, lo que requiere menos tratamiento previo⁴⁵.

El contenido total de sólidos en las materias primas afecta el desempeño de los procesos de digestión anaeróbica, y la morfología microbiana en el reactor cambia a medida que cambia el contenido total de sólidos^{46,47}.

Las comunidades microbianas que son dominantes en los procesos de digestión seca pueden diferir de aquellas en los procesos de digestión húmeda a medida que aumenta el contenido de sólidos totales^{48,49}.

Yi, Dong⁴² investigó comunidades microbianas utilizando la tecnología de pirosecuenciación mientras trataba el desperdicio de alimentos con contenidos de sólidos totales del 5 % al 20 % en condiciones mesofílicas y el resultado mostró una mejor reducción de sólidos volátiles y rendimiento de metano en reactores con mayor contenido de sólidos totales y que *Methanosarcina* fue dominante en tres reactores que mostraron una tendencia creciente al aumentar el contenido de sólidos totales.

Li, Chu⁴⁸ informaron que las especies de *Anaerococcus* son abundantes en la digestión anaeróbica en estado sólido (digestión anaeróbica seca) y que estas especies son responsables de la mejora de la eficiencia de degradación y el rendimiento de metano.

Sin embargo, la digestión anaeróbica seca requiere bombas específicamente diseñadas para el manejo de suspensiones sólidas, que pueden ser más caras que las bombas centrífugas utilizadas en los sistemas de digestión húmeda⁴¹⁻⁵⁰, también requiere un período de inicio más prolongado y, en ocasiones, es propenso a la inhibición porque los inhibidores que ingresan al reactor a través de las materias primas se encuentran en mayor concentración debido al contenido reducido de agua.

En la digestión anaeróbica seca, hay una mínima o ninguna mezcla durante el proceso de digestión debido al alto contenido de sólidos en el reactor, esto requiere la necesidad de un acondicionamiento adecuado de la materia prima.

La fase de inicio es importante para la generación de cultivos fúngicos adaptados a la materia prima y puede ser muy larga debido a las bajas tasas de crecimiento de los microorganismos anaeróbicos, si se dispone de un inóculo adaptado a la materia prima similar al de interés, entonces el inicio puede ser más corto, solo unos pocos días, de lo contrario, puede tomar un período más largo de hasta 15 días.

1.5. Tecnologías de digestión anaeróbica

1.5.1. Digestión anaeróbica seca (DAS)

El proceso DAS permite la digestión de desechos sólidos con alto contenido de sólidos. Es adecuado para procesar residuos con un contenido total de sólidos de hasta el 50 %⁵¹. Los residuos sólidos se inoculan con sustrato fermentado, se cargan en el reactor, se cierran en el reactor y se digieren en condiciones anaeróbicas. El proceso es un proceso por lotes de un

solo paso; todos los pasos de digestión tienen lugar en el mismo reactor y no hay adición de materia prima o mezcla dentro del reactor aplicado durante la digestión.

El proceso de fermentación se realiza en la condición mesofílica (34 - 37 °C), y la temperatura se regula a través de pisos y paredes con calefacción. Para permitir la inoculación continua y proporcionar humedad a los microorganismos durante la digestión, el líquido de percolación se recoge y se recircula de nuevo continuamente en el reactor.

Esta es una buena práctica porque la recirculación del líquido puede facilitar el crecimiento de los microorganismos⁵¹ y, por lo tanto, mejorar el rendimiento de metano al tiempo que reduce el tiempo de degradación, sin embargo, la recirculación líquida a veces puede resultar en un alto riesgo de acidificación, lo que lleva a una inestabilidad en el proceso. La tecnología DAS permite que varios reactores funcionen simultáneamente, y el biogás producido se utiliza para la generación de electricidad; este se puede observar en la Fig. 2 de tecnología DAS.

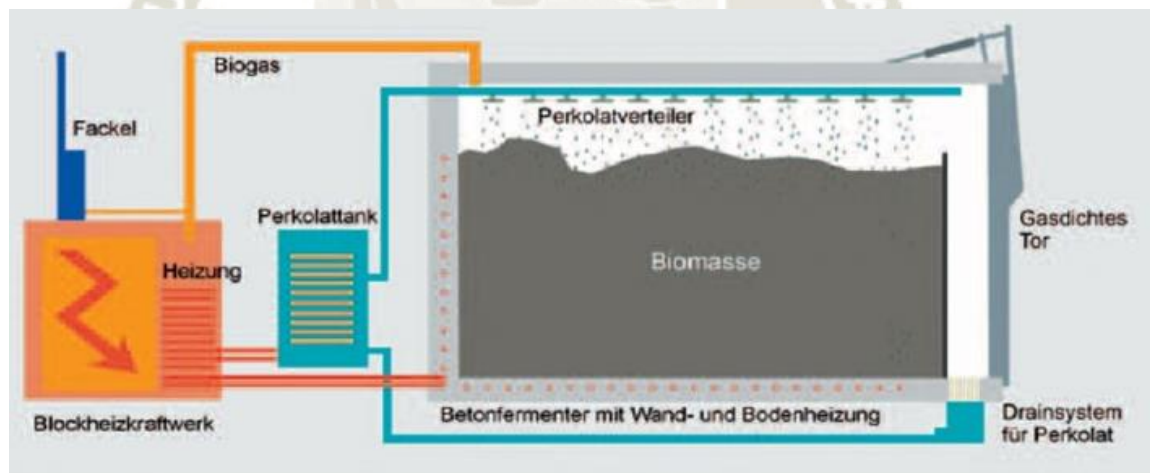


Figura 2. Tecnología DAS⁵¹

1.5.2. Digestión anaeróbica seca - Proceso continuo.

En el proceso de digestión continua, el sustrato se suministra a los microorganismos continuamente en pequeña cantidad, lo que minimiza los efectos tóxicos del sustrato o producto en las células.

El sustrato se alimenta continuamente al reactor y se elimina una cantidad igual; esto se hace para mantener un volumen de trabajo estable y condiciones de estado estable⁵². Una cantidad moderada del sustrato se alimenta en la etapa inicial y luego la velocidad de carga se incrementa gradualmente para alcanzar el objetivo, este suministro continuo de sustrato sin alteración da como resultado una producción estable de biogás, y el proceso se puede controlar fácilmente. Los biorreactores de flujo de tapón se usan comúnmente en la industria para procesos de digestión continua.

1.5.3. Digestión anaeróbica seca - Proceso por lotes

En los procesos de digestión por lotes, una cantidad apropiada de inóculo se mezcla con el sustrato, la mezcla se carga en el reactor, el reactor se cierra y el sustrato se digiere en condiciones anaeróbicas y el reactor permanece cerrado hasta que se completa la degradación, normalmente es posible una pequeña o ninguna mezcla dentro del reactor, por lo que la producción de biogás comienza lentamente, aumenta gradualmente hasta un pico y luego disminuye hasta que ya no hay más producción de gas.

El reactor se abre y el digestato se reemplaza con un nuevo lote y el tanque se cierra de nuevo y está listo para funcionar⁵². Los procesos por lotes se operan mejor en paralelo, por lo que al menos un reactor siempre está produciendo biogás⁵³. El principio del proceso de digestión por lotes es técnicamente simple, pero el suministro de los sustratos a las comunidades microbianas a la vez puede reprimir el proceso de digestión, además, la mezcla insuficiente puede inducir capas de asentamiento haciendo que el proceso de digestión sea ineficiente, por lo tanto, las condiciones en el proceso cambian continuamente debido al metabolismo celular y la falta de control; por lo tanto, la producción constante de biogás no es alcanzable.

1.6. Cepas fúngicas en el tratamiento de biomasa

Los hongos, particularmente aquellos que atacan la lignina, se usan principalmente en el tratamiento previo de la biomasa lignocelulósica para la producción de biogás. Varias clases de hongos, incluyendo pudrición parda, podredumbre blanca y podredumbre blanda hongos (es decir, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Auricularia auricula-judae*, *Trichoderma reesei*), y hongos basidiomicetos (por ejemplo, *Ischnoderma resinsum* y *Fomitella fraxinea*) se han utilizado para el tratamiento previo siendo los hongos de podredumbre blanca los más

efectivos a través de la acción de Enzimas que degradan la lignina (por ejemplo la peroxidasas y lacasa)^{54,55}.

1.6.1. Hongos anaeróbicos

La inusual y amplia variedad morfológica que presentan los hongos se une a un singular y diverso patrón de comportamientos, las diferentes estrategias de vida que han desarrollado explican su enorme importancia en la evolución, en el ecosistema y en el progreso humano.

En el estudio de la diversidad de los hongos todos los sustratos orgánicos y muchos inorgánicos son fuente potencial de estos organismos. En investigaciones recientes en el ecosistema ruminal existe bacterias anaeróbicas y protozoarios⁵⁶, junto con los hongos anaeróbicos recientemente descubiertos⁴⁵, estos microorganismos se encuentran irregularmente distribuidos en la fracción líquida o adheridos al material sólido y paredes del rumen.

Las bacterias y protozoarios han sido estudiados en considerable detalle, siendo su contribución al contexto de la fermentación ruminal más o menos conocido; sin embargo, la noción que se tiene sobre los hongos anaeróbicos es limitada y su participación en los procesos ruminales no está todavía bien aclarado. Los resultados de muchas investigaciones *in vitro* señalan que los hongos anaeróbicos del rumen son digestores de fibra^{57,58}, sin embargo, aunque estos estudios indican que los hongos poseen el componente enzimático para degradar los polisacáridos de la pared celular, muy poco es conocido sobre la extensión de su actividad en la fermentación ruminal, por un lado, se han hecho grandes avances en el conocimiento de los mecanismos y factores que controlan su ciclo de vida, y por otro, se han mejorado los métodos para hacer las estimaciones de sus poblaciones a los diferentes estados de su ciclo de vida.

Una abundante digestión de los componentes fibrosos de las plantas por parte de los hongos anaeróbicos ha sido claramente demostrada en numerosos experimentos *in vitro*^{56,59-61}, estos hongos han demostrado poseer una amplio rango de enzimas que pueden degradar los principales carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) de las paredes celulares de las plantas)⁶²⁻⁶⁵. Aunque no hay evidencia de que los hongos anaeróbicos pueden utilizar lignina como fuente de carbono, estos hongos fueron capaces de disolver hasta un 16 % de la lignina de la paja y heno de trigo (*in vitro*)⁶⁶, estos hongos fueron capaces de degradar y

debilitar substancialmente los tejidos significados de forrajes fertilizados con azufre⁶⁷, particularmente, el *N. frontalis* produce grandes cantidades de celulosas activas, cuya producción fue significativamente incrementada en cultivos mixtos con bacterias metanogénicas⁶⁶, adicionalmente, la degradación de la celulosa por los hongos en presencia de las bacterias metanogénicas fue mucho más rápida que cualquier dato reportado previamente⁵⁸.

1.6.2. Filogenia, género y especie

La clasificación de los hongos del rumen es un tanto incierta hasta el presente en la clasificación de estos hongos se ha prestado poca atención a la estructura vegetativa⁶⁸. La ultra estructura de los zoosporos polifiagelados ha sido usada como la base para la clasificación como *Chitridiomicetos*^{59,69}. El género *Neocallimastix* ha sido asignado a una nueva familia (Neocalimasticaceae) dentro de los *Spizellomycetales*, sin embargo, el análisis de sus características mitóticas no confirma este punto substancialmente⁶⁰. Munn⁷⁰ examinaron, por microscopía electrónica, las características ultraestructurales de *Píromonas* y *Sphaeromonas*, comparándola con las observaciones nuevas o las ya reportadas para el *N. frontalis*. Lo que permitió a Heath⁷¹ considerar que esos géneros contienen las características descritas para los *Chitridiomicetos*⁷², sin embargo, el orden propuesto fue cuestionado por muchas razones, entre otras, siendo los chitridos del rumen anaerobios obligados, la mitocondria no está estrechamente asociada con el microcuerpo⁷²; por lo tanto, ha sido propuesta una nueva clasificación que pueda contener características afines para los *Spizellomycetales* y *Chytridiales*^{70,73}.

Las investigaciones de Munn⁷⁰ revelaron que existen varias características distintivas en común entre los géneros *Neocallimastix*, *Píromonas* y *Sphaeromonas*, las cuales podrían ser usadas colectivamente para definir un nuevo grupo. Hasta el presente han sido descritos otros tipos morfológicos, tales como *Neocallimastix sp*⁵⁷, *Neocallimastix joyonii*⁷⁴, *Neocallimastix*⁷⁵. Sin embargo, sólo el género *Neocallimastix* ha sido formalmente descrito.⁵⁸ Este género conteniendo originalmente sólo una especie, el *N. frontalis* fue enmendado para incluir *N patriciarum*, *Píromonas*⁷⁶ y *Sphaeromonas*⁵⁸. Los zoosporos fueron nombrados originalmente por Liebetanz⁷⁷ y luego descritos por Braune⁵⁸. En términos de las diferencias entre géneros, los zoosporos del *Neocallimastix* son polifiagelados^{76,78}, mientras que los de *Píromonas* y *Sphaeromonas* son monofiagelados⁷⁹. Como se ha mencionado, tanto las diferencias y similitudes ultraestructurales y morfológicas de los zoosporos entre los géneros

han constituido las bases de la actual taxonomía. Sin embargo, se requieren más estudios de sistemática para la categorización de estos microorganismos.

1.6.3. Distribución

La distribución de estos hongos estrictamente anaeróbicos parece estar limitada al tracto digestivo de los herbívoros. Estando altamente relacionados con las dietas fibrosas, teniendo de esta manera una distribución geográfica muy amplia^{60,68}. Desde que demostrara que los hongos anaeróbicos están presentes en el rumen⁸⁰, otros ambientes similares han sido investigados. Así, han sido aislados del ciego y colon del caballo y del contenido fecal de caballos y elefantes⁶⁰. Milne⁸¹ aislaron hongos anaeróbicos de las heces de varios herbívoros, entre otros, camellos, antílopes, llamas, vicuñas, y cebras. Igualmente, Bauchop⁵⁹ encontró hongos anaeróbicos en contenido ruminal obtenido de impalas y otros cérvidos, así como del contenido esto maca de marsupiales. En general, el hallazgo de los hongos anaeróbicos en estos ambientes y su amplia distribución en diferentes especies de herbívoros salvajes sugiere una paralela evolución con la digestión microbiana y demuestra que estos hongos están bien adaptados al medio ambiente.

1.7. Estructura y propiedades de la fibra de lana.

1.7.1. Estructura de fibra

La industria textil utiliza fibras obtenidas de una gran variedad de animales, de los cuales la lana de oveja es la más importante⁸². La lana se clasifica según la longitud y el diámetro de la fibra.

Lanas gruesas, que generalmente su diámetro varía entre 28 y 45 mm. Se utilizan principalmente en textiles para interiores, como alfombras. y tapicería. En prendas de vestir se utilizan lanas finas (<25 mm). La raza más importante para Producir lana fina es el merino.

La lana cruda contiene alrededor de 25 y 70 % de impurezas; estos consisten en grasa de lana (residuos de la transpiración), suciedad y materia vegetal, como semillas y rebabas, la grasa de lana consiste en una mezcla de ácidos grasos y ésteres; y está compuesto de sales de potasio de ácidos grasos, más fosfato, sulfato y compuestos nitrogenados. La grasa de lana, la goma y la suciedad se eliminan al fregar, en el proceso de estambre, la materia se elimina mediante cardado y peinado, mientras que en el sistema de lana es eliminado por carbonización con ácido sulfúrico.

La lana es miembro de un grupo de materiales conocidos como α -queratinas, porque contienen proteínas con una conformación α -helicoidal⁸³. Otras queratinas las proteínas que contienen una conformación α -helicoidal incluyen cuernos y picos. Una característica de estas queratinas duras es una mayor concentración de azufre que la que se encuentra en las queratinas blandas, como las de la piel. El azufre está presente principalmente en forma de cistina.

Las fibras de lana consisten en una mezcla compleja de aproximadamente 170 proteínas diferentes. Estos varían en masa molecular relativa desde menos de 10,000 Da hasta más de 50,000 Da⁸⁴. Las unidades estructurales básicas de las proteínas son aminoácidos⁸⁵. La lana intacta contiene 20 aminoácidos, que tienen la fórmula general $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$, donde (R) es la cadena lateral del aminoácido.

Las proteínas se forman por la condensación de aminoácidos a través de su amino terminal y grupos carboxilo, para producir enlaces amida secundarios (es decir, enlaces peptídicos; $\text{NHCH}(\text{R})\text{CO}$).

Los polipéptidos lineales de alta masa molecular relativa son producidos por múltiples condensaciones. Las cadenas laterales presentes en los residuos de aminoácidos de los polipéptidos pueden ser alifáticos, aromáticos, u otros grupos cíclicos. Varían en tamaño y comportamiento químico y juegan un papel importante tanto en las propiedades físicas como químicas de la lana. Las cadenas laterales no polares (hidrocarburos) de glicina, alanina, fenilalanina, valina, leucina, e isoleucina son de baja reactividad química: mientras que los grupos hidroxilo de la polar las cadenas laterales de serina, treonina y tirosina son químicamente más reactivas. En Fig. 3 se aprecia todo los componentes de su estructura de la queratina.

