



Estudio cinético de bacterias metanogénicas a diferentes temperaturas

Jorge Luis Ortiz Carrillo¹; Jarson Alexis Rodríguez Chona². Ángela Maritza Cajiao Pedraza³; Julio Isaac Maldonado Maldonado⁴.

¹ Laboratorio Aguas Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenierías y Arquitectura. Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia.).

² Programa de Ingeniería Ambiental Facultad de Ingenierías y Arquitectura Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia).

³ Programa de Microbiología. Facultad Ciencias Básicas. Docente (E) Cepario, Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia).

⁴ Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenierías y Arquitectura Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia).

Resumen

En este estudio se empleó, un consorcio microbiano previamente aislado de la fase metanogénica de un filtro anaerobio de flujo ascendente separado en dos fases DI-FAFS. El proyecto tuvo por objeto analizar y describir el comportamiento cinético de *Methanobacterium spp* y *Methanococcus spp* respectivamente, empleando condiciones anaerobias y la variable de temperatura como principal punto de partida en el proceso. Para llevar a cabo el procedimiento respectivo se realizó un pre-inoculo de los microorganismos en estudio 18hrs antes, luego se tomó el volumen correspondiente y se llevó el inoculo al medio respectivo utilizado para el crecimiento, bajo condiciones estrictas de anaerobiosis; se evaluó a diferentes periodos de incubación bajo agitación 155 rpm, seguidamente se procedió a la medida de absorbancias tomando la lectura de D.O a 620 nm, al mismo tiempo sembrando en agar para conteo respectivo y obtener UFC/ML.

Finalmente se realizó una curva de crecimiento para cada microorganismos a las tres diferentes temperaturas (20°C, 27°C y 34°C), encontrando que tanto los resultados prácticos como teóricos sustentan que dicho consorcio microbiano en la fase metanogénica requiere una temperatura óptima de crecimiento, hallando así que el mejor comportamiento del crecimiento de *Methanobacterium spp* y *Methanococcus spp* se encuentra en las temperaturas de 27°C y 34°C.

PALABRAS CLAVE: consorcios microbianos; cinética crecimiento, condiciones anaeróbicas.

Abstract

Kinetic study of methanogenic bacteria at different temperatures



40

In this study, a previously isolated from an anaerobic methanogenic phase upflow filter separated into two phases DI-FAFS microbial consortium was employed. The project was to analyze and describe the kinetic behavior of *Methanobacterium spp* and *Methanococcus spp* respectively, using anaerobic conditions and the variable temperature as the main starting point in the process. To carry out the respective procedure a pre-inoculum of microorganisms study was conducted in 18hrs before, then the corresponding volume was taken and respective inoculum was the medium used for growth, under strict anaerobic conditions; was evaluated at different periods of incubation under agitation 155 rpm, then it gave proce-measuring absorbance reading taking OD at 620 nm, while seeding in agar to obtain respective count and CFU / ML.

Finally a growth curve for each microorganisms at three different temperatures (20 ° C, 27 ° C, 34 ° C) was conducted, finding that both the practical and theoretical results support that the microbial consortium in the methanogenic phase requires optimal temperature growth and finding the best growth performance and *Methanococcus spp* *Methanobacterium spp* is at temperatures of 27 ° C and 34 ° C.

KEYWORDS: microbial consortia; growth kinetics, anaerobic conditions.

*Para citar este artículo: Ortiz Carrillo Jorge Luis et al . Estudio cinético de bacterias metanogénicas a diferentes temperaturas.Revista Bistua.2016.14(1):39-48

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Ángela Maritza Cajiao Pedraza. Programa de Microbiología. Facultad Ciencias Básicas.Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia).
-email: angelacajiaooster@gmail.com



Introducción

La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio, teniéndose en cuenta la cantidad de células por mililitro de un cultivo, con un volumen y una cantidad de nutrientes limitada; en ella se diferencian cuatro fases, la fase de retraso (a veces llamada fase de latencia), la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular.

De las cuatro fases de la curva de crecimiento, habitualmente la fase de crecimiento exponencial o logarítmico es la que presenta mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo y la célula se encuentra en su máximo proceso metabólico. Durante esta fase el tiempo de generación (g) de los microorganismos (el tiempo que la población de microorganismo necesita para duplicar su número) se mantiene constante.

La conversión anaerobia de complejos orgánicos en dióxido de carbono y metano requiere de la actividad coordinada de diferentes grupos tróficos de poblaciones bacterianas. Tradicionalmente la degradación anaerobia ha sido considerada como un proceso que acepta la existencia de tres grandes grupos bacterianos: Las bacterias formadoras de ácidos (o acidogénicas), las formadoras de acetatos (o acetogénicas) y finalmente las formadoras de metano (o metanogénicas) (McCarty & B.E., 2001) (C.P., Daigger, & H.C., 1999).

En un proceso equilibrado, las bacterias metanogénicas durante el transcurso de las etapas de crecimiento generan a la misma

velocidad: dióxido de carbono, metano, nitrógeno, hidrógeno y otros gases según la naturaleza del vertido. La acción coordinada de los grupos bacterianos provoca que el pH del medio se estabilice en valores ligeramente alcalinos, en el rango de 7.4 a 8.5 dependiendo de la temperatura de trabajo. (N. & ., 1997).

Los cambios en las condiciones físicas o biológicas del medio implican cambios metabólicos y de adaptación de las distintas especies, alterando o modificando la actividad natural de las poblaciones implicadas. Así durante la fase de puesta en marcha del proceso anaerobio, las distintas familias microbianas evolucionan hasta que la biocenosis estabiliza todos los grupos alcanzando sus proporciones finales. (H.S. Shin, 2001).

La metanogénesis es el último paso del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica. (J. Andersson, 2002). En esta etapa, la mayor parte de la energía química contenida en el sustrato es convertida en metano por actuación de las bacterias metanogénicas. Este grupo bacteriano requiere condiciones medioambientales muy estrictas para su desarrollo y de elementos tales como: vitaminas, trazas minerales no usuales (como Ni y Co), AGV, cofactores específicos, etc. (McCarty & B.E., 2001).

Para llevar acabo gráficamente este tipo de resultados se puede usar La edición web del DMFit que es una aplicación on-line utilizada para ajustar curvas bacterianas donde la fase lineal (fase exponencial) está precedida de una fase de adaptación y una posterior estacionaria. La edición web del DMFit ha sido elaborada con financiamiento del UK Food Standards Agency (Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido). (DMFit., 2009)

El objetivo general de este estudio fue analizar y describir el comportamiento

Comentado [AQ4]: Normas???????

Comentado [AQ5]: Citar???

Comentado [AQ6]: Lo mismo

Comentado [AQ1]:

Comentado [AQ2]:

Comentado [AQ3]: Citar: Normas Vancouver en todo el texto

Comentado [AQ7]: Normas



cinético del consorcio microbiano *Methanobacterium spp* y *Methanococcus spp* aislados previamente de un filtro anaerobio ascendente separado en dos fases, frente a la variable de temperatura y verificar su influencia en el mismo, para obtener así las características óptimas en las que se propone se deben estandarizar los procesos para que funcionen eficientemente.

Materiales y Métodos

Para estudiar la factibilidad de aplicación de un consorcio microbiano y para entender ¿cómo su eficiencia cinética es influenciada por las condiciones ambientales?, se empleó en este estudio un digestor anaerobio ascendente separado en tres fases en el rango mesófilos de temperaturas (20 ° C, 27 ° C y 34 ° C) de manera discontinua bajo diferentes condiciones de operación. (Grupo de investigaciones GIMBIO programa de microbiología facultad de ciencias básicas Universidad de Pamplona (B. Demirel, 2002).

Para la inoculación inicial de la colonia microbiana se hizo necesario realizar el pre-inóculo de los microorganismos en estudios esto con el fin de favorecer su adaptación al medio y obtener una cepa joven en un intervalo de tiempo de incubación de 18-24hrs bajo condiciones estrictas de anaerobiosis, así que se requirió tomar valores de absorbancia del cultivo inoculado y del cultivo al término de la incubación, esto con el fin de observar el cambio en la biomasa que ocurre, producto del crecimiento del microorganismo.