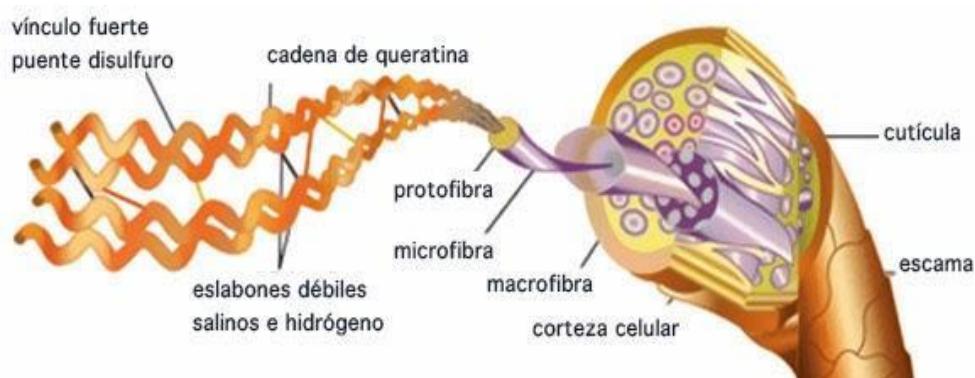


Figura 3. Estructura de la queratina⁸⁸

1.7.2. Propiedades de la fibra

La fibra de la lana tiene una amplia gama de propiedades útiles que no se encuentran en ninguna otra fibra textil⁸⁶. Además, los avances en el conocimiento de la estructura física y química. La composición de la lana ha llevado a métodos para mejorar aún más sus propiedades químicas y físicas y algunos de estos serán discutidos en las siguientes secciones.

La lana tiene una superficie repelente al agua, que surge de los lípidos cerosos que son covalentes unido a la capa exterior de las células de la cutícula, cuando esta capa se elimina la superficie proteica subyacente es hidrófila y se humedece fácilmente⁸⁶. A pesar de su superficie hidrófoba, la lana es un material higroscópico que absorbe o desorbe grandes cantidades de agua con cambios en la humedad relativa circundante, en común con los tintes y los productos químicos, el agua probablemente entra y sale de la lana entre las fibras a través del complejo de la membrana celular, que se extiende a la superficie entre la superposición. El agua absorbida se asocia con las regiones amorfas de la matriz de fibra, en particular con cadenas laterales polares y grupos peptídicos⁸⁷. La humedad de la lana cuando se satura es alrededor del 33 %, que es considerablemente más alto que el de otras fibras textiles.

1.7.3. Queratina

La queratina es una proteína fibrosa insoluble caracterizada por una alta estabilidad debido al alto grado de enlaces cruzados por enlaces disulfuro e hidrógeno. También contiene una variedad de aminoácidos, predominantemente cistina, lisina, prolina, y serina. Teniendo en cuenta la conformación estructural secundaria, las queratinas se han clasificado en α - (hélice de pelo y lana) y β -queratinas (β -hojas de pluma)⁸⁸. Además, se agrupan en queratina dura (cabello, plumas, uñas, lana, etc.) que tiene un alto contenido de disulfuro, enlaces y queratina suave (piel) con un bajo contenido de enlaces disulfuro.

Los desechos ricos en queratina son contaminantes ambientales problemáticos y se liberan en cantidades crecientes como subproductos de la agroindustria. Procesos en forma de plumas, pelo, uñas y cuernos. Los hongos juegan un papel ecológico en la degradación de los sustratos de queratina a través de su contribución al reciclaje del carbono, nitrógeno y azufre de las queratinas.

Considerando desde el punto de vista tanto económico como ambiental, la atención se centró en el manejo de queratinosas recalcitrantes. La hidrólisis de los desechos de queratina por microorganismos es considerada una alternativa biotecnológica para el reciclaje y la valorización a través de microorganismos queratinolíticos.

Las queratinasas, consideradas como proteasas con función queratinolítica, actúan de forma sinérgica con otras enzimas queratinolíticas para degradar el complejo supramolecular en la organización de la queratina⁸⁹, después de romper los enlaces disulfuro de cisteína, el aminoácido principal en la queratina, el sustrato de queratina es más fácilmente disponible para las enzimas hidrolíticas secretadas por microorganismos. A pesar de la estructura resistente, los residuos de queratina pueden ser eficientemente degradados por diversos microorganismos queratinolíticos. que secretan de enzimas como las queratinasas, que son un grupo de proteasas serina o metal.

Estas enzimas son predominantemente extracelulares y son producidos por microorganismos que crecen en un medio basal. que contienen sustratos queratinosos⁹⁰. Se cree que en el futuro, las queratinasas microbianas ocuparán un nicho especial entre las proteasas como enzimas valiosas para el bioprocesamiento de los desechos queratinosos que se liberan en el medio ambiente en grandes cantidades como producto de las actividades humanas⁹¹.

Por su mejor desempeño debido a la mayor especificidad y la biomasa de residuos queratinicos disponibles, las queratinasas reemplazarán a las proteasas en la industria del cuero y detergentes⁹².

Muchos microorganismos crecen naturalmente en materiales queratinosos; entre las bacterias, se ha demostrado la biodegradación de la queratina. por *Bacillus*, particularmente *Bacillus licheniformis*⁹³ y *Bacillus subtilis*⁹⁴, y *Chryseobacterium*⁵³, además, se sabe que los actinomicetos del género *Streptomyces* producen queratinasas⁷⁸. Los hongos queratinolíticos activos más comunes pertenecen a *Aspergillus*⁵³, *Penicillium*⁹⁴, *Fusarium*⁹², *Microsporium*⁹⁵, *Trichoderma*⁹⁶ y géneros *Chrysosporium*⁵³. Una revisión relevante sobre el deterioro microbiológico de queratinasas. Los sustratos fueron realizados por Blyskal et al.⁹⁷, quienes enumeraron y catalogaron géneros fúngicos representativos y predominantes y destacó los más activos.



CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de Ejecución

La presente tesis se ejecutó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María campus Umacollo y en planta IV de la empresa Inca Tops S.A. Cerro Colorado, Arequipa, Perú (Anexo 1)

- Laboratorio H – 301
- Laboratorio de microbiología H – 405
- Laboratorio F – 405 (Vicerrectorado de Investigación)
- Laboratorio F – 407 (Vicerrectorado de Investigación)

2.2 Material

2.2.1 Material Biológico

- Microorganismos aislados de muestras de fibra de alpaca y lana de oveja.
- Hongos aislados del rumen de vaca.

2.2.2 Material de laboratorio

- Jarra de anaerobiosis 2.5 L, Merk
- Asa de Kohl, en argolla y en punta
- Cámara de Neubauer Marienfeld Germany
- Cinta indicadora de pH, Merck
- Espátula. Micropipeta de 10 μ L - 100 μ L, Dragon Lab.
- Micropipeta de 100 μ L - 1000 μ L, Dragon Lab.
- Puntas azules (Para Micropipeta de 100 μ L - 1000 μ L).
- Puntas amarillas (Para Micropipeta de 10 μ L - 100 μ L).
- Racks
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Parafilm.
- Gradilla

2.2.3 Material de vidrio

- Frascos de vidrio de 50 mL, 1000 mL, Boeco Germany.
- Láminas portaobjetos.
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL, 500 mL, Kimax.
- Placas Petri de 10 mL 20 mL.
- Probeta de 50 mL, 100 mL.
- Tubos de ensayo de 20 mL.
- Bagueta

2.2.4 Reactivos

- Azul de Lactofenol.
- Cloranfenicol.
- Gentamicina.
- Kit para tinción de Gram.
- Sulfato de amonio.
- Nihidrina.

2.2.5 Medios de cultivo.

- Agar Agar, Merck.

- Agar Sabouraud, Merck.
- Agar Sangre, Merck.
- Caldo Tioglicolato, Merck.
- Caldo Dextrosa Sabouraud, Merck.
- Caldo papa dextrosa.

2.2.6 Equipos.

- Autoclave, Germany Industrial Corp, HL-340.
- Balanza analítica, Ohaus Adventurer AR31.
- Balanza Scout™ Pro.
- Baño María, PSelecta, Precistern.
- Centrífuga de tubos eppendorf, Drucker 613 B.
- Incubadora, PSelecta.
- Microscopio, Labomed.
- Shaker, Lab companion, SK300.
- Vortex, Mixer, VM-300.
- Reactor DAS de 20L.

2.2.7 Otros

- Agua estéril.
- Alcohol de 97°.
- Algodón.
- Bolsas de Polipropileno.
- Cocinilla.

2.3 Métodos

2.3.1 Aislamiento de microorganismos nativos de residuos sólidos textiles y de rumen de vaca.

Recolección de muestra de los desechos sólidos del procesamiento de fibra de alpaca y lana oveja

Se realizó la recolección de las muestras de los desechos sólidos producidos en el procesamiento de fibra de alpaca y lana de oveja de la planta IV de la empresa Inca Tops S.A. en bolsas ziploc (7x9) debidamente rotuladas y transportadas al laboratorio en un cooler para la preservación de las muestras.

La toma de muestras se realizó en distintos puntos: zarándela muestra “A”, rejilla al ingreso del sedimentador muestras “B”, tachos de desechos muestra “C”.

Aislamiento y purificación de cepas fúngicas de desechos sólidos textiles

Se preparó agar Sabouraud de acuerdo al Anexo 2, luego se esterilizo usando el autoclave por 15 minutos a 120 °C a 1.5 atmosferas y enseguida se distribuyó medio en placas de 20 mL, después de haber gelificado y sellado las placas son llevadas a la incubadora por 24 horas para comprobar la inocuidad del medio.

Se toma con el asa de Kolle una porción de la muestra y se siembra por agotamiento en el medio. Por último se coloca las placas en la jarra de anaerobiosis y se mantienen a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 días.

Para la purificación se realizaron cultivos sucesivos a partir de las placas madres Fig. 4 hasta conseguir cepas puras.

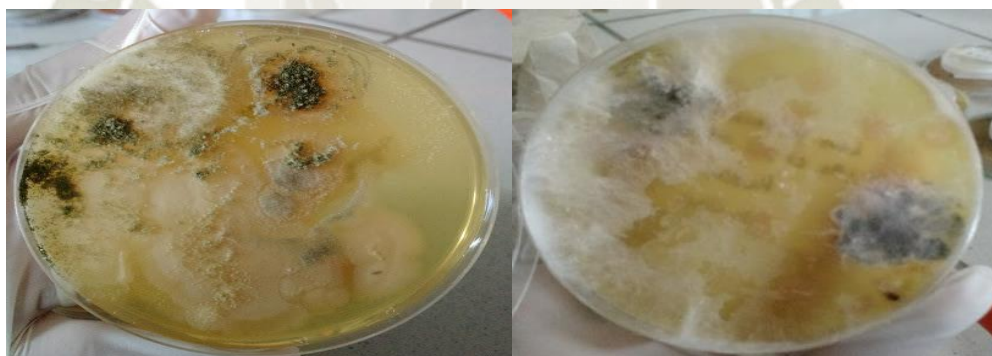


Figura 4. Placas madre

Aislamiento y purificación de cepas fúngicas obtenidas del rumen de vaca

Se compró el rumen de la vaca y se transportó herméticamente cerrado hasta el laboratorio en donde se abrió y se tomaron las muestras de los pliegues internos del rumen, estas fueron sembradas en placas con medio Sabouraud suplementado con gentamicina y cloranfenicol (Anexo 2), estas placas fueron conservadas en la jarra de anaerobiosis durante 15 días.

Para la purificación se realizaron cultivos sucesivos de cada una de las cepas crecidas en las placas madres hasta conseguir cepas puras.

2.3.2 Selección y caracterización de cepas fúngicas con capacidad queratinolítica para la degradación de residuos sólidos textiles

Selección de microorganismos con capacidad de degradación

Para identificar las cepas con capacidad de degradación primero se preparó medio basal salino (MBS) como se muestra en el Anexo 4, se distribuyó 50 mL de este en frascos de 100 mL suplementado con 1 g de fibra de alpaca y lana oveja y finalmente se autoclavó por 15 minutos a 120 °C y 1.5 atm. Posteriormente cada frasco fue inoculado con una cepa fúngica Fig. 5, luego se añadió parafina líquida para que estén en medio anaerobio y se a temperatura ambiente para su adecuado desarrollo.

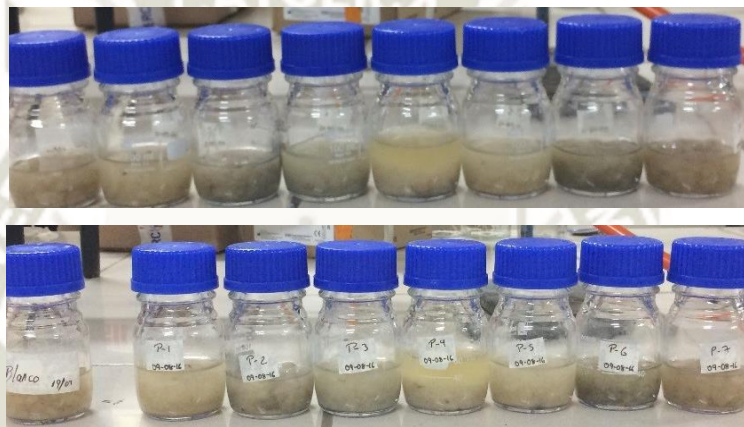


Figura 5. Frascos inoculados

Para la identificación de cepas fúngicas con capacidad queratinolíticas se realizaron dos métodos:

Análisis cuantitativo

➤ *Prueba de ninhidrina para Grupos Amino Libres*

Se filtró 5 mL del contenido a través de un papel filtro usando una bomba al vacío, de este filtrado se colocó 3 mL en un tubo de ensayo y 0.5 mL de ninhidrina al 1 %. La mezcla se llevó a baño maría 37 °C por 10 minutos y se enfrió en baño de agua helada durante 5 minutos. Al terminar se tomó lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda; esta corresponderá a la concentración de grupos amino libres (GAL) generados por la degradación de fibra. Esta prueba se realizó a los 7, 20 y 40 días.

➤ *Análisis gravimétrico*

Finalizados los 40, días los frascos inoculados fueron filtrados a través de papel filtro, previamente pesado, para retener la fibra de alpaca y lana de oveja no degradada, usando

una bomba al vacío, el papel con la biomasa es llevado a la estufa por periodos de dos horas hasta peso constante. Luego se pesa el papel con la muestra y se resta el peso del papel seco.

Caracterización macroscópica de cepas fúngicas

Para la identificación de cepas fúngicas se realizó en cultivos puros y se tomaron en cuenta las siguientes características: color, crecimiento, textura y borde.

Caracterización e identificación molecular de especies fúngicas seleccionadas con capacidad de degradación

➤ *Aislamiento de ADN*

El ADN de las cepas nativas fue aislado de la siguiente manera, con una asa Kolle se tomó una asada de colonias de la placa Petri, la cual fue resuspendido en 200 μL de buffer de lisis en un eppendorf, para romper las paredes celulares fueron añadidos perlas de vidrio (Bits), se colocó al vortex por 5 minutos y luego a baño maría por 15 minutos a 65 °C, después de este periodo se agregó 150 μL de MPC, se agitó y se llevó a la centrifugación por 5 minutos a máxima velocidad.

El sobrenadante se recolectó y colocado en un nuevo eppendorf al cual se le añadió 500 μL de isopropanol, se llevó a centrifugación por 1 minuto a máxima velocidad, después el sobrenadante fue eliminado y el pellet que contiene el ADN fue resuspendido con 50 μL de agua destilada estéril.

➤ *Amplificación del gen ITS para Hongos.*

Posteriormente la amplificación del ADN se realizó mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para realizar la PCR a cada tubo se añadió 2 μL de ADN de cada muestra, 2 μL de la solución de primers para la amplificación de gen ITS del ARN ribosomal (con una concentración final de 200 μM), y 30 μL de *Platinum PCR Supermix High Fidelity*.

Los tubos, se colocaron en un termociclador Bio Rad (*MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option*) y se programó de la siguiente manera: 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 94 °C por 70 segundos (desnaturalización), 55 °C por 70 segundos (hibridación) y 72 °C por 70 segundos (extensión). Finalmente 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. Luego de la amplificación las muestras serán mantenidas en el termociclador a 4°C (post incubación).

➤ ***Electroforesis y purificación de productos de PCR***

El producto de la PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.5 % y la banda correspondiente al gen ITS fue cortado del gel para su purificación utilizando el kit *QIAquick PCR Purification Kit*. Donde se utilizó columnas de QIAGEN y se siguió las instrucciones de la compañía.

➤ ***Secuenciación de productos de PCR***

A 20 μ L de ADN purificado se le añadió 1 μ L de Primer para secuenciar (el gen ITS para Hongos) los tubos fueron etiquetados y fueron enviados al DNA *Sequencing / Functional Biosciences, Inc.*

➤ ***Filogenia molecular***

Las secuencias del gen ITS de las cepas nativas, que fueron obtenidas por secuenciación, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), y luego se construyó arboles filogenéticos para determinar las distancias genéticas, porcentaje de similitud con otras especies. Además se realizaron pruebas de alineamiento multiple y filogenia con el programa CLUSTAL Omega⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Elaboración de curvas de crecimiento de cepas fungicas.

Se preparó caldo papa dextrosa como se indica en el Anexo 5 y se distribuyó 15 mL del caldo en tubos de ensayo, se comprobó la inocuidad del medio para luego ser inoculada con cada una de las cepas fúngicas, por último se colocó 2 mL de parafina liquida estéril en cada tubo inoculado creando así el ambiente anaerobio necesario para el desarrollo de cada una de las cepas fúngicas. Estas fueron conservadas durante 15 días a temperatura ambiente.

Se preparó nuevamente caldo papa dextrosa (Anexo 5) en frascos de 100 mL a los cuales se les colocó el inóculo y la parafina estéril, se sellaron y se conservaron a temperatura ambiente para la toma de muestras cada 12 horas durante 16 días conservando las mismas en congelación. Este procedimiento se realizó para cada uno de los hongos. Para procesar las muestras, estas fueron llevadas a temperatura ambiente; se pesaron tubos Eppendorf vacíos luego se midió 1 mL, se llevó a la centrífuga por 5 minutos a 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se pesó cada tubo Eppendorf con el pellet formado, por diferencia de pesos se halló la masa. De esta forma se realizó las curvas de crecimiento de cada cepa.

2.3.3 Diseño y construcción de un bioreactor DAS para el tratamiento biológico de los residuos sólidos textiles.

El reactor de digestión anaeróbica seca fue diseñado en base al estudio de los residuos sólidos industriales de la planta Inca Tops S.A., conformada por residuos de lana de oveja y fibra de alpaca, además de rastrojo (restos de tallos, hojas, pajas, tierra, etc.) y al comportamiento de las cepas aisladas.

Cada uno de los reactores está conformado por 7 partes o elementos, los cuales fueron: vessel o recipiente, chaqueta externa, *headplate*, sistema de acumulación de gases, sistema de acumulación de biol, sistema de recirculación del influente, sistema de control de temperatura automático.

El *headplate* se diseñó 3 puertos, cada uno con un acople sellado con silicona que permite asegurar la hermeticidad para evitar pérdida de biogás; cuenta además con una ventana y una fuente de luz LED que permite ver el correcto funcionamiento del aspersor. A continuación, se presenta el esquema del *headplate* y la disposición de los puertos y accesorios.

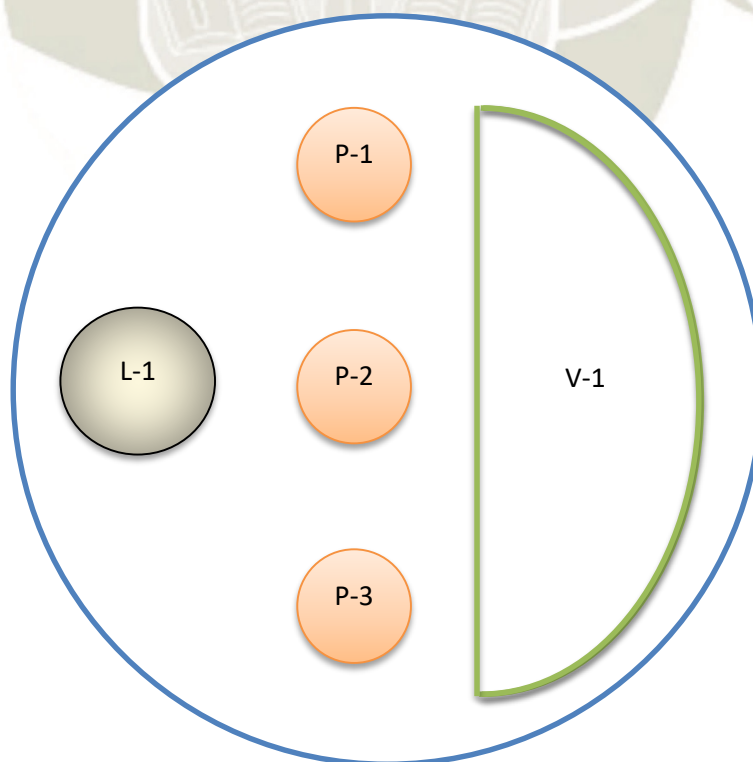


Figura 6. Esquema de disposición de puertos y accesorios, *headplate*

La Fig. 6, representa gráficamente la disposición y orden de los puertos en el *headplate* de plástico, la codificación es presentada a detalle a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2 Codificación y usos de los puertos y accesorios

Código	Uso
P-1	Puerto de salida de gas
P-2	Puerto de recirculación del influente
P-3	Puerto de inoculación
L-1	Luz LED
V-1	Ventana

La construcción general del reactor se ejecutó en plástico para evitar la corrosión por el ácido sulfhídrico. A continuación en la Tabla 3 se presenta a detalle cada elemento del reactor de digestión anaeróbica seca (DAS).

Tabla 3. Elementos del reactor DAS descritos a detalle

Elemento	Descripción	Material
Vessel o recipiente	Sistema que alberga la biomasa que además cuenta con una rejilla en la parte inferior del <i>vessel</i> ubicada a 10 cm del fondo del recipiente, posee una altura de 365 mm, diámetro de 250 mm y una relación altura-diámetro H/D de 1.5	Plástico
Chaqueta externa	Permite la transferencia de calor, rodea la parte externa del <i>vessel</i> posee una entrada y una salida para que fluya el agua temperada proveniente de la fuente de calor.	Plástico
Headplate	Posee 3 puertos dispuestos para diferentes funciones, 1 ventana y 1 luz LED que permite la visualización del buen funcionamiento del aspersor	Plástico
Sistema acumulador de gas	Posee una válvula que está conectada al puerto de salida de gases del <i>headplate</i> .	Plástico
Sistema acumulador de biol	Posee una válvula que está conectada al puerto de salida del influente del <i>vessel</i>	Acero inoxidable
Sistema de recirculación del influente	Posee sensores de nivel que activan una bomba de agua la cual permite que el influente suba por las tuberías y se distribuya mediante el aspersor	Plástico
Sistema de control de temperatura automatizado	Cuenta con una caja de control automatizada con sensores de temperatura que activa una bomba cuando la temperatura es baja, esta bomba permite que el agua almacenada en el recipiente de agua sea llevada a la terma para temperarla e ingresarla por la parte inferior de la chaqueta para que el agua no temperada salga por la parte superior hacia el recipiente del agua e iniciar todo nuevamente.	Tuberías de PVC

Se construyeron 3 biorreactores para las pruebas experimentales, considerando una capacidad de 20 L en total y un volumen efectivo de 11 L. Los reactores experimentales fueron construidos por la empresa Crefinsa E.I.R.L.

Puesta en marcha de los reactores.

Previa puesta en marcha del reactor se prepararon los inóculos de la siguiente manera: se preparó caldo papa dextrosa (Anexo 2), se distribuyeron en frascos de 100 mL cada uno, luego fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 120°C a 1.5 atmósferas. Se dejó enfriar y se colocó en incubadora por espacio de 24 horas para probar la inocuidad del medio.

Para el inóculo se toma una pequeña porción de las muestras aisladas y se coloca en el medio, en seguida se le añade vaselina líquida esteril hasta que cubra la superficie, luego se conserva a temperatura ambiente durante 15 días. Finalmente se realizó el conteo y los cálculos para tener la misma cantidad de microorganismos por inóculo.

Para la puesta en marcha de los reactores primero se colocó 5 Kg de los residuos sólidos textiles (biomasa) previamente hidratado, luego se inoculó el reactor. Finalmente se cerró el reactor herméticamente creando un ambiente anaerobio propicio para el desarrollo del proceso. Los reactores trabajaron por un periodo de 60 días, de los cuales los 15 primeros días se mantiene cerrado sin recirculación del influente (fase de adaptación), pasado este tiempo se prende el sistema y abren las llaves para la recirculación del influente durante 45 días.

2.3.4 Evaluación de la degradación de la biomasa en el reactor de digestión anaeróbica seca

- **Composición de la biomasa**

Se analizó (residuos sólidos textiles) de la planta Inca Tops- Zamacola y la biomasa después de 60 días de tratamiento en el reactor DAS. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María Arequipa-Perú.



CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de microorganismos nativos de residuos sólidos textiles y de rumen de vaca

3.1.1. Aislamiento y purificación de cepas fúngicas de desechos sólidos textiles

Al trabajar con un reactor anaerobio se requiere el aislamiento de cepas con capacidad de crecimiento en ambientes con ausencia de oxígeno, es por esto que el aislamiento y purificación de cepas que se realizó a partir de las placas madre se dejaron crecer en jarras de anaerobiosis.

Las cepas fúngicas fueron aisladas en agar Sabouraud donde se obtuvieron 15 cepas: Muestra A “zarándela” 6 cepas, muestra B “Tachos de desechos” 6 cepas, muestra C “Sedimentador” 3 cepas. Como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las cepas aisladas de la planta IV de Inca Tops.

Muestra “A”		Muestra “B”		Muestra “C”	
Cepa		Cepa		Cepa	
1	MA-1	1	MB-1	1	MC-1
2	MA-2	2	MB-2	2	MC-X
3	MA-3	3	MB-3	3	MC-Y
4	MA-4	4	MB-4		
5	MA-X	5	MB-X		
6	MA-Y	6	MB-Y		

3.1.2. Aislamiento y purificación de cepas fúngicas obtenidas del rumen de vaca

En investigaciones sobre el ecosistema ruminal existen los hongos anaeróbicos recientemente descubiertos⁴⁵. Estos microorganismos se encuentran irregularmente distribuidos en la fracción líquida o adheridos al material sólido y paredes del rumen.

Las cepas fúngicas aisladas en el pliegue del rumen fueron 8 cepas, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las cepas aisladas del rumen de vaca

Muestra de pliegue	
Nº	Cepa
1	P-X
2	P-1
3	P-2
4	P-3
5	P-4
6	P-5
7	P-6
8	P-7

3.2. Selección y caracterización de cepas fúngica con capacidad queratinolítica para la degradación de residuos sólidos textiles

Los microorganismos aislados además de ser anaerobios deben tener la capacidad de degradar los desechos textiles es por eso que se realizaron las siguientes pruebas.

3.2.1 Prueba de ninhidrina para grupos amino libres

Todas aquellas sustancias que presentan al menos un grupo amino y uno carboxilo libre, reaccionaran con la ninhidrina. La positividad se manifiesta por la aparición de un color violáceo debido a la lisis de las proteínas y los aminoácidos, ya que producto de esta se

genera amonio y aminos que dan la coloración característica, debido a una oxidación y reducción intermolecular de la ninhidrina en presencia de amoníaco.

La intensidad de color violáceo es directamente proporcional a la cantidad de grupos amino libres, es decir que a mayor degradación más grupos amino libres y por ende una coloración más intensa en la reacción, esta variación de las intensidades de color se pueden apreciar en el panel fotográfico del Anexo 5.

Esta prueba se realizó a siguiendo la metodología del Anexo 4 en la que se midieron los grupos amino libres mediante la prueba de ninhidrina a los 7, 20 y 40 días donde se midió la absorbancia a 540 nm, dando como resultado los dato de la Tabla 6

Tabla 6. Medición de la absorbancia para prueba de Ninhidrina.

	Cepa	GAL (7 Días) Abs a 540 nm	GAL (20 Días) Abs a 540nm	GAL (40 Días) Abs a 540nm
1	P-X	0.631	1.123	1.704
2	P-1	0.701	1.267	1.698
3	P-2	0.593	1.068	1.536
4	P-3	0.254	0.294	0.325
5	P-4	0.314	0.387	0.439
6	P-5	0.088	0.162	0.203
7	P-6	0.336	0.457	0.504
8	P-7	0.179	0.292	0.361
9	MA-1	0.117	0.212	0.304
10	MA-2	0.107	0.191	0.282
11	MA-3	0.116	0.276	0.345
12	MA-4	0.105	0.147	0.186
13	MA-X	0.134	0.183	0.261
14	MA-Y	0.115	0.259	0.321
15	MC-X	0.178	0.241	0.307
16	MC-1	0.506	1.128	1.625
17	MC-Y	0.134	0.168	0.206
18	MB-1	0.353	0.362	0.405
19	MB-2	0.103	0.137	0.178
20	MB-3	0.016	0.038	0.085
21	MB-4	0.402	1.036	1.529
22	MB-X	0.143	0.149	0.152
23	MB-Y	0.121	0.129	0.136

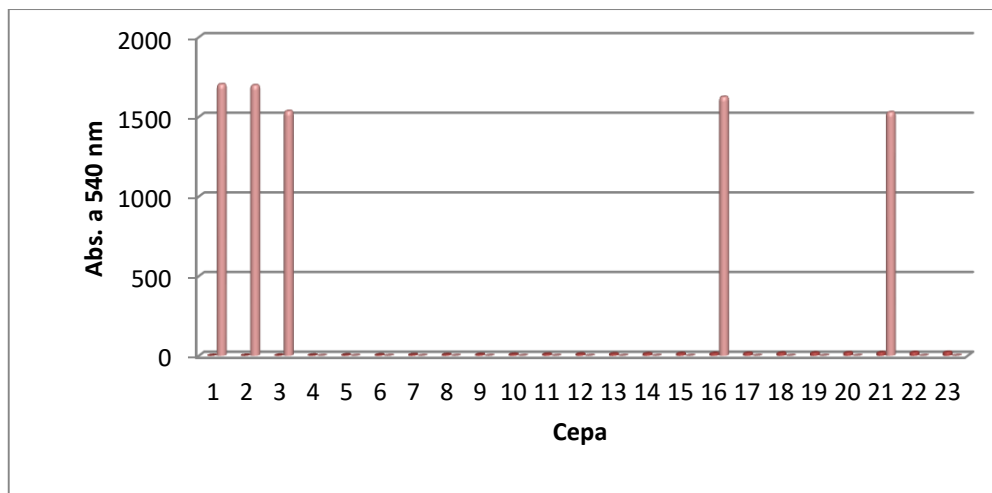


Figura 7. Degradación de biomasa a los 40 días por cuantificación de grupos amino libres

La Fig. 7 muestra una gráfica realizada con los datos proporcionados en la Tabla 6, específicamente con los datos de la prueba de ninhidrina para grupos amino libres realizada a los 40 días, en esta se aprecia que las cepas 1, 2, 3, 16 y 21 que corresponde a las cepas P-X, P-1, P-2, MB-4 y MC-1 respectivamente muestran el mayor porcentaje de degradación, en comparación con las otras cepas que poseen valores mucho más bajos

3.2.2. Análisis gravimétrico

Esta prueba se realizó a los 40 días dando como resultados Fig 8 mostrada a continuación, esta fue realizada con los datos de la Tabla 7.

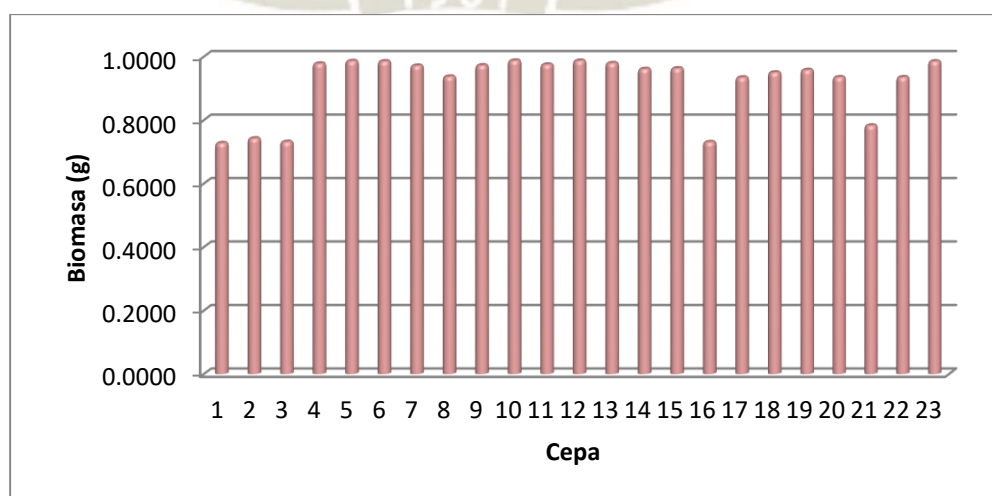


Figura 8. Peso de la biomasa degradada por cepa

La Fig.8 muestra de manera más clara que las cepas 1, 2, 3, 16 y 21 correspondientes a las cepas P-X, P-1, P-2, MB-4 y MC-1 respectivamente son las de menor masa esto debido a la degradación de la muestra por acción de las cepas fúngicas.

La Tabla 7 mostrada a continuación presenta los datos obtenidos del análisis gravimétrico, en esta se muestra que el peso de la biomasa es inversamente proporcional a la degradación de esta, es decir que a menor peso mayor la cantidad de degradación de la biomasa.

Con estos datos podemos inferir que las cepas con capacidad queratinolítica son las cepas P-X, P-1, P-2, MB-4 y MC-1.



Tabla 7. Datos del análisis gravimétrico.

	Cepa	Peso del papel (g)	Peso del papel y biomasa (g)	Peso de Biomasa
1	P-X	0,6913	1,4190	0,7277
2	P-1	0,6621	1,4047	0,7426
3	P-2	0,6703	1,4019	0,7316
4	P-3	0,6815	1,6599	0,9784
5	P-4	0,6648	1,6510	0,9862
6	P-5	0,6756	1,6609	0,9853
7	P-6	0,6845	1,6562	0,9717
8	P-7	0,6903	1,6276	0,9373
9	MA-1	0,6599	1,6327	0,9728
10	MA-2	0,6814	1,6690	0,9876
11	MA-3	0,6756	1,6509	0,9753
12	MA-4	0,6687	1,6560	0,9873
13	MA-X	0,6826	1,6623	0,9797
14	MA-Y	0,6849	1,6461	0,9612
15	MC-X	0,6676	1,6308	0,9632
16	MC-1	0,6839	1,4149	0,7310
17	MC-Y	0,6734	1,6080	0,9346
18	MB-1	0,6635	1,6138	0,9503
19	MB-2	0,6792	1,6374	0,9582
20	MB-3	0,6657	1,6011	0,9354
21	MB-4	0,6812	1,4646	0,7834
22	MB-X	0,665	1,6005	0,9355
23	MB-Y	0,6724	1,6578	0,9854

3.2.3 Caracterización macroscópica de cepas fúngicas




Se describió la apariencia macroscópica de las cepas fúngicas aisladas de las muestras de residuos sólidos de la planta de Inca Tops S.A. como se muestra en la Tabla 8 y del rumen de la vaca como se muestra en la Tabla 9 tomando en cuenta el crecimiento, el borde, la textura y la tonalidad del micelio.

Tabla 8. Descripción macroscópica de cepas fúngicas aisladas de los residuos sólidos de la planta de Inca Tops S.A

Cepa	Figura	Descripción
Cepa MB-4	 <p>Figura 9. Apariencia macroscópica de la cepa MB-4</p>	<p>Esta cepa presenta un micelio de crecimiento filiforme con borde ondulado y filamentosos, una textura algodonosa y de tonalidad en el centro de color blanco con bordes color crema en el anverso. Presenta también exudado</p>
Cepa MC-1	 <p>Figura 10. Apariencia macroscópica de la cepa MC-1</p>	<p>Esta cepa presenta un micelio de crecimiento filiforme e irradiado con borde filamentosos, una textura algodonosa y de tonalidad blanca con un centro de color crema en el anverso.</p>

En la Tabla 8 se describe la forma macroscópica del hongo después de 1 mes de crecimiento a temperatura ambiente y presión normal de la muestra de residuos sólidos de la planta de Inca Tops S.A.