Inoculo

Transcurrido este tiempo se tomó a partir del pre-inóculo un volumen de este, correspondiente al 0,25% del volumen del fermentador, de tal forma que se adicionaron a un Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de

medio de enriquecimiento para bacterias metanógenas. (Atlas, 2010)

Procedimiento experimental

Una vez inoculado, se tomó una muestra de aproximadamente 1,5 ml (según el volumen de la cubeta de espectrofotometría) para medir inmediatamente la absorbancia y posteriormente incubado en la incubadora con agitación, a las temperaturas empleadas que para este caso fueron de (20°C, 27°C y 34°C) y agitación (110 rpm) óptima del microorganismo bajo condiciones estrictas de anaerobiosis.

Las mediciones de absorbancia se realizaron cada 3, 6, 12 y 24 horas (dependiendo de las observaciones hechas), posteriormente las muestras obtenidas fueron inmediatamente procesadas, tomando la lectura de D.O a 620 nm y posteriormente sembradas por superficie en agar para conteo respectivo (Ortiz, 2008) para *Methanobacterium spp* y *Methanococcus spp*, esto con el fin de hacer un recuento en placa y así poder establecer valores de cinética, previamente estudiados que se reflejan en las Gráficas(1,2,3,4,5)

Para el recuento en placa, se sembró por la técnica en superficie en medio (Ortiz, 2008) selectivo, según el microorganismo trabajado, preparando diluciones consecutivas hasta 10^{-2} a partir de la muestra tomada del cultivo. Posteriormente, se procedió a aplicar las normas de conteo a los recuentos obtenidos, para establecer en cada muestra tomada la concentración UFC existente del microorganismo, y finalmente los valores obtenidos se grafican una función logarítmica: log del N° de células en función del tiempo, absorbancia vs tiempo, para cada tipo de microorganismos para cada temperatura empleada.

Por consiguiente se procede a establecer las gráficas que buscan expresar el comportamiento de los microorganismos

Comentado [AQ8]: Citar Nor Vancouver



experimentados en los medios evaluados, constituyendo su cinética, de tal manera que se podrá estimar las fases de crecimiento: Latencia, Exponencial y entrada a la estacionaria, para esto se hizo necesario utilizar un software de modelamiento dinámico on-line DMFit. (DMFit., 2009)

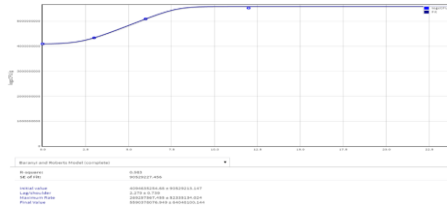
Resultados y Discusión

Se empleó un consorcio microbiano de procedencia de un filtro anaerobio operado con estiércol porcino, agua residual y lixiviado, con la finalidad de establecer una cinética de reacción metabólica para cada microorganismo aislado dentro de la fase metano génica del sistema anaerobio. (R. Borja, 2003).

Se reportan que existen varios mecanismos mediante los cuales se puede describir la oxidación de la materia orgánica mediante un consorcio microbiano. Mencionan que existen cuatro etapas bien definidas de reacción de acuerdo con los microorganismos presentes en el sistema, dándole a la etapa de la metanogenesis la mayor relevancia por ser la más prolongada en el tiempo y donde ocurren los cambios más notables de transformación.

Tabla 1. Valores de cinetica de crecimiento para *Methanobacterium spp* a T°20C

Tiempo Horas	absorbancia	Dilución (recuento UFC/mL)				Promedio	desviación	Log N
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴			
0	0,123	95	98	90	77	60,0205	42,90153961	4,084606171
3	0,127	180	177	100	100	93,3545	72,39663909	4,336404075
6	0,132	323	270	190	187	162,6086667	122,1531851	5,091838354
12	0,197	570	370	300	255	251,1995	199,3162922	5,526247444
24	0,198	588	490	333	278	285,533	218,1048963	5,654357609