Tabla 9. Descripción macroscópica de cepas fúngicas aisladas del rumen de vaca.

Cepa	Figura	Descripción
Cepa P-X	 <p data-bbox="470 649 837 728">Figura 11. Apariencia macroscópica de la cepa P-X</p>	<p>Esta cepa presenta un micelio de crecimiento rizoide con borde ondulado, una textura pulvurente y de tonalidad marron con vistos crema en el anverso.</p>
Cepa P-1	 <p data-bbox="470 1120 837 1209">Figura 62. Apariencia macroscópica de la cepa P-1</p>	<p>Esta cepa presenta un micelio de crecimiento redondo con borde filamentosos, una textura algodonosa y de tonalidad blanca en el adverso.</p>
Cepa P-2	 <p data-bbox="470 1590 837 1691">Figura 73. Apariencia macroscópica de la cepa P-2</p>	<p>Esta cepa presenta un micelio de crecimiento filamentosos y rugoso con borde filamentosos, una textura aterciopelada y de tonalidad blanca con un centro plomo claro.</p>

En la Tabla 9 se describe la forma macroscópica del hongo después de 1 mes de crecimiento a temperatura ambiente y presión normal de la muestra de rumen de vaca.

3.2.4 Caracterización e identificación molecular de especies fúngicas seleccionadas con capacidad de degradación

Secuenciación de productos de PCR

Las secuencias de las cepas seleccionadas se muestran en el Anexo 6

Filogenia molecular

Las secuencias obtenidas, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y luego con el programa CLUTAL Omega⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Cepa P-X

A partir de los resultados obtenidos se extrajo los microorganismos con mayor similitud para su posterior procesamiento de alineamiento y filogenia cuyos resultados se muestran en la Fig.13

Por otro lado en recientes investigaciones este hongo es capaz de biodegradar polietileno¹⁰¹.

Una vez realizado el análisis de BLAST se pudo hallar que la muestra PX presenta 100% de similitud con el género *Aspergillus* y dentro de estas a las especies *oryzae*, *flavus*, *fiemonthi*, *minisclerotigenes* (Tabla 10).

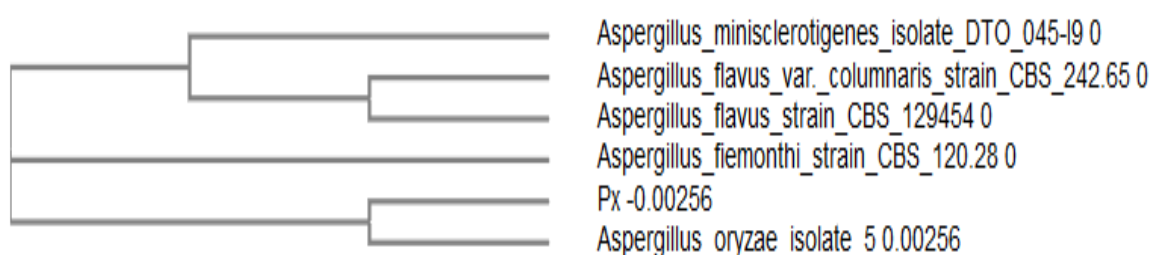


Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen ITS de la cepa aislada PX y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.

Tabla 10. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada PX.

N°	Descripción	Max score	Total Score	Query Cover	E-value	Ident	Accession
1	<i>Aspergillus oryzae</i> isolate 5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%	MK120548.1
2	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 129454 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%	MH865341.1
3	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i> strain CBS 242.65 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%	MH858555.1
4	<i>Aspergillus fiiemonthi</i> strain CBS 120.28 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%	MH854948.1
5	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i> isolate DTO 045-19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	100%	0.0	100%	MH279386.1

Cepa P-1

En la Tabla 11 presentada a continuación muestra el resultado del análisis BLAST realizado a la secuencia, dando como resultado que el mayor porcentaje de identidad encontrada es del 99% con la cepa *Fusarium oxysporum*. Por lo que se infiere que la cepa P-1 pertenece al género *Fusarium* sp.

Tabla 11. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada P1

h	Descripción	Max score	Total Score	Query Cover	E-value	Ident	Accession
1	<i>Fusarium oxysporum</i> culture MUT<ITA>;3697 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	100%	0.0	99%	MK036370.1
2	<i>Fusarium oxysporum</i> strain CBS 130320 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	100%	0.0	99%	MH865887.1
3	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>perniciosum</i> strain CBS 794.70 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	100%	0.0	99%	MH859945.1
4	<i>Fusarium</i> sp. DV-2018a strain CBS 244.61 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	100%	0.0	99%	MH858037.1
5	Fungal sp. isolate <i>Astragalus membranaceus</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	100%	0.0	99%	MH095988.1

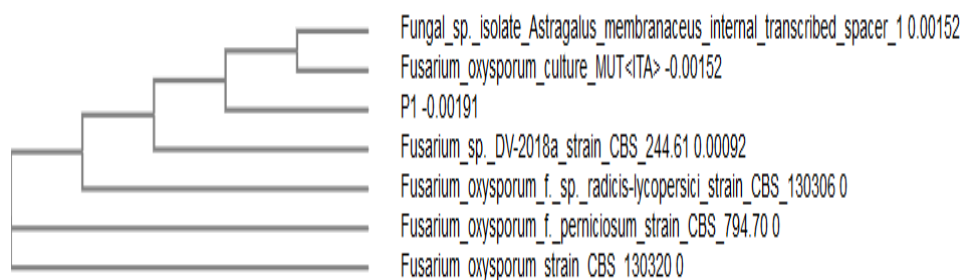


Figura 15.Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada P-1 y las diferentes especies de colección descritas como similitud.

En la Fig.15 se muestra el árbol filogenético con las cepas fúngicas con mayor porcentaje de similitud, donde según estudios este género de hongo degrada hemicelulosa de paredes celulares vegetales¹⁰².

Cepa P-2

Como se observa en la Tabla 10 se tiene a 5 cepas con similitud a la cepa aislada P-2, esta cepa tiene una identidad del 100 % lo cual es *Aspergillus* sp. con alta similitud al *Aspergillus flavus*. En el estudio filogenético Fig. 16. La cepa P-2 es una nueva especie de *Aspergillus* sp y este hongo tiene la capacidad de degradar materiales lignocelulosicos¹⁰³.

Tabla 12. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada P-2

Nº	Descripción	Max score	Total Score	Query Cover	E-value	Ident	Accession
1	<i>Aspergillus oryzae</i> isolate 5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	100%	MK120548.1
2	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 129454 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	100%	MH865341.1
3	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>columnaris</i> strain CBS 242.65 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	100%	MH858555.1
4	<i>Aspergillus fienthii</i> strain CBS 120.28 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	100%	MH854948.1
5	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i> isolate DTO 045-I9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	100%	MH279386.1

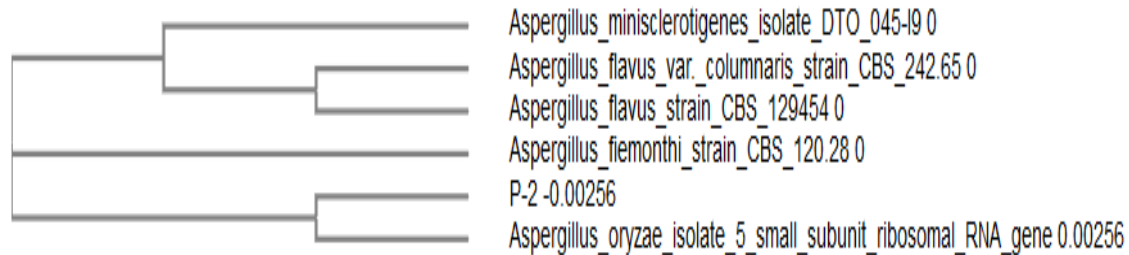


Figura 86.Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada P-2 y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.

Cepa MB-4

Como se observa en la Tabla 13 tienen una mayor similitud 5 cepas con la cepa MB-4, una identidad del 99% esta cepa es una nueva variedad de *Fusarium oxysporum*.

Tabla 23. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada MB-4.

N°	Descripción	Max score	Total Score	Query Cover	E-value	Ident	Accession
1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate UFA0019 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	100%	0.0	99%	MK114163.1
2	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate FJVP-9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;partial sequence	948	948	100%	0.0	99%	MG825180.1
3	<i>Fusarium oxysporum</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	100%	0.0	99%	MG736729.1
4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. batatas strain CBS 259.50 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	100%	0.0	99%	MH856612.1
5	<i>Fusarium oxysporum</i> culture MUT<ITA>:3697 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; partial sequence	948	948	100%	0.0	99%	MK036370.1

En el estudio filogenético Fig.17 La cepa MB-4; fueron homólogas con las otras especies, con alto grado de similitud y que la distancia encontrada agrupó a las secuencias en una sola especie.

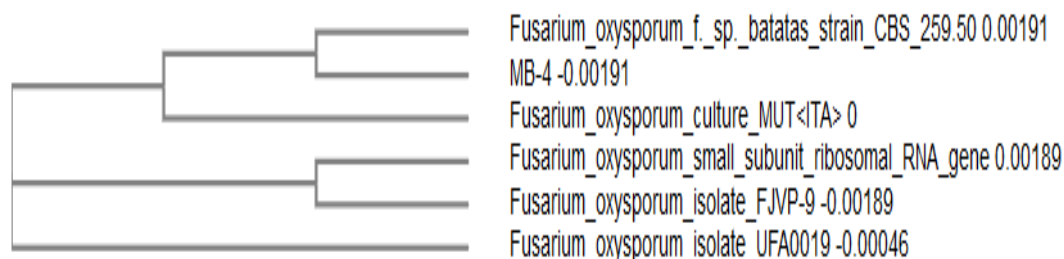


Figura 97. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada MB-4 y las diferentes especies de colección válidamente descritas como similitud.

Cepa MC-1

En el estudio filogenético Fig.18 la cepa MC-1 se muestra como una nueva variedad de la especie *Fusarium Oxysporum*

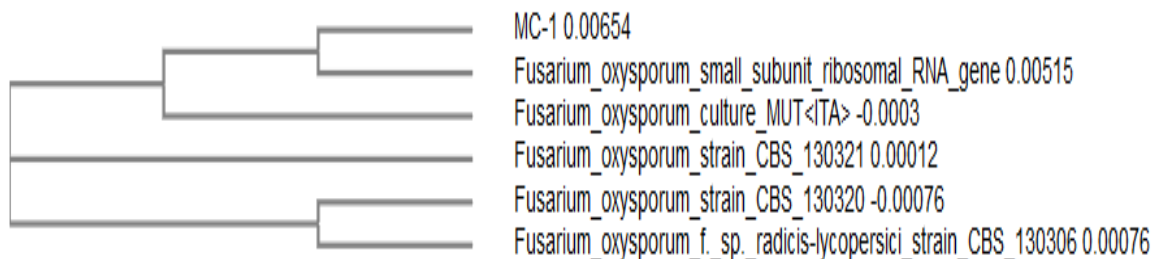


Figura 108. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen del ITS de la cepa aislada MC-1 y las diferentes especies de colección descritas como similitud.

Esta variedad de hongos *Fusarium Oxysporum* según estudios realizados en el 2016 por Folasade M. Olajuyigbe¹⁰⁴ está relacionada a la biodegradación de celulosa.

Como se observa en la Tabla 14 la mayoría de cepas con el mismo porcentaje de identidad del 99% se puede afirmar que es *Fusarium Oxysporum* la cepa MC-1.

Tabla 14. Hongos con mayor similitud con la cepa aislada MC-1

N°	Descripción	Max score	Total Score	Query Cover	E-value	Ident	Accession
1	<i>Fusarium oxysporum</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	MG736729.1
2	<i>Fusarium oxysporum</i> culture MUT<ITA>:3697 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	MK036370.1
3	<i>Fusarium oxysporum</i> strain CBS 130321 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	MH865888.1
4	<i>Fusarium oxysporum</i> strain CBS 130320 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	MH865887.1
5	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. radicle-lycopersici strain CBS 130306 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	MH865886.1

3.2.5 Elaboración de curvas de crecimiento de cepas fúngicas.

Una vez seleccionadas las cepas fúngicas se realizó las curvas de crecimiento de las siguientes cepas.

Cepa P-X

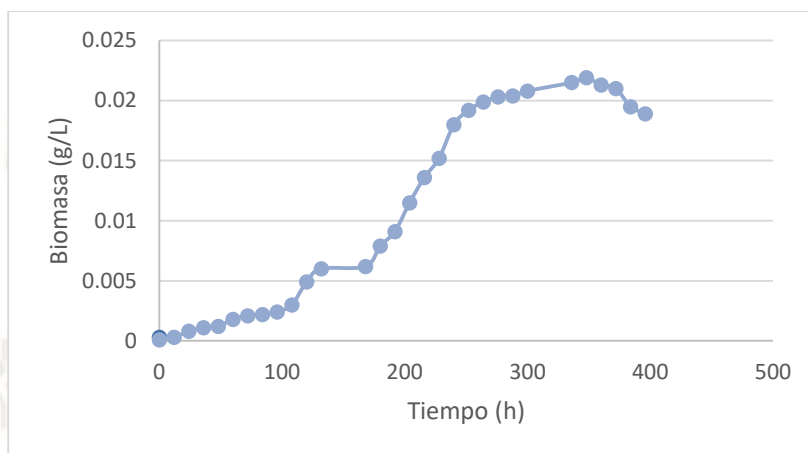


Figura 19 Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa P-X

En la Fig.19 la cepa P-X llega a un crecimiento máximo a las 348 horas (14 días y medio), lo que significa que a las 360 horas entra a una fase de desaceleración o fase estacionaria es decir que para su crecimiento y su reproducción.

Cepa P-1

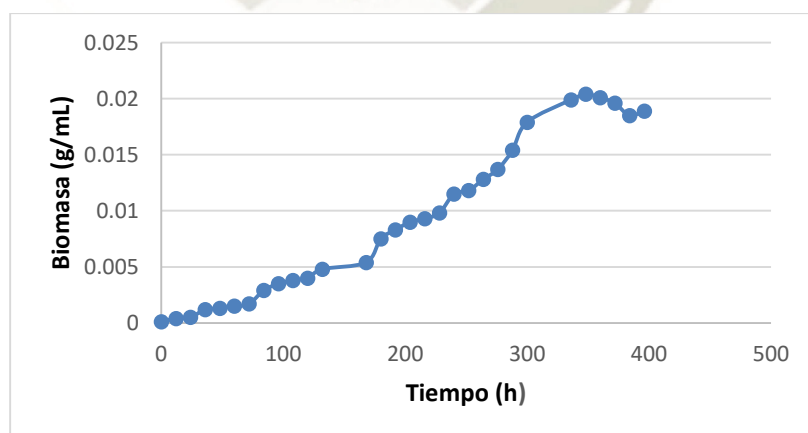


Figura 20.Curva de crecimiento relación masa vs tiempo cepa P-1

Como se observa en la Fig. 20 la cepa P-1 llega a un crecimiento máximo a las 348 horas (14 días y medio), lo que significa que a las 372 horas entra en una fase de desaceleración y luego a una fase estacionaria es decir que para su crecimiento y su reproducción.

Cepa P-2

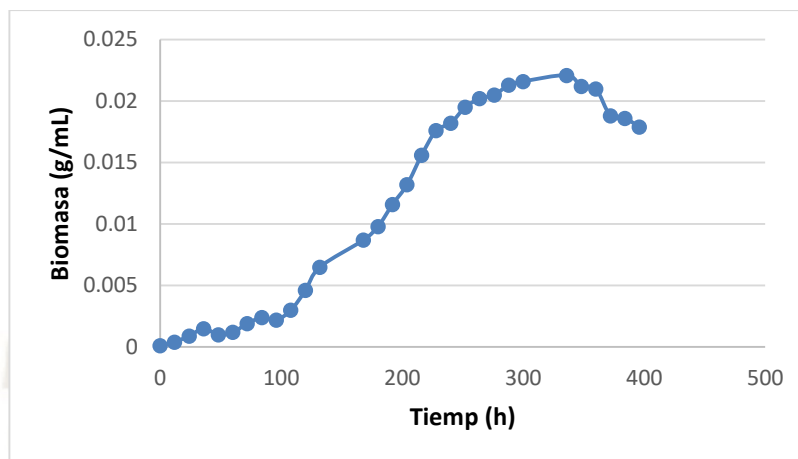


Figura 21. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo cepa P-2

Como se observa en la Fig. 21 la cepa P-2 llega a un crecimiento máximo a las 336 horas (14 días), lo que significa que a las 360 horas entra a una fase de desaceleración o fase estacionaria es decir que, para su crecimiento y su reproducción, este hongo demoró en crecer 14 días.

Cepa MB-4

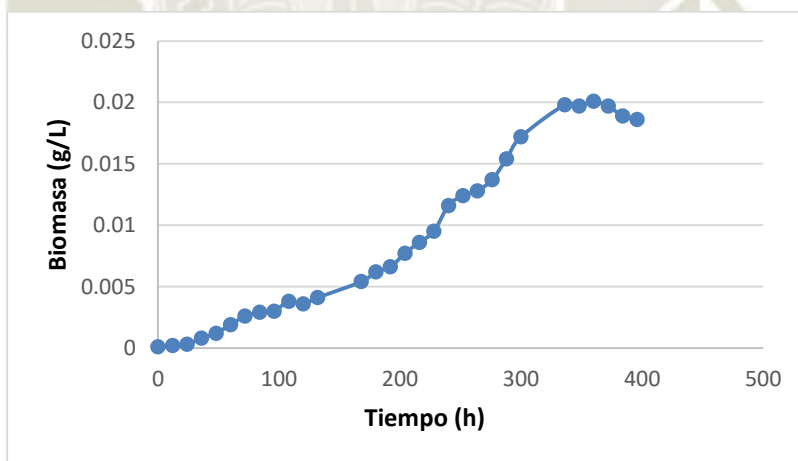


Figura 22. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa MB-4

En la Fig. 22 la cepa MB-4 llega a un crecimiento máximo a las 360 horas, lo que significa que a las 384 horas entra a una fase estacionaria o también llamada fase de desaceleración., este hongo demora 15 días en crecer como el hongo MC-1.

Cepa MC-1

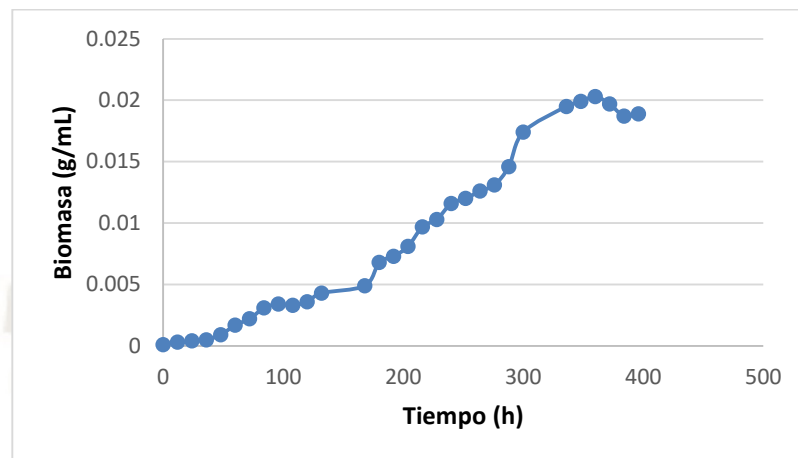


Figura 23. Curva de crecimiento relación masa vs tiempo Cepa MC-1

En la Fig. 23 la cepa MC-1 llega a un crecimiento máximo a las 360 horas, lo que significa que a las 372 horas entra a una fase estacionaria o también llamada fase de desaceleración., este hongo demora 15 días en crecer como el hongo MB-4.

La cepa MC-1 es una nueva especie de *Fusarium* sp. Y fue encontrada en esta investigación esta nueva variedad tiene propiedades de degradación de celulosa¹⁰⁵.

3.3 Diseño y construcción de un reactor para el tratamiento biológico de los residuos sólidos textiles.

En la configuración del reactor se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- *Uso de reactor batch*: se caracteriza por una carga y vaciado total de la cámara de digestión.

Este tipo de digestores son eficaces para la digestión de materias celulósicas que no pueden ser tratados en digestores de tipo continuo debido al posible taponamiento de los conductos de alimentación y salida.

- *Una etapa* : Todas las etapas de la digestión anaeróbica se cumplen en una única cámara en el cual todos los microorganismos están sometidos a las mismas condiciones.

La digestión se puede dar en una etapa o dos etapas en esta última el reactor divide la digestión en 2 cámaras la primera desarrolla la etapa ácido génica y la segunda la acética y metanogénicas esto permite optimizar las condiciones el desarrollo de cada tipo de microorganismo y extraer los sólidos no digeribles antes de que pasen a la etapa metanogénica.

Sin embargo al trabajar con un material de desecho de la industria textil que tiene naturaleza recalcitrante esto es imposible, además estos modelos no son fácilmente escalables y teniendo en cuenta se trabajan con toneladas de residuos sólidos textiles el dividir la digestión en dos etapas traería consigo un gasto excesivo que no estaría dentro de los parámetros costo beneficio.

Todas las etapas de la digestión anaeróbica se cumplen en una única cámara en la cual todos los microorganismos están sometidos a las mismas condiciones.

- *Temperatura:* Se trabaja con una temperatura mesófila de 24°C la cual permite el buen desarrollo de hongo ya que temperaturas muy bajas disminuyen la cinética de las cepas fúngicas, haciendo más lento el proceso de degradación, y temperaturas altas podrían dañar el micelio del hongo
- *Recirculación del influente* Para la recirculación del influente se colocó en la parte superior un aspersor inclinado para asegurar la salida del influente por todos los agujeros además se colocó una rejilla tipo malla con agujeros de 0,5 cm de diámetro el cual restringe el paso de material de desecho grande y permite el paso del influente sin tener el problema de taponamiento en la salida hacia el contenedor de biol.

El influente al tener una relación de 2:1 con respecto a la biomasa para que mantenga húmeda y pueda formarse el biofilm cantidades superiores a esta impedirían la formación del biofilm y la deficiencia del influente causa una mayor acumulación de compuestos intermedios como los AGV que causan indirectamente una inhibición en el proceso.

3.3.1 Diseño de un reactor DAS para el tratamiento biológico de los residuos sólidos textiles

Vessel y chaqueta

El *vessel* y la chaqueta fueron de plástico para evitar la corrosión por el ácido sulfhídrico.

El *vessel* cuenta con una rejilla ubicada a 10 cm del fondo del recipiente, con huecos de 5 mm de diámetro que permite el paso del influente y evita el paso de biomasa que podría obstruir la salida hacia el contenedor de biol, además el *vessel* posee una altura de 365 mm, diámetro de 250 mm y una relación altura-diámetro H/D de 1.5 ya que de esta forma se obtiene un menor tiempo de retención de gases lo cual es importante para la producción de biogás

La chaqueta cuenta con un puerto de ingreso en la parte inferior para el agua temperada y un puerto de salida en la parte superior que se conecta al contenedor de agua, posee una altura de 300 mm, diámetro de 310 mm.

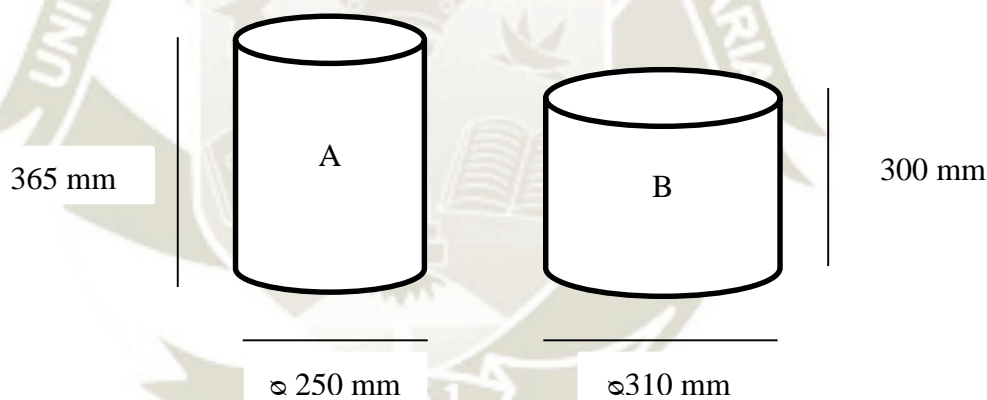


Figura 24. Diseño 2D de *vessel* y chaqueta

En la fig. 24 se muestra la vista lateral del diseño 2D del *vessel* y chaqueta, la sección A: *vessel* se aprecia una altura de 365 mm y un diámetro de 250 mm y en la sección B: chaqueta se aprecia una altura de 300 mm y un diámetro 310 mm.

Headplate

El diseño del *headplate* posee 3 puertos conformados por tubería de ½ pulgada de diámetro y 50 mm de alto, estos dispuestos para diferentes funciones como inoculación, recirculación de influente y salida de gas; cuenta además con 1 ventana y 1 luz LED que permite la visualización del buen funcionamiento del aspersor, tiene un diámetro de 310 mm.

Se consideró una fuente de luz en el sistema para la iluminación interna y así asegurar que el aspersor no presente obstrucciones y sistema de aspersión funcione adecuadamente, este posee un interruptor para encendido y apagado, el uso de iluminación LED como se conoce tiene consumos energéticos muy bajos y es una opción mucho más eficaz y económica que otras.

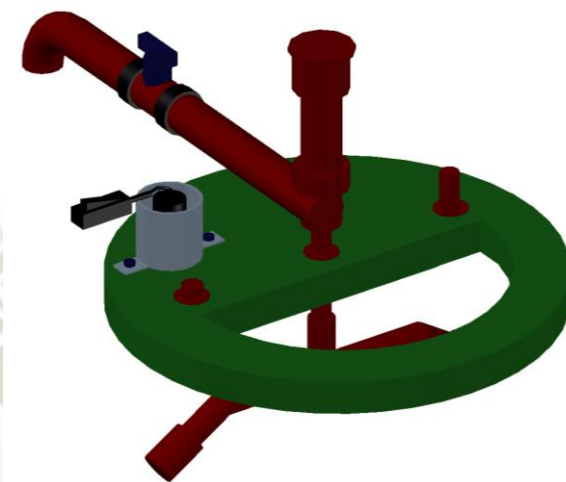


Figura 25. Plano 3D del *headplate*, vista superior

La Fig. 25 muestra la vista superior del diseño 3D del *headplate*. En esta se aprecia a detalle la disposición de los puertos en el que destaca el puerto central del ingreso del influente que como se muestra posee una válvula antes del ingreso, la fuente de luz LED con interruptor y la ventana que permite a visualización del interior



Figura 26. Plano 3D del *headplate*, vista inferior

La Fig. 26 de la vista inferior del diseño 3D del *headplate* muestra la distribución de los puertos y el aspersor que está conectado al puerto central del ingreso del influente para la recirculación. El aspersor está conformado por una tubería de PVC de $\frac{1}{2}$ pulgada de 200 mm

de largo con orificios de 5 mm de diámetro dispuestos entre sí a una distancia de 20 mm entre cada uno, este además presenta en los extremos una inclinación de 45 grados para asegurar la salida del influente por todos los orificios.

Configuración final

La configuración final del reactor DAS se observa en la Fig. 27 que muestra una vista frontal del diseño 2D del reactor.

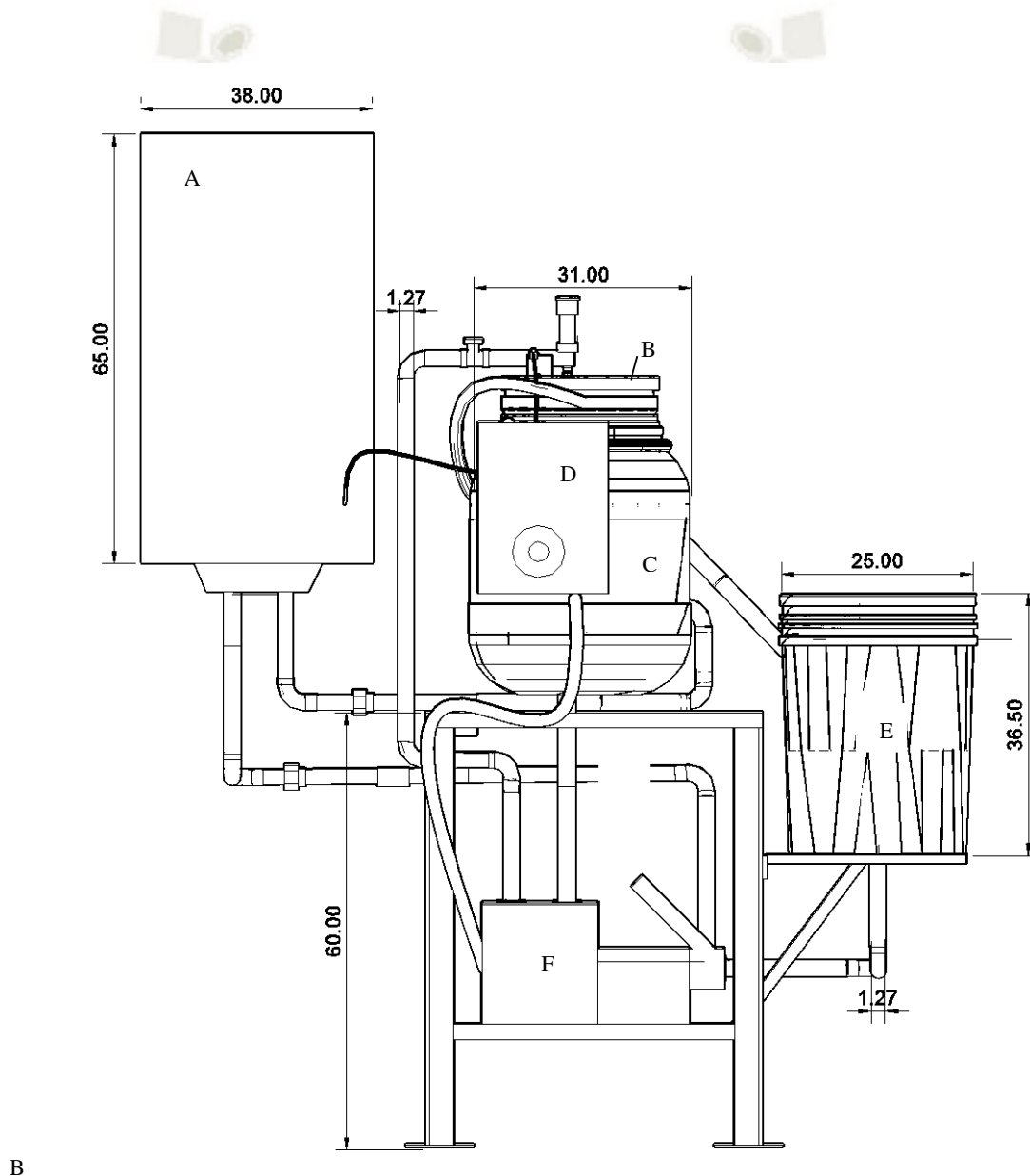


Figura 27. Diseño 2D del reactor DAS, vista frontal

La Fig. 27 presenta el esquema final de configuración del reactor DAS es este se aprecian 6 secciones relacionadas entre sí. Sección A: tanque de 36 cm de ancho y 65 cm de alto con conexiones a la bomba de agua y a la chaqueta del *vessel*; sección B: *vessel* conectado al

sistema de aspersión y una salida hacia el sistema de acumulación de biol; sección C: chaqueta del *vessel* de 31 cm de diámetro que muestra una conexión de ingreso en la parte inferior procedente de la terma y una salida en la parte superior conectada al contenedor de agua; sección D: panel de control de temperatura automatizado que activa la bomba que ingresa agua a la terma y succiona agua del contenedor de agua; sección E: contenedor de agua, de 25 cm de diámetro y 36.5 cm de alto este presenta una conexión de ingreso procedente de la chaqueta y una conexión de salida conectada a una bomba; sección F: contenedor de biol, presenta una entrada que conecta la salida del *vessel* al contenedor del biol y una salida activada por sensores de nivel que se conectan a las tuberías que llevan el influente. Todas las conexiones mostradas son de tuberías de PVC de 1/2 pulgada.

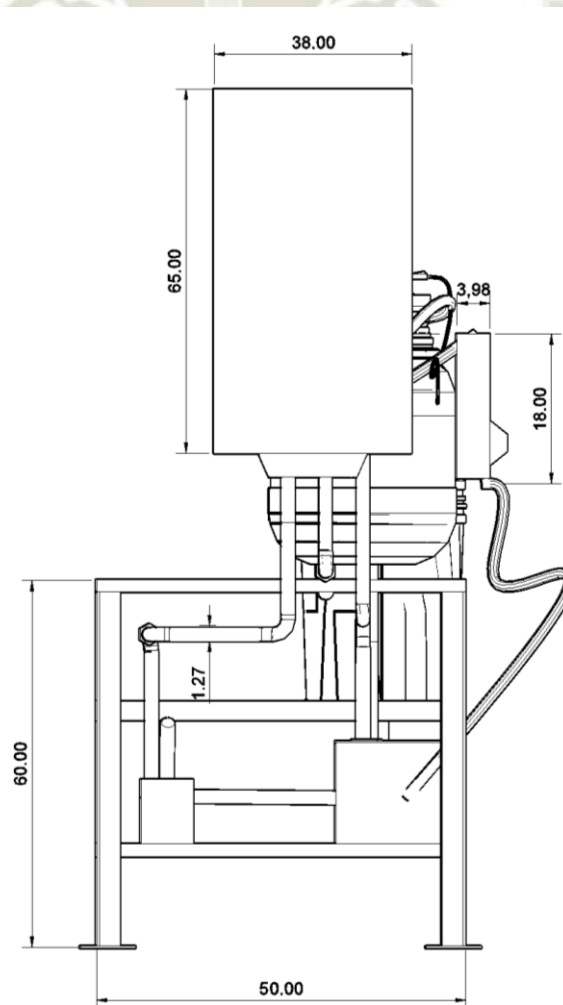


Figura 28. Diseño 2D del reactor DAS, vista lateral

La vista lateral mostrada en la Fig. 28 del diseño 2D de reactor permite distinguir mejor las conexiones y muestra las medidas del panel de control, 180 mm de alto y 39.6 mm de ancho así como la altura de 60 cm y 50 cm de ancho del soporte del *vessel* y chaqueta.

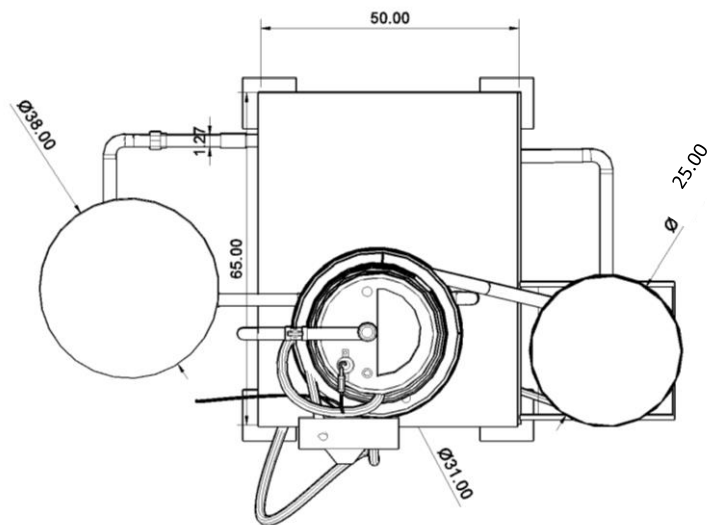


Figura 29. Diseño 2D del reactor DAS, vista superior

En la Fig. 29 se aprecia la vista superior de del diseño 2D de reactor permite distinguir mejor los diámetros; terma 38 cm de diámetro, chaqueta 31 cm de diámetro y contenedor de agua 25 cm de diámetro.