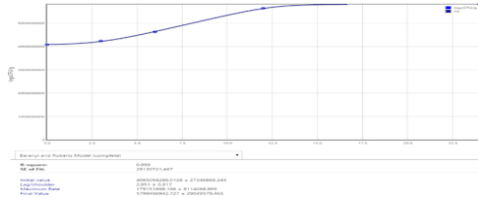
Gráfica 1. DMFit Curva de crecimiento para *Methanobacterium spp* a T° de 20° C bajo parámetros del modelo experimental de Baranyi y Roberts (complete) (Baranyi & Roberts, 1994)

Inicialmente se puede establecer según los datos obtenidos, se evidencian un crecimiento lento de *Methanobacterium spp* analizado bajo esta condición de temperatura mostrando así su mejor actividad metabólica trascurrida las 24hrs, mostrando inicialmente una población de $4,07 \times 10^9$ una tasa máxima de crecimiento de $1,7 \times 10^7$ ucf/ml, y con una población final de $5,6 \times 10^9$ ufc/ml, lo que muestra que el factor temperatura muestra un límite donde las proteínas y ácidos nucleicos se pueden inactivar de manera reversible, y por ende a más bajas temperaturas este tipo de microorganismos limitan su crecimiento hasta su fase de muerte.

Para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no tiene lugar la proliferación o este se manifiesta en un crecimiento retardado como sucede para este caso.

Tabla 2. Valores de cinética de crecimiento para *Methanococcus spp* a T°20C

Tiempo Horas	absorbancia	Dilución (recuento UFC/mL)				Promedio	desviación	Log N
		10-ene	10-ene	10-feb	10-feb			
0	0,123	93	95	85	80	58,85383333	41,8656043	4,075056969
3	0,125	129	100	98	85	69,18833333	49,59311794	4,256832255
6	0,136	200	180	127	99	102,0266667	77,36738268	4,625195011
12	0,221	598	478	370	223	280,2035	224,2680838	5,635516125
24	0,227	678	543	398	333	329,5711667	249,4861118	5,797185281

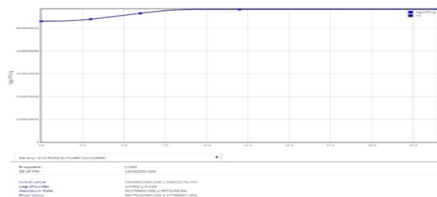


Gráfica 2. DMFit Curva de crecimiento para *Methanococcus spp* a T° de 20° C bajo parámetros del modelo experimental de Baranyi y Roberts (complete) (Baranyi & Roberts, 1994)

Igualmente para este microorganismo la temperatura es un factor que influye en su desarrollo metabólico haciendo de este un proceso aletargado, inicialmente partimos de una población inicial de 4,1x10⁹ ufc/ml, manifestando una tasa de crecimiento de 1,8x10⁸ ufc/ml y una población final de 4,1x10⁹ de acuerdo a los valores anteriores (Gráfica 2) esta bacteria tuvo un comportamiento un poco más significativo, mostrando su mayor punto de desarrollo metabólico en un periodo de incubación de 24hrs con referencia al crecimiento de *Methanobacterium spp* (Gráfica 1). Este comportamiento sugiere que los organismos no están trabajando a la temperatura óptima.

Tabla 3. Valores de cinética de crecimiento para *Methanobacterium spp* a T° 27°C

Methanobacterium spp								
Tiempo Horas	absorbancia	Dilución (recuento UFC/mL)				Promedio	Desviación	Log N
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴			
0	0,168	350	360	200	215	200,8613333	149,8073078	5,302614786
3	0,18	400	320	315	290	221,3633333	159,0197474	5,399802394
6	0,192	550	400	440	320	286,032	211,2046912	5,656103699
12	1,141	680	510	420	388	335,1901667	250,1581549	5,814498032
24	1,208	662	588	408	380	343,868	253,626448	5,840257863

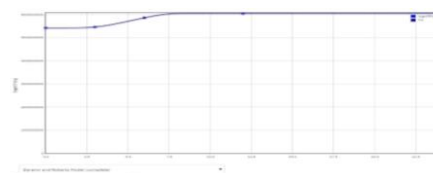


Gráfica 3. DMFit Curva de crecimiento para *Methanobacterium spp* a T° de 27° C bajo parámetros del modelo experimental de Baranyi y Roberts (complete) (Baranyi & Roberts, 1994).