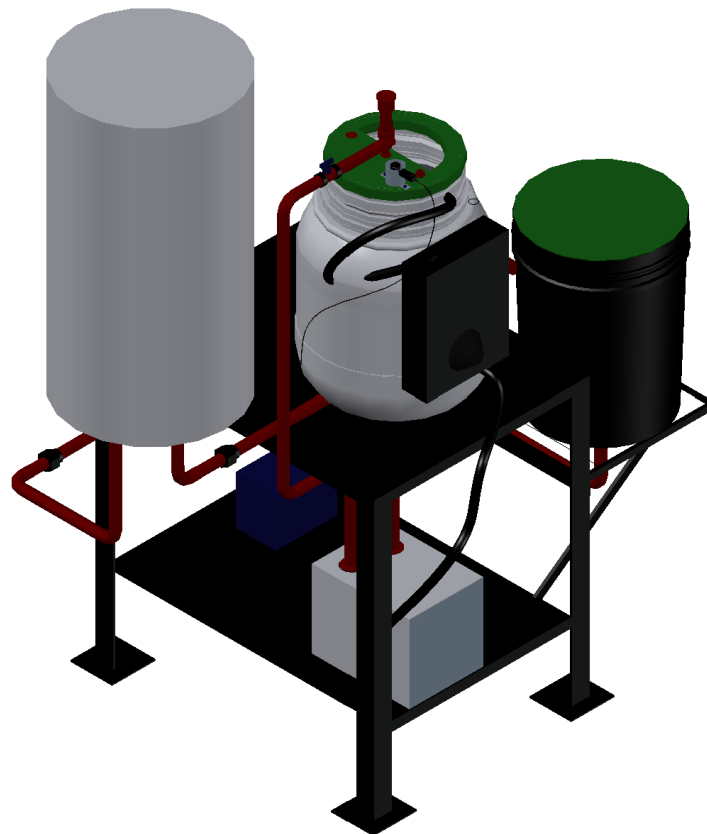


Figura 30. Configuración final en 3D del reactor DAS, vista isométrica frontal

La Fig. 30 muestra la configuración final en 3D del reactor DAS, en esta se pueden apreciar los elementos mas importantes asi como los accesorios y conexiones del sistema. Se distingue claramente de izquierda a derecha en la parte superior la terna de color blanco; el *vessel* enchaquetado con el panel de control al frente y finalmente el contenedor de agua de color negro. En la parte inferior al frente se aprecia el conenedor de biol de color blanco y detrás de este se aprecia la bomba centrífuga de color azul.

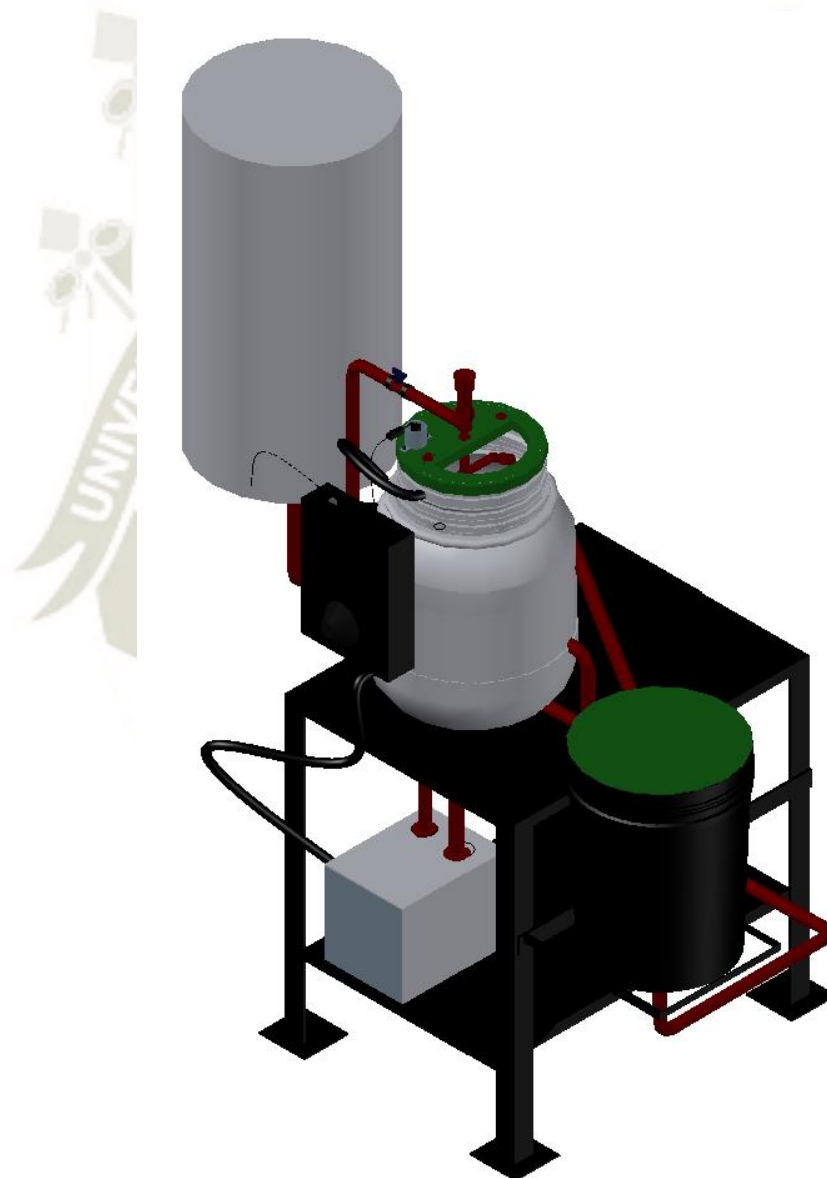


Figura 31. Configuración 3D del reactor DAS, vista isométrica lateral

La configuración 3D del reactor DAS, vista isométrica lateral Fig 31 muestra con mayor claridad la conexión entre la chaqueta y el panel de control de temperatura automatizado,

que permite controlar directamente la temperatura del agua del enchaquetado y accionar el sistema para temperar el agua si la temperatura de esta no es la adecuada.

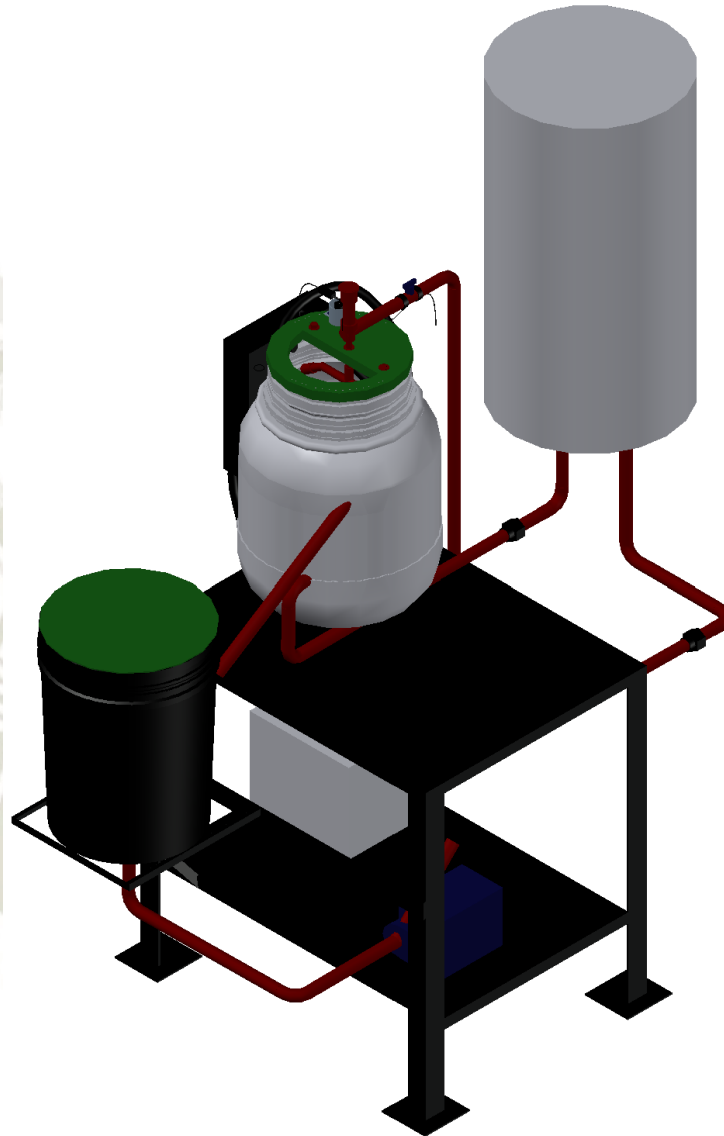


Figura 32. Configuración 3D del reactor DAS, vista isométrica posterior

La vista isométrica posterior mostrada en la Fig 32 muestra con mayor claridad las conexiones entre: la chaqueta y el contenedor de agua y la conexión de la terma con la parte inferior de la chaqueta; se aprecia también la conexión de salida en la parte inferior del contenedor de agua que se conecta a la bomba centrífuga

3.3.1 Construcción:

El reactor DAS se construyó de acuerdo a la data recabada anteriormente y teniendo en cuenta la relación costo-inversión- beneficio. Como se muestra en la Fig. 33.



Figura 33. Reactor construido en planta Inca Tops S.A.

Como se puede ver en el panel fotográfico del Anexo 13

El sistema de recirculación de influente cuenta con un sistema de aspersión, que trabaja con sensores de nivel que activa la bomba a una determinada altura, el depósito cuenta con un heat plate con puertos de inoculo, aspersión, salida de gas y puerto adicional, tiene también con una rejilla de 0.5 mm de diámetro y en la parte exterior del depósito se encuentra la chaqueta, que tiene un panel de control de temperatura, que mantiene la temperatura mediante la recirculación de agua caliente, que trabaja con una bomba de agua conectada a una terma controlada por un panel.

3.4 Evaluación de la degradación de la biomasa en el reactor de digestión anaeróbica seca

3.4.1 Análisis de biomasa y puesta en marcha del reactor

Es importante el análisis de los parámetros para el diseño y funcionamiento del reactor, se realizó el análisis de la biomasa inicial y final mostrada en las tablas 15 y 16 respectivamente

Tabla 15. Resultados del análisis inicial de la biomasa

Análisis	Resultado
Solidos Totales (%)	37,91
Solidos Volátiles (%)	19,64
pH (unidades pH)	7,35
Humedad (%)	62,09
DQO (mg/Kg)	2080.19

Tabla 16. Resultados del análisis final de la biomasa

Análisis	Resultado
Solidos Totales (%)	28.82%,
Solidos Volátiles (%)	15.71%,
pH (unidades pH)	7,15
Humedad (%)	62,09
DQO (mg/Kg)	1414.63

La evaluación del digestor anaerobio seco se realizó comparando la biomasa inicial y final, después de trabajar durante 60 días, dando como resultado una disminución en el porcentaje de S.T. de 37.91% a 28.82%, lo que evidencia la degradación ya que parámetro de solidos totales es proporcional a la cantidad de materia orgánica degradable, los S.V. de 19.64% a 15.71%, y DQO de 2080.19 mg/Kg a 1414.63mg/ Kg estos parámetros son proporcionales a la materia orgánica que puede ser convertida en biogás por lo que la variación decreciente es un indicativo de la degradación y el pH de 7.35 a 7.15 este rango de pH favorece el desarrollo de cepas metanogénicas.

Los Solidos totales son un factor importante a tener en cuenta ya que el incremento en la concentración de este puede limitar o inhibir la degradación al permitir o no una completa movilidad del pool fúngico dentro del sustrato, sin embargo favorece el desarrollo de biopelícula sobre el sustrato que según lo reportado por Di María⁴⁹ favorecería la degradación y por ende la producción de gas La digestión para ser considerada seca debe tener solidos totales mayores al 15 % pero no por encima del 30 % ya que por encima de este valor se ha registrado un umbral critico en el que el rendimiento se reduce significativamente. La biomasa inicial presenta una concentración de solidos totales de 37.91% es por esto que se determina trabajar con una cantidad de solidos totales del 20% que permita el buen funcionamiento del sistema, este porcentaje se obtiene mediante la humectación de la biomasa con el agua residual en una proporción de 1 a 2.

Ph; los valores de ph se deben mantener entre 7 y 8,5 para un buen funcionamiento del sistema, ya que si esta por debajo o por encima del rango este puede afectar o inhibir el proceso degradativo en el reactor. El análisis de la biomasa presenta un pH de 7.35 lo que favorece a los microorganismos metanogénicos que son sensibles al cambio de pH



CONCLUSIONES

1. Se lograron aislar 15 cepas de residuos sólidos industriales de la empresa textil INCA TOPS S.A y 8 cepas del rumen de vaca.
2. Se seleccionaron y caracterizaron molecularmente 5 cepas con capacidad queratinolítica para la degradación de residuos solidos textiles, dando como resultado que la cepa P-X es una nueva especie de *Aspergillus sp*, la cepa P-1 es *Fusarium oxisporum*, P-2 es *Aspergillus sp*. la cepa MB-4 es *Fusarium oxisporum*, y la cepa MC-1 es una nueva especie de *Fusarium sp*.
3. Se configuro y construyó un reactor de 20 litros de capacidad, y 11 L de capacidad efectiva de digestión anaeróbica seca DAS experimental con sistema *bach* de una etapa con recirculación de influente, relación del influente y biomasa de 2:1 y temperatura mesófito.
4. La evaluación de la degradación del reactor anaerobio seco se realizó comparando la biomasa inicial y final, después de trabajar durante 60 días, dando como resultado una disminución en el porcentaje de S.T. de 37.91 % a 28.82 %, S.V. de 19.64 % a 15.71 %, DQO de 2080.19 mg/Kg a 1414.63 mg/Kg la disminución de estos valores evidencia la degradación de la biomasa, ya que la degradación y biomasa son directamente proporcionales, además el pH de 7.35 a 7.15 garantiza el desarrollo de los microorganismos y el buen funcionamiento de los reactores.

RECOMENDACIONES

Investigar y probar diferentes pre tratamientos al sustrato para que la digestión se realice de mejor manera.

Probar posibles potenciadores de esta manera mejorar el tiempo de la degradación del sustrato.

Modificar el diseño del reactor buscando una mayor superficie de contacto entre el inoculo y el sustrato y así mejorar la degradación



BIBLIOGRAFIA

1. As B, Nn D. Upflow anaerobic sludge blanket reactor--a review. 2001;2.
2. Liew LN, Shi J, Li Y. Enhancing the solid-state anaerobic digestion of fallen leaves through simultaneous alkaline treatment. *Bioresour Technol.* 1 de octubre de 2011;102(19):8828-34.
3. Bolzonella D, Innocenti L, Pavan P, Traverso P, Cecchi F. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: focusing on the start-up phase. *Bioresour Technol.* 1 de enero de 2003;86(2):123-9.
4. Lorenzo Acosta, Y, Obaya Abreu, MC. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [Internet]. 2005;XXXIX(1):35-48.
5. Varley J, Birch J. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology.* 1 de marzo de 1999;29(3):177.
6. Veeken A, Hamelers B. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresour Technol.* 1 de septiembre de 1999;69(3):249-54.
7. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production - ScienceDirect [Internet]. [citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114003633>
8. Shah FA, Mahmood Q, Rashid N, Pervez A, Raja IA, Shah MM. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renew Sustain Energy Rev.* 1 de febrero de 2015;42:627-42.
9. Zhang C, Su H, Baeyens J, Tan T. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renew Sustain Energy Rev.* 1 de octubre de 2014;38:383-92.
10. Romano RT, Zhang R, Teter S, McGarvey JA. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of JoseTall Wheat Grass. *Bioresour Technol.* 1 de octubre de 2009;100(20):4564-71.
11. Luostarinen S. Anaerobic on-site wastewater treatment at low temperatures. *Jyvask Stud Biol Environ Sci* [Internet]. 2005 [citado 22 de noviembre de 2018];(158). Disponible en: <https://jyx.jyu.fi/handle/123456789/13169>
12. IJMS | Free Full-Text | Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review | HTML [Internet]. [citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/htm>

13. Tippayawong N, Thanompongchart P. Biogas quality upgrade by simultaneous removal of CO₂ and H₂S in a packed column reactor. *Energy*. 1 de diciembre de 2010;35(12):4531-5.
14. Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour Technol*. 1 de noviembre de 2008;99(17):7928-40.
15. El-Mashad HM, Zhang R. Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresour Technol*. 1 de junio de 2010;101(11):4021-8.
16. Plastic biodigesters – a systematic study - ScienceDirect [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0973082608604986>
17. Development and application of prefabricated biogas digesters in developing countries - ScienceDirect [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114001968>
18. The introduction of low-cost polyethylene tube biodigesters on small scale farms in Vietnam [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/frg/FEEDback/lrrd/lrrd9/2/an92.htm>
19. Kothari R, Pandey AK, Kumar S, Tyagi VV, Tyagi SK. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renew Sustain Energy Rev*. 1 de noviembre de 2014;39:174-95.
20. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants | SpringerLink [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-004-2502-3>
21. Kreith, Frank. Manual de gestión de residuos sólidos [Internet]. 1999 [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=027586>
22. Weitz KA, Thorneloe SA, Nishtala SR, Yarkosky S, Zannes M. The Impact of Municipal Solid Waste Management on Greenhouse Gas Emissions in the United States. *J Air Waste Manag Assoc*. 1 de septiembre de 2002;52(9):1000-11.
23. Frank Kreith. Handbook of solid waste management [Internet]. 1999 [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=027586>

24. Mor S, Ravindra K, De Visscher A, Dahiya RP, Chandra A. Municipal solid waste characterization and its assessment for potential methane generation: A case study. *Sci Total Environ*. 1 de diciembre de 2006;371(1):1-10.
25. Mata-Alvarez J, Macé S, Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour Technol*. 1 de agosto de 2000;74(1):3-16.
26. Rahhali A. Valorización de residuos queratínicos para la obtención de materiales biocompuestos. TDX Tesis Dr En Xarxa [Internet]. 17 de julio de 2015 [citado 23 de noviembre de 2018]; Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/95771>
27. Riffel A, Lucas F, Heeb P, Brandelli A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch Microbiol*. 1 de abril de 2003;179(4):258-65.
28. Suh HJ, Lee HK. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J Protein Chem*. 1 de febrero de 2001;20(2):165-9.
29. Daroit DJ, Corrêa APF, Brandelli A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Int Biodeterior Biodegrad*. 1 de abril de 2009;63(3):358-63.
30. Patinvoh RJ, Osadolor OA, Chandolias K, Sárvári Horváth I, Taherzadeh MJ. Innovative pretreatment strategies for biogas production. *Bioresour Technol*. 1 de enero de 2017;224:13-24.
31. Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 1 de junio de 2004;3(2):117-29.
32. Holm-Nielsen JB, Al Seadi T, Oleskowicz-Popiel P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour Technol*. 1 de noviembre de 2009;100(22):5478-84.
33. Demirbaş A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Convers Manag*. 1 de julio de 2001;42(11):1357-78.
34. Zhang Y-HP. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1 de mayo de 2008;35(5):367-75.
35. Himmel ME, Picataggio SK. Our challenge is to acquire deeper understanding of biomass recalcitrance and conversion. *Biomass Recalcitrance Deconstructing Plant Cell Wall Bioenergy*. 2009;1-6.
36. Taherzadeh MJ, Jeihanipour A. Recalcitrance of Lignocellulosic Biomass to Anaerobic Digestion. En: *Biogas Production* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012

- [citado 23 de noviembre de 2018]. p. 27-54. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118404089.ch2>
37. Pires A, Martinho G, Chang N-B. Solid waste management in European countries: A review of systems analysis techniques. *J Environ Manage.* 1 de abril de 2011;92(4):1033-50.
 38. Holtzaple MT, Lundeen JE, Sturgis R, Lewis JE, Dale BE. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotechnol.* 1 de marzo de 1992;34(1):5.
 39. Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol.* 1 de julio de 2008;99(10):4044-64.
 40. Wikandari R, Gudipudi S, Pandiyan I, Millati R, Taherzadeh MJ. Inhibitory effects of fruit flavors on methane production during anaerobic digestion. *Bioresour Technol.* 1 de octubre de 2013;145:188-92.
 41. Li Y, Park SY, Zhu J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew Sustain Energy Rev.* 1 de enero de 2011;15(1):821-6.
 42. Yi J, Dong B, Jin J, Dai X. Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *PLOS ONE.* 22 de julio de 2014;9(7):e102548.
 43. Kevin Watkins. Human Development Report 2006 - Beyond Scarcity: Power, Poverty and the Global Water Crisis by Kevin Watkins :: SSRN [Internet]. 2013 [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2294691
 44. Karthikeyan OP, Visvanathan C. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 1 de septiembre de 2013;12(3):257-84.
 45. Kalra r. Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes. :56.
 46. Motte J-C, Trably E, Escudié R, Hamelin J, Steyer J-P, Bernet N, et al. Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnol Biofuels.* 22 de noviembre de 2013;6(1):164.
 47. Yi J, Dong B, Jin J, Dai X. Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *PLOS ONE.* 22 de julio de 2014;9(7):e102548.

48. Li A, Chu Y, Wang X, Ren L, Yu J, Liu X, et al. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnol Biofuels*. 15 de enero de 2013;6(1):3.
49. Di Maria F, Barratta M, Bianconi F, Placidi P, Passeri D. Solid anaerobic digestion batch with liquid digestate recirculation and wet anaerobic digestion of organic waste: Comparison of system performances and identification of microbial guilds. *Waste Manag*. 1 de enero de 2017;59:172-80.
50. Vandevivere P, De Baere L, Verstraete W. Types of anaerobic digester for solid wastes. En: *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes* [Internet]. IWA Publishing; 2003 [citado 23 de noviembre de 2018]. p. 111-40. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1854/LU-210258>
51. Pantaleo A, Gennaro BD, Shah N. Assessment of optimal size of anaerobic co-digestion plants: An application to cattle farms in the province of Bari (Italy). *Renew Sustain Energy Rev*. 1 de abril de 2013;20:57-70.
52. McHugh S, Carton M, Collins G, O'Flaherty V. Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16–37 °C. *FEMS Microbiol Ecol*. 1 de junio de 2004;48(3):369-78.
53. Bohacz J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J Microbiol Biotechnol*. 24 de noviembre de 2016;33(1):13.
54. Appels L, Baeyens J, Degrève J, Dewil R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog Energy Combust Sci*. 1 de diciembre de 2008;34(6):755-81.
55. Nielfa A, Cano R, Fdz-Polanco M. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnol Rep*. 1 de marzo de 2015;5:14-21.
56. Ternouth JH. The Rumen and Its Microbes. *Aust Vet J*. 1 de febrero de 1968;44(2):47-47.
57. Webb J, Theodorou MK. A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus. *Biosystems*. 1 de enero de 1988;21(3):393-401.
58. Obispo n. Los hongos anaeróbicos del rumen. :13.
59. Bauchop t. The rumen anaerobic fungi : colonizers of plant fibre. *Ann rech vét*. 1979;10(2-3):246-8.

60. Bauchop T. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agric Environ.* 1 de noviembre de 1981;6(2):339-48.
61. Demeyer DI. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric Environ.* 1 de noviembre de 1981;6(2):295-337.
62. Barichievich EM, Calza RE. Media carbon induction of extracellular cellulase activities in *Neocallimastix frontalis* isolate EB188. *Curr Microbiol.* 1 de abril de 1990;20(4):265-71.
63. Mazotto AM, Couri S, Damaso MCT, Vermelho AB. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1 de noviembre de 2013;85:189-95.
64. Williams AG, Orpin CG. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can J Microbiol.* 1 de mayo de 1987;33(5):418-26.
65. Martin C, Michalet-Doreau B, Fonty G, Williams A. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid- and particle-associated ruminal microbial populations. *Curr Microbiol.* 1 de octubre de 1993;27(4):223-8.
66. Williams AG, Withers SE, Strachan NH. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. *J Appl Bacteriol.* 1 de enero de 1989;66(1):15-26.
67. Akin DE, Gordon GL, Hogan JP. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl Env Microbiol.* 1 de septiembre de 1983;46(3):738-48.
68. Orpin CG, Joblin KN. The rumen anaerobic fungi. En: Hobson PN, Stewart CS, editores. *The Rumen Microbial Ecosystem* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1997 [citado 23 de noviembre de 2018]. p. 140-95. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_4
69. Barr DJS. The phylogenetic and taxonomic implications of flagellar rootlet morphology among zoosporic fungi. *Biosystems.* 1 de enero de 1981;14(3):359-70.
70. Munn EA, Orpin CG, Greenwood CA. The ultrastructure and possible relationships of four obligate anaerobic chytridiomycete fungi from the rumen of sheep. *Biosystems.* 1 de enero de 1988;22(1):67-81.
71. Galindo J, Díaz A, González N, Sosa A, Marrero Y, Aldana AI, et al. Efecto de un hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la población

- microbiana ruminal con sustrato de Pennisetum purpureum, vc. Cuba CT- 115 en condiciones in vitro. Rev Cuba Cienc Agríc [Internet]. 2010 [citado 23 de noviembre de 2018];44(3). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=193015664011>
72. Barr DJS. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. Can J Bot. 15 de noviembre de 1980;58(22):2380-94.
 73. Munn EA, Greenwood CA, Orpin CG. Organization of the kinetosomes and associated structures of zoospores of the rumen chytridiomycete Neocallimastix patriciarum. Can J Bot. 1 de marzo de 1987;65(3):456-65.
 74. Breton A, Bernalier A, Bonnemoy F, Fonty G, Gaillard B, Gouet P. Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: Neocallimastix joyonii. FEMS Microbiol Lett. 1 de abril de 1989;58(2-3):309-14.
 75. Trinci APJ, Davies DR, Gull K, Lawrence MI, Bonde Nielsen B, Rickers A, et al. Anaerobic fungi in herbivorous animals. Mycol Res. 1 de febrero de 1994;98(2):129-52.
 76. ORPIN CG. Studies on the Rumen Flagellate Sphaeromonas communis. Microbiology. 1976;94(2):270-80.
 77. LIEBETANZ E. Die parasitischen Protozoen des Wiederkauermagens. Berl Tieraerztl Wochenschi. 1905;18:313-4.
 78. Eugênia CB-MC, Jorge HC-GR, Sarrouh BF, Silvério da SS. Production of Cellulolytic Enzymes by Anaerobic Fungi Cultivated in Different Conditions. Int J Food Eng [Internet]. 2009 [citado 23 de noviembre de 2018];5(3). Disponible en: <https://www.degruyter.com/view/j/ijfe.2009.5.3/ijfe.2009.5.3.1608/ijfe.2009.5.3.1608.xml>
 79. Joblin KN, Campbell GP, Richardson AJ, Stewart CS. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in co-culture with methanogens. Lett Appl Microbiol. 1 de noviembre de 1989;9(5):195-7.
 80. Mao C, Feng Y, Wang X, Ren G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renew Sustain Energy Rev. 1 de mayo de 2015;45:540-55.
 81. Milne A, Theodorou MK, Jordan MGC, King-Spooner C, Trinci APJ. Survival of anaerobic fungi in feces, in saliva, and in pure culture. Exp Mycol. 1 de marzo de 1989;13(1):27-37.
 82. Rippon JA. The Chemical and Physical Basis for Wool Dyeing. En: The Coloration of Wool and other Keratin Fibres [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [citado 23

- de noviembre de 2018]. p. 43-74. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118625118.ch2>
83. Hopps HC. The biologic bases for using hair and nail for analyses of trace elements. *Sci Total Environ*. 1 de enero de 1977;7(1):71-89.
 84. Fraser RD, MacRae TP, Parry DA, Suzuki E. Intermediate filaments in alpha-keratins. *Proc Natl Acad Sci*. 1 de marzo de 1986;83(5):1179-83.
 85. Lewis DM, Rippon JA. *The Coloration of Wool and Other Keratin Fibres*. John Wiley & Sons; 2013. 471 p.
 86. Leeder JD, Rippon JA. Changes Induced in the Properties of Wool by Specific Epicuticle Modification. *J Soc Dye Colour*. 1 de enero de 1985;101(1):11-6.
 87. Watt IC. Sorption of Water Vapor by Keratin. *J Macromol Sci Part C*. 1 de enero de 1980;18(2):169-245.
 88. Kreplak L, Doucet J, Dumas P, Briki F. New Aspects of the α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched Hard α -Keratin Fibers. *Biophys J*. 1 de julio de 2004;87(1):640-7.
 89. Cheng S, Li Z, Mang H-P, Huba E-M, Gao R, Wang X. Development and application of prefabricated biogas digesters in developing countries. *Renew Sustain Energy Rev*. 1 de junio de 2014;34:387-400.
 90. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*. 4 de enero de 2006;70(1):21.
 91. Brandelli A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food Bioprocess Technol*. 1 de junio de 2008;1(2):105-16.
 92. Verma A, Singh H, Anwar S, Chattopadhyay A, Tiwari KK, Kaur S, et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Crit Rev Biotechnol*. 19 de mayo de 2017;37(4):476-91.
 93. liu B, Zhang J, Li B, Liao X, Du G, Chen J. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World J Microbiol Biotechnol*. 1 de mayo de 2013;29(5):825-32.
 94. El-Gendy MMA. Keratinase Production by Endophytic *Penicillium* spp. Morsyl Under Solid-State Fermentation Using Rice Straw. *Appl Biochem Biotechnol*. 1 de octubre de 2010;162(3):780-94.
 95. Sowjanya NC, Chary CM. Degradation of few avean feathers by *Microsporium gypseum*. *J Phytol [Internet]*. 30 de noviembre de 2012 [citado 23 de noviembre de

- 2018]; Disponible en:
<http://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2784>
96. Cao L, Tan H, Liu Y, Xue X, Zhou S. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Lett Appl Microbiol.* 1 de marzo de 2008;46(3):389-94.
 97. Błyskal B. Fungi utilizing keratinous substrates. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1 de septiembre de 2009;63(6):631-53.
 98. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 1 de enero de 2011;7(1):539.
 99. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, et al. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 2010;38(suppl_2):W695-9.
 100. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 2013;41(W1):W597-600.
 101. Méndez CR, Vergaray G, Béjar VR, Cárdenas KJ. Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Rev Peru Biol.* julio de 2007;13(3):203-6.
 102. Fernández, N V C. Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum*. Vol. 18. *Bol. San. Veg. Plagas*; 1992. p. 693-698.
 103. Rodríguez-Sandoval, E M Katherine. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro.* Vol. 23. 2011. p. 19-26.
 104. Olajuyigbe FM, Nlekerem CM, Ogunyewo OA. Production and Characterization of Highly Thermostable β -Glucosidase during the Biodegradation of Methyl Cellulose by *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry Research International* [Internet]. 2016 [citado 30 de noviembre de 2018]; Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2016/3978124/>
 105. Olajuyigbe FM, Nlekerem CM, Ogunyewo OA. Production and Characterization of Highly Thermostable β -Glucosidase during the Biodegradation of Methyl Cellulose by *Fusarium oxysporum* [Internet]. *Biochemistry Research International*. 2016 [citado 28 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2016/3978124/abs/>

106. Brun S, Bouchara J, Bocquel A, Basile A, Contet-Audonneau N, Chabasse D. Evaluation of Five Commercial Sabouraud Gentamicin-Chloramphenicol Agar Media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 de octubre de 2001;20(10):718-23.
107. Urcia A F, Guevara R M. Eficacia de Medios de Cultivo con Infusiones de Variedades de Papa en la Identificación del *Trichophyton rubrum*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. octubre de 2002;19(4):206-8.
108. Juan Leon C alejandro fuhusaki. *Manual de Laboratoriode Química*. Peru; 2013.
109. Meyer H. The ninhydrin reaction and its analytical applications. *Biochem J*. octubre de 1957;67(2):333-40.



ANEXOS

Anexo 1. Plano de ubicación de la planta IV de la empresa de Inca Tops S.A



Anexo 2. Agar Sabouraud

Fundamento

En el medio de cultivo, la peptona, la tripteína y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es el agente solidificante⁹⁷.

Composición

Peptona	5.0 g
Tripteína	5.0 g
Glucosa	40.0 g
Cloranfenicol	0.05 g
Agar	15.0 g

Preparación

Suspender 65 g del polvo en 1 litro de agua destilada, agitar, calentar hasta ebullición y dejar hervir por al menos 1 minuto. Esterilizar el medio en el autoclave a 121 °C, 1.5 atm por 15 minutos. Distribuir en placas estériles.

Anexo 3. Caldo papa dextrosa

Fundamento

En el medio de cultivo, el almidón de la papa proporciona los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. La presencia de cloranfenicol, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras.

Composición

Papa	200.0 g
Sacarosa	20.0 g
Sulfato de amonio	1 g
Cloranfenicol	0.4 g

Preparación

Se pelan y cortan las papara en trozos y se colocan en una olla con agua dejandolos cocinar luego se cuela y se recolecta en un matraz, se le agrega la sacarosa, sulfato de amonio y el cloranfenicol, finalmente se distribuye en frascos y se esteriliza el medio en el autoclave a 121 °C, 1.5 atm por 15 minutos.

Anexo 4. Prueba de la ninhidrina

Fundamento: Todas aquellas sustancias que presentan al menos un grupo amino y uno carboxilo libre, reaccionaran con la ninhidrina. La positividad se manifiesta por la aparición de un color violáceo o amarillo. Debido a que las proteínas y los aminoácidos, poseen esta característica, la reacción sirve para identificarlos. Algunas soluciones de amonio y aminos, dan la coloración característica, aparentemente debido a una oxidación y reducción intermolecular de la ninhidrina en presencia de amoníaco. Los aminoácidos porina e hidroxiprolina, que no poseen grupo amino sino imino (-NH-), dan un color rojo que pasa rápidamente a amarillo¹⁰⁸.