Para este caso a medida que la temperatura aumenta, se incrementan también las reacciones enzimáticas y la tasa de reproducción por lo que al emplear este rango de temperatura cercana a su punto óptimo de crecimiento estas bacterias aceleran su metabolismo, la curva de crecimiento nos traza un comportamiento más simoidal; Partiendo de una población inicial de 5,3x10⁹ ufc/ml, con una tasa máxima de crecimiento en su fase exponencial de 9x10⁹ ufc/ml llegando a una población final de 5,8x10⁹, lo que muestra que ya la bacteria en estudio comienza a favorecerse para su proliferación debido a las condiciones de crecimiento dada.

Tabla 4 . Valores de cinetica de crecimiento para *Methanococcus spp* a T°27C

Methanococcus spp								
Tiempo Horas	absorbancia	Dilución (recuento UFC/mL)				Promedio	Desviación	Log N
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴			
0	0,168	380	360	300	320	226,6946667	162,3048556	5,423604031
3	0,17	458	360	315	298	236,0283333	171,5953496	5,463951854
6	0,206	720	610	525	470	388,5343333	283,2276885	5,586238154
12	1,225	876	730	670	510	466,5375	342,412356	6,145338403
24	1,243	1000	920	700	650	549,2071667	397,8497338	6,308475723



Gráfica 4. DMFit Curva de crecimiento para *Methanococcus spp* a T° de 27° C bajo parámetros del modelo experimental de Baranyi y Roberts (complete) (Baranyi & Roberts, 1994)

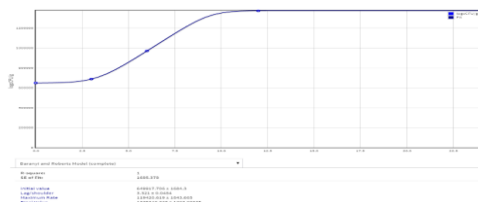
Como el anterior caso esta bacteria comienza su actividad metabólica ya un poco más acelerada, con una mayor proliferación que *Methanobacterium spp* (Gráfica 3) partiendo con una población inicial de 5,4x10¹⁰,



mostrando una tasa máxima de crecimiento de $1,5 \times 10^8$ y llegando a una población final de $6,0 \times 10^9$, lo que coloca a *Methanococcus* spp en mejores términos de adaptación y crecimiento en este tipo de procesos anaerobios como mejor alternativa en la fase Metanogénica.

Tabla 5. Valores de cinética de crecimiento para *Methanobacterium* spp a T°34C

<i>Methanobacterium</i> spp							
Tiempo Horas	absorbancia	Dilución (recuento UFC/mL)				Promedio	desviación
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
0	0,185	860	600	740	460	665	149,916
3	0,236	1000	1000	980	930	977,5	28,613
6	0,592	17000	16800	17200	15000	16500	877,496
12	1,366	530000	290000	1600000	1250000	919500	526049,836
24	1,392	970000	784000	1070000	980000	951000	103985,576



Gráfica 5. DMFit Curva de crecimiento para *Methanobacterium* spp a T° de 34° C bajo parámetros del modelo experimental de Baranyi y Roberts (complete) (Baranyi & Roberts, 1994)

Aun cuando la biota anaerobia puede crecer en un amplio rango de temperaturas, en este estudio se ha realizado la cinética a tres valores de temperaturas diferentes dentro del rango mesófilo. Como se sabe, ésta es una de las variables ambientales primordiales, ya que dicta los límites de viabilidad del proceso pues afecta a todos los microorganismos de manera diferente llegando incluso a lesionar la integridad celular de la población microbiana.

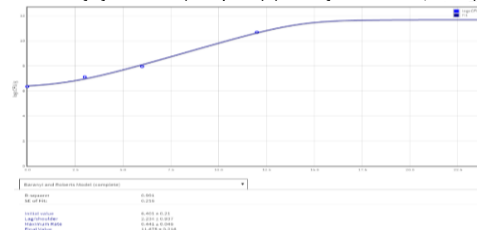
En la gráfica 5 se puede observar que la actividad del consorcio a esta temperatura está en su punto óptimo de crecimiento. Por otro lado, el perfil mostrado por la gráfica 5, exhibió durante el periodo de incubación de 24hrs un proceder muy semejante que para

el caso posterior en la curva 6. No obstante, su comportamiento es en general el más activo de las cinéticas aquí analizadas ya que pese haber mostrado en pocos días de actividad, su número poblacional de microorganismos resultaron ser las más importantes de todos los ensayos realizados, llegando a ser al final de 14×10^4 UFC/ml, que demuestra un nivel efectivo de este microorganismo en la fase metanogénica que conlleva a una muy buena biodegradación de la materia al interior de este tipo de procesos.

Tabla 6. Valores de cinética de crecimiento para *Methanococcus* spp a T° de 34° C

<i>Methanococcus</i> spp								
Tiempo Horas	absorbancia	Dilución (recuento UFC/mL)				Promedio	desviación	Log N
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}			
0	0,152	655	440	620	580	573,75	81,652	6,35219
3	0,666	1250	1120	1370	1190	1232,5	91,753	7,11679
6	0,778	2800	2650	2900	3000	2837,5	129,301	7,95067
12	0,933	45000	47000	41100	41000	43525	2574,271	10,6810
24	0,993	111700	160000	98000	100000	117443	25127,523	11,6737

Gráfica 6. DMFit Curva de crecimiento para *Methanococcus* spp a T° de 34° C bajo parámetros del modelo experimental de Baranyi y Roberts (complete) (Baranyi & Roberts, 1994)



Los efectos de la temperatura mesofílica para el proceso cinético durante la fase metanogénica de la digestión anaerobia, conduce a que las reacciones metabólicas referente al crecimiento de dichos consorcios microbianos experimentados a temperaturas comprendidas entre 27°C y 34°C, muestran una alta tasa de crecimiento poblacional como lo muestran las (Gráficas 3-4 y 5-6) en comparación con los operados a temperaturas bajas como la fue la de 20°C, donde muestran una tendencia en cuanto a la multiplicación de este tipo de



microorganismos bastante lenta, (Gráficas 1-2) con lo anterior se puede concluir que tanto la temperatura como las condiciones estrictas de anaerobiosis, juegan un papel fundamental en este tipo de bacterias, en cuanto a la activación metabólica de estos se refiere, haciendo de estos la temperatura como una de las variables más eficaz para tener en cuenta en este tipo de procesos anaerobios, si se quiere conseguir una producción óptima de la biomasa presente en esta etapa. (DMFit., 2009)

Antes de incorporar modelos de crecimiento microbiano en evaluaciones cuantitativas se debe considerar la validez de las investigaciones, ya que no todos los modelos de crecimiento microbiano están validados bajo condiciones reales, por lo que resultaría incorrecto suponer que las predicciones del modelo son correctas, si los puntos estimados son reemplazados por distribuciones de probabilidad en los parámetros que constituyen las variables de entrada del modelo. (G.C. Cha, 1997).

Conclusiones

Una vez activado el consorcio microbiano, anteriormente aislado y conservado, se procedió a la adaptación al sustrato; los resultados conseguidos en la elaboración de la cinética de crecimiento para cada microorganismo confirman que para llegar a obtener un desarrollo metabólico óptimo, con este tipo de bacterias presente en la fase Metanogénica, la biomasa requiere de temperaturas mesofílicas cercana a la óptima de 27°C a 34°C y por lo menos 24 horas incubación bajo condiciones estrictas de anaerobiosis. No obstante, debido a que se trata de una comunidad entrelazada de microorganismos, resulta difícil separar la actividad biológica de cada una de las fases.

En definitiva, como lo propone la literatura el cambio en T° puede actuar como un inhibidor del proceso biológico, ya que cuando éste no

es el óptimo la cinética de reacción es menos eficiente.