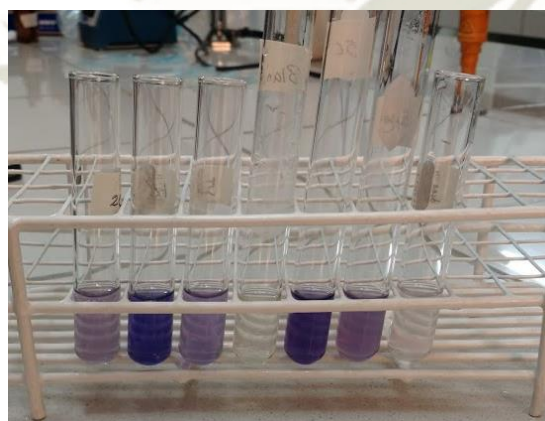
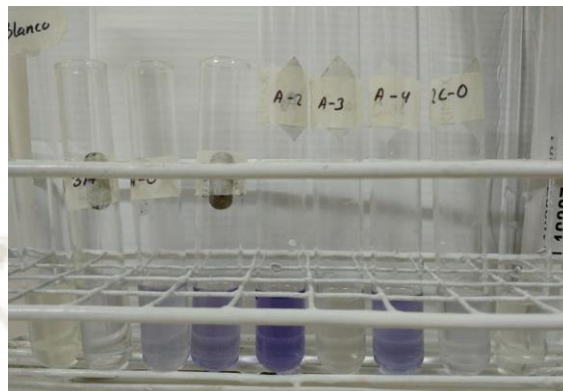
Metodología

Para el montaje de la prueba. Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio salino basal; Cloruro de amonio 0.25 g/L; cloruro de sodio 0.5 g/L, fosfato monobásico de potasio 0,3g/L; cloruro de magnesio hexahidratado 0.1 g/L; extracto de levadura. 0.1 g/L ; y fue suplementado con lana de oveja y fibra de alpaca, y se mantuvieron en incubación a 32°C con agitación orbital, por 48 h a 30 rpm. La selección de grupos amino libres (GAL) presentes en el medio de fermentación mediante el método colorimétrico de ninhidrina.¹⁰⁹

Para la determinación de aminos grupo libre, se filtró el contenido del matraz a través de filtros Whatman N° 5 utilizando bomba de vacío. Posteriormente, se agregó 3mL de muestra en tubos de ensaye y 0.5 mL de ninhidrina (1.0 %). La mezcla se dejó en baño maría durante 10 min. Y se enfrió en baño de agua con hielo durante 5 min. Al terminar se tomó lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. de longitud de fermentación. Fueron seleccionados para la etapa de purificación, las cepas con mayores títulos de GAL presentes en el medio de fermentación.

Después del proceso de purificación se realizó una segunda prueba bajo las mismas condiciones (incubación a 32°C por 48 h a 300 rpm), para seleccionar las 2 cepas con mayores títulos de degradación de queratina.

Anexo 5. Panel fotográfico de prueba de ninhidrina para selección de cepas con capacidad de degradación



Anexo 6. Secuencia de cepas con capacidad de degradación

Secuencia de la cepa P-X:

ATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTA
CCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCC
CGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCT
GAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCC
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAAT
TCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGG
GTCGTCGTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGCAGCGCACCG
CGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCTGTAGGCCCGGCCG
GCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACTTAA

Secuencia de la cepa P-1:

ATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTCCTCGG
CGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAA
CTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAA
GCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCG
GTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGT
CGCGGCCACGCCGTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GAATACCCGCTGAACTT

Secuencia de la cepa P-2:

TTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTAC
CTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCC
GGGCCC CGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTG
AGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATT
CCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGT

CGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCG
TCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGC
GCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCCGCTGAACTTA

Secuencia de la cepa MB-4:

CGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACT
TGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG
GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATC
AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTT
AACCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAA
TTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCTCGTTACT
GGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG
ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA

Secuencia de la cepa MC-1:

CGGAGGGATATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATAACCACTT
GTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG
GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATC
AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTT
AACCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAA
TTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCTCGTTACT
GGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG
ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

Anexo 7. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: MC-1

Nº de muestra	Día	Hora	Tiempo(h)	Peso vacío	Peso lleno	Masa g/mL
1	05/03/2018	08:00 a.m.	0	0,8397	0,8398	0,0001
2	05/03/2018	08:00 p.m.	12	0,7931	0,7934	0,0003
3	06/03/2018	08:00 a.m.	24	0,8035	0,8039	0,0004
4	06/03/2018	08:00 p.m.	36	0,8285	0,829	0,0005
5	07/03/2018	08:00 a.m.	48	0,8003	0,8012	0,0009
6	07/03/2018	08:00 p.m.	60	0,8231	0,8248	0,0017
7	08/03/2018	08:00 a.m.	72	0,8132	0,8154	0,0022
8	08/03/2018	08:00 p.m.	84	0,8042	0,8073	0,0031
9	09/03/2018	08:00 a.m.	96	0,8028	0,8062	0,0034
10	09/03/2018	08:00 p.m.	108	0,8175	0,8208	0,0033
11	10/03/2018	08:00 a.m.	120	0,8089	0,8125	0,0036
12	10/03/2018	08:00 p.m.	132	0,8063	0,8106	0,0043
13	12/03/2018	08:00 a.m.	168	0,7909	0,7958	0,0049
14	12/03/2018	08:00 p.m.	180	0,7966	0,8034	0,0068
15	13/03/2018	08:00 a.m.	192	0,8235	0,8308	0,0073
16	13/03/2018	08:00 p.m.	204	0,8335	0,8416	0,0081
17	14/03/2018	08:00 a.m.	216	0,8139	0,8236	0,0097
18	14/03/2018	08:00 p.m.	228	0,8334	0,8437	0,0103
19	15/03/2018	08:00 a.m.	240	0,8494	0,861	0,0116
20	15/03/2018	08:00 p.m.	252	0,8017	0,8137	0,012
21	16/03/2018	08:00 a.m.	264	0,8231	0,8357	0,0126
22	16/13/2018	08:00 p.m.	276	0,8151	0,8282	0,0131
23	17/03/2018	08:00 a.m.	288	0,9033	0,9179	0,0146
24	17/03/2018	08:00 p.m.	300	0,8296	0,847	0,0174
25	19/03/2018	08:00 a.m.	336	0,8852	0,9047	0,0195
26	19/03/2018	08:00 p.m.	348	0,8441	0,864	0,0199
27	20/03/2018	08:00 a.m.	360	0,8096	0,8299	0,0203
28	20/03/2018	08:00 p.m.	372	0,8087	0,8284	0,0197
29	21/03/2018	08:00 a.m.	384	0,8216	0,8403	0,0187
30	21/03/2018	08:00 p.m.	396	0,8123	0,8312	0,0189

Anexo 8. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: P-X

N ^o de muestra	Día	Hora	Tiempo(h)	Peso vacío	Peso lleno	Masa g/mL
1	05/03/2018	08:00 a.m.	0	0,8201	0,8202	0,0001
2	05/03/2018	08:00 p.m.	12	0,7931	0,7934	0,0003
3	06/03/2018	08:00 a.m.	24	0,7947	0,7955	0,0008
4	06/03/2018	08:00 p.m.	36	0,8935	0,8946	0,0011
5	07/03/2018	08:00 a.m.	48	0,7814	0,7826	0,0012
6	07/03/2018	08:00 p.m.	60	0,9018	0,9036	0,0018
7	08/03/2018	08:00 a.m.	72	0,7939	0,796	0,0021
8	08/03/2018	08:00 p.m.	84	0,8203	0,8225	0,0022
9	09/03/2018	08:00 a.m.	96	0,8042	0,8066	0,0024
10	09/03/2018	08:00 p.m.	108	0,8132	0,8162	0,003
11	10/03/2018	08:00 a.m.	120	0,8231	0,828	0,0049
12	10/03/2018	08:00 p.m.	132	0,8003	0,8063	0,006
13	12/03/2018	08:00 a.m.	168	0,8285	0,8347	0,0062
14	12/03/2018	08:00 p.m.	180	0,8035	0,8114	0,0079
15	13/03/2018	08:00 a.m.	192	0,7931	0,8022	0,0091
16	13/03/2018	08:00 p.m.	204	0,8397	0,8512	0,0115
17	14/03/2018	08:00 a.m.	216	0,8042	0,8178	0,0136
18	14/03/2018	08:00 p.m.	228	0,8923	0,9075	0,0152
19	15/03/2018	08:00 a.m.	240	0,8111	0,8291	0,018
20	15/03/2018	08:00 p.m.	252	0,7909	0,8101	0,0192
21	16/03/2018	08:00 a.m.	264	0,8662	0,8861	0,0199
22	16/13/2018	08:00 p.m.	276	0,8176	0,8379	0,0203
23	17/03/2018	08:00 a.m.	288	0,8028	0,8232	0,0204
24	17/03/2018	08:00 p.m.	300	0,7965	0,8173	0,0208
25	19/03/2018	08:00 a.m.	336	0,8023	0,8238	0,0215
26	19/03/2018	08:00 p.m.	348	0,8075	0,8294	0,0219
27	20/03/2018	08:00 a.m.	360	0,8235	0,8448	0,0213
28	20/03/2018	08:00 p.m.	372	0,7962	0,8172	0,021
29	21/03/2018	08:00 a.m.	384	0,8028	0,8223	0,0195
30	21/03/2018	08:00 p.m.	396	0,8388	0,8577	0,0189

Anexo 9. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: P-1

N ^o de muestra	Día	Hora	Tiempo(h)	Peso vacío	Peso lleno	Masa
1	05/03/2018	08:00 a.m.	0	0,8051	0,8052	0,0001
2	05/03/2018	08:00 p.m.	12	0,8933	0,8937	0,0004
3	06/03/2018	08:00 a.m.	24	0,8186	0,8191	0,0005
4	06/03/2018	08:00 p.m.	36	0,8652	0,8664	0,0012
5	07/03/2018	08:00 a.m.	48	0,8241	0,8254	0,0013
6	07/03/2018	08:00 p.m.	60	0,8072	0,8087	0,0015
7	08/03/2018	08:00 a.m.	72	0,8096	0,8113	0,0017
8	08/03/2018	08:00 p.m.	84	0,8087	0,8116	0,0029
9	09/03/2018	08:00 a.m.	96	0,8375	0,841	0,0035
10	09/03/2018	08:00 p.m.	108	0,8239	0,8277	0,0038
11	10/03/2018	08:00 a.m.	120	0,7936	0,7976	0,004
12	10/03/2018	08:00 p.m.	132	0,7963	0,8011	0,0048
13	12/03/2018	08:00 a.m.	168	0,8002	0,8056	0,0054
14	12/03/2018	08:00 p.m.	180	0,8005	0,808	0,0075
15	13/03/2018	08:00 a.m.	192	0,8166	0,8249	0,0083
16	13/03/2018	08:00 p.m.	204	0,8014	0,8104	0,009
17	14/03/2018	08:00 a.m.	216	0,8241	0,8334	0,0093
18	14/03/2018	08:00 p.m.	228	0,7988	0,8086	0,0098
19	15/03/2018	08:00 a.m.	240	0,9001	0,9116	0,0115
20	15/03/2018	08:00 p.m.	252	0,7937	0,8055	0,0118
21	16/03/2018	08:00 a.m.	264	0,8996	0,9124	0,0128
22	16/13/2018	08:00 p.m.	276	0,7909	0,8046	0,0137
23	17/03/2018	08:00 a.m.	288	0,7996	0,815	0,0154
24	17/03/2018	08:00 p.m.	300	0,8251	0,843	0,0179
25	19/03/2018	08:00 a.m.	336	0,8309	0,8508	0,0199
26	19/03/2018	08:00 p.m.	348	0,7971	0,8175	0,0204
27	20/03/2018	08:00 a.m.	360	0,8031	0,8232	0,0201
28	20/03/2018	08:00 p.m.	372	0,8294	0,849	0,0196
29	21/03/2018	08:00 a.m.	384	0,8035	0,822	0,0185
30	21/03/2018	08:00 p.m.	396	0,8233	0,8422	0,0189


Anexo 10. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: MB -4

N ^a de muestra	Día	Hora	Tiempo(h)	Peso vacío	Peso lleno	Masa
1	05/03/2018	08:00 a.m.	0	0,8497	0,8498	0,0001
2	05/03/2018	08:00 p.m.	12	0,8031	0,8033	0,0002
3	06/03/2018	08:00 a.m.	24	0,8235	0,8238	0,0003
4	06/03/2018	08:00 p.m.	36	0,8142	0,815	0,0008
5	07/03/2018	08:00 a.m.	48	0,8232	0,8244	0,0012
6	07/03/2018	08:00 p.m.	60	0,8331	0,835	0,0019
7	08/03/2018	08:00 a.m.	72	0,8103	0,8129	0,0026
8	08/03/2018	08:00 p.m.	84	0,8485	0,8514	0,0029
9	09/03/2018	08:00 a.m.	96	0,8201	0,8231	0,003
10	09/03/2018	08:00 p.m.	108	0,8331	0,8369	0,0038
11	10/03/2018	08:00 a.m.	120	0,7939	0,7975	0,0036
12	10/03/2018	08:00 p.m.	132	0,7981	0,8022	0,0041
13	12/03/2018	08:00 a.m.	168	0,9003	0,9057	0,0054
14	12/03/2018	08:00 p.m.	180	0,8314	0,8376	0,0062
15	13/03/2018	08:00 a.m.	192	0,8403	0,8469	0,0066
16	13/03/2018	08:00 p.m.	204	0,8739	0,8816	0,0077
17	14/03/2018	08:00 a.m.	216	0,8435	0,8521	0,0086
18	14/03/2018	08:00 p.m.	228	0,8335	0,843	0,0095
19	15/03/2018	08:00 a.m.	240	0,8166	0,8282	0,0116
20	15/03/2018	08:00 p.m.	252	0,8009	0,8133	0,0124
21	16/03/2018	08:00 a.m.	264	0,8363	0,8491	0,0128
22	16/13/2018	08:00 p.m.	276	0,8489	0,8626	0,0137
23	17/03/2018	08:00 a.m.	288	0,8675	0,8829	0,0154
24	17/03/2018	08:00 p.m.	300	0,8328	0,85	0,0172
25	19/03/2018	08:00 a.m.	336	0,8142	0,834	0,0198
26	19/03/2018	08:00 p.m.	348	0,9011	0,9208	0,0197
27	20/03/2018	08:00 a.m.	360	0,8223	0,8424	0,0201
28	20/03/2018	08:00 p.m.	372	0,8862	0,9059	0,0197
29	21/03/2018	08:00 a.m.	384	0,8416	0,8605	0,0189
30	21/03/2018	08:00 p.m.	396	0,8454	0,864	0,0186

Anexo 11. Tabla de datos para elaborar curva de crecimiento de la cepa: P-2

N ^o muestra	Día	Hora	Tiempo(h)	Peso vacío	Peso lleno	Masa g/mL
1	05/03/2018	08:00 a.m.	0	0,8151	0,8152	0,0001
2	05/03/2018	08:00 p.m.	12	0,9003	0,9007	0,0004
3	06/03/2018	08:00 a.m.	24	0,8087	0,8096	0,0009
4	06/03/2018	08:00 p.m.	36	0,8096	0,8111	0,0015
5	07/03/2018	08:00 a.m.	48	0,8472	0,8482	0,001
6	07/03/2018	08:00 p.m.	60	0,8852	0,8864	0,0012
7	08/03/2018	08:00 a.m.	72	0,8286	0,8305	0,0019
8	08/03/2018	08:00 p.m.	84	0,8351	0,8375	0,0024
9	09/03/2018	08:00 a.m.	96	0,9021	0,9043	0,0022
10	09/03/2018	08:00 p.m.	108	0,8788	0,8818	0,003
11	10/03/2018	08:00 a.m.	120	0,8251	0,8297	0,0046
12	10/03/2018	08:00 p.m.	132	0,8063	0,8128	0,0065
13	12/03/2018	08:00 a.m.	168	0,8611	0,8698	0,0087
14	12/03/2018	08:00 p.m.	180	0,8316	0,8414	0,0098
15	13/03/2018	08:00 a.m.	192	0,847	0,8586	0,0116
16	13/03/2018	08:00 p.m.	204	0,8216	0,8348	0,0132
17	14/03/2018	08:00 a.m.	216	0,8334	0,849	0,0156
18	14/03/2018	08:00 p.m.	228	0,8017	0,8193	0,0176
19	15/03/2018	08:00 a.m.	240	0,8233	0,8415	0,0182
20	15/03/2018	08:00 p.m.	252	0,8139	0,8334	0,0195
21	16/03/2018	08:00 a.m.	264	0,8432	0,8634	0,0202
22	16/03/2018	08:00 p.m.	276	0,8719	0,8924	0,0205
23	17/03/2018	08:00 a.m.	288	0,8449	0,8662	0,0213
24	17/03/2018	08:00 p.m.	300	0,8132	0,8348	0,0216
25	19/03/2018	08:00 a.m.	336	0,871	0,8931	0,0221
26	19/03/2018	08:00 p.m.	348	0,7931	0,8143	0,0212
27	20/03/2018	08:00 a.m.	360	0,8115	0,8325	0,021
28	20/03/2018	08:00 p.m.	372	0,832	0,8508	0,0188
29	21/03/2018	08:00 a.m.	384	0,8612	0,8798	0,0186
30	21/03/2018	08:00 p.m.	396	0,8315	0,8494	0,0179

Anexo 12. Análisis de la biomasa inicial



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Linceo Calle CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe ☎ http://www.ucsm.edu.pe ☎ Apto. 1350
AREQUIPA - PERU





INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA31G18.003484


Nombre del Cliente	: Maria Alejandra Salamanca Valdivia
Dirección del Cliente	: Urb. La Isla 234 Cercado
RUC	: No corresponde
Condición del Muestreado	: Por el cliente
Descripción	: Lana con rastrojo
Tamaño de muestra	: 1500 g
Fecha de Recepción	: 31/07/2018
Fecha de Inicio del Ensayo	: 31/07/2018
Fecha de Emisión de Informe	: 08/08/2018
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:


ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE SOLIDOS TOTALES (%)	37,91
Método gravimétrico	
DETERMINACIÓN DE MATERIA VOLÁTIL (SOLIDOS VOLÁTILES %)	19,64
Método gravimétrico adaptado de COVENIN 1647-80 CARBON	
DETERMINACIÓN DE MATERIAL VOLÁTIL	
DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS (Unidades pH 20°C) ,	7,35
DETERMINACIÓN OF pH IN FOODS NMX-F-317-S-1978	
DETERMINACION DE HUMEDAD (%)	62,09
Offical Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Vol. II. Method 925.45D. USA. p. 1010 - 1011.	

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el simbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA 00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Anexo 13. Panel fotográfico de construcción del reactor

- **Aspersor del influente**



- **Heatplate con puertos de recirculación de influente y salida de gas**



Contener de biol y bomba de pecera para la recirculación de influente



Panel de control de temperatura