Este estudio, ha podido indicar que cambiar en 7 unidades el valor de la T° origina incrementos de hasta el 50% en la eficiencia del crecimiento de este tipo de bacterias, por lo cual se debe tener precaución al manejar este tipo de variable.

Se puede sugerir que la manera óptima de trabajar éste sistema de reacción de ensayos de biocinéticas sería a T° de 34°C y 37°C con un periodo mínimo de incubación de 24hrs.

Las temperaturas de operación analizadas manifiestan que el consorcio es muy perceptivo a los cambios de esta variable, y se obtuvo como temperatura óptima los 34° C.

Agradecimientos:

Al programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona por el apoyo. Se agradece la participación de M.Sc Danny Armando Piscioti Ortega en el manejo del software DMFit para el comportamiento cinético microbiológico.

Referencias bibliográficas

- Atlas, R. M. (2010). Handbook of Microbiological Media. Washington D,C: ASM-PRESS.
- B. Demirel, O. Y. (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: a review, J. Chem. Technol. Biotechnol. 77 , 743–755.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. . Int. J. Food Microbiol.23: 277-294.
- C.P., G., Daigger, G., & H.C., L. (1999). Biological wastewater treatment. New York,: Marcel Dakker.

Comentado [AQ9]: Referenciar de acuerdo a las normas Vancouver



- Prieto, E. D. J. M., Rivas, B., & Sánchez, J. (2013). Natural polymer grafted with syntethic monomer by microwave for water treatment-a review. *Ciencia en Desarrollo*, 4(1): 219-240.
- DMFit. (2009). *Software de modelamiento dinámico edición on-line*.<http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMFit.aspx>.
- G.C. Cha, T. N. (1997). Effect of rapid temperature change and HRT on anaerobic acidogenesis. *Water Sci. Technol.* , 247–253.
- Moreno, L. M., Muñoz Prieto, E., & Casanova, H. (2015). Flocculatin with Chitosan of Microalgae Native of the Colombian Plateau. *Ciencia en Desarrollo*, 6(1), 17-24.
- A Daza, F Herrera, A Naranjo (2013). Condiciones higiénico-sanitarias aplicadas en la elaboración de queso doble crema manufacturado en tres empresas de la provincia de Pamplona. *Revista Bistua*, Vol. 11, no.1, 61-73.
- Gavala, H. N., Angelidaki, I., & K., B. (2003). Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. . *Adv. In Bioch. Eng. & Biotech.* , Vol. 81, pp. 58-93.
- H.S. Shin, S. H. (2001). *Performance of an UASB reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste*,. *Water Res.* 35 (14) (2001) 3441–3447.
- J. Andersson, L. B. (2002). *Evaluation of straw as a biofilm carrier in the methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion of crop residues*. *Bioresour. Technol.* 85 (2002) 51–56.
- McCarty, P., & B.E., R. (2001). *Environmental biotechnology: Principles and applications*. Ed. McGraw Mil.Cap. 2, pp. 19-55.
- Ortiz, J. F. (2008). *Practica Laboratorio Microbiología Industrial: Crecimiento Bacteriano en Cultivo Discontinuo, Curva de Crecimiento*. Pamplona, Colombia.
- N., H. P., & ., S. C. (1997). *Rumen microbial ecosystem*,. Ed. Elsevier applied Science, Cap 1. 117-199, (1997).
- R. Borja, B. R. (2003). *Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste*. *Biochem. Eng. J.* 15 (2003) 139–145.
- Jorge Luis Ortiz Carrillo** ·Microbiólogo, Laboratorio Aguas Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenieras y Arquitectura. Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia.)
- Jarson Alexis Rodríguez Chona** Maestría en Ingeniería Ambiental Facultad de Ingenierías y Arquitectura Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria.
- Ángela Maritza Cajiao Pedraza**.M. Sc Docente, (E) Cepario, Programa de Microbiología. Facultad Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia).
- Julio Isaac Maldonado Maldonado**. M.Sc. Docente, Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenieras y Arquitectura Universidad de Pamplona, Ciudadela Universitaria. Pamplona Norte de Santander, (Colombia)
-