



Técnica *Headspace* asociada a cromatografía de gases para la identificación y cuantificación de ácidos grasos volátiles producidos tras la digestión anaeróbica de paja de cebada *Hordeum vulgare*

GRADOS TORREZ, RICARDO ENRIQUE ¹
ÁLVAREZ ALIAGA, MARÍA TERESA¹

¹ Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas "Luis Enrique Terrazas Siles". Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.

FECHA DE RECEPCIÓN: 18/02/2016

FECHA DE ACEPTACIÓN 10/05/2016

Resumen

Con el objetivo de obtener un criterio básico para la identificación, cuantificación y monitoreo de los ácidos grasos volátiles (AGVs) producidos durante la digestión anaeróbica de paja de cebada por el consorcio microbiano TACANA, la técnica *Headspace* fue optimizada. Ésta técnica permite cuantificar AGVs individuales cuando son volatilizados de la muestra e inyectados directamente a un cromatógrafo de gases. Los AGVs estándar mostraron los siguientes tiempos de retención: ácido acético 2,71 min, ácido propiónico 4,12 min, ácido i-butírico 5,21 min, ácido n-butírico 5,68 min, ácido i-valérico 6,62 min y ácido n-valérico 7,25 min. Las curvas de estandarización y las ecuaciones de la recta permitieron determinar un incremento en la concentración de ácido acético desde $37,7 \pm 1,58$ a $72,2 \pm 1,85$ mM, y una disminución en

Abstract

With the aim to obtain basic criteria to identification, quantification and monitoring of volatile fatty acids (VFAs) produced during anaerobic digestion of barley straw by microbial consortia TACANA, the *Headspace* technique was optimized. This technique allows quantify individual VFAs when are first volatilized from the crude sample and then injected directly to a gas chromatograph. The standard VFAs showed the following retention times: acetic acid 2,71 min, propionic acid 4,12 min, i-butyric acid 5,21 min, n-butyric acid 5,68 min, i-valeric acid 6,62 min and n-valeric acid 7,25 min. The standardization curves and line equations allowed determining an increase in acetic acid concentration from $37,7 \pm 1,58$ to $72,2 \pm 1,85$ mM and a decrease in n-butyric acid concentration from $133 \pm 2,54$

la concentración de ácido n-bútrico desde $133 \pm 2,54$ a $62,1 \pm 2,12$ mM al elevar la concentración de paja de cebada desde 5 a 10 % p/v, respectivamente, tras 30 días de digestión anaeróbica. Estos parámetros son muy útiles debido al interés biotecnológico que tienen los AGVs como materias primas para la producción no sólo de fuentes de energía renovable como el biogas y bioetanol, sino también para la producción de compuestos amigables con el medio ambiente como los poli-hidroxialcanoatos.

PALABRAS CLAVE

Ácidos grasos volátiles (AGVs),
Headspace, Cromatógrafo de
gases, Digestión anaeróbica.

to $62,1 \pm 2,12$ mM by increasing the barley straw concentration from 5 to 10 % w/v, respectively, after 30 days of anaerobic digestion. These parameters are very useful due biotechnological interest that VFAs have as feedstock to produce not only renewable energy sources like biogas and bioethanol, but also to eco-friendly compounds production like poly-hydroxyalkanoates.

KEY WORDS

Volatile fatty acids (VFAs),
Headspace, Gas chromatograph,
Anaerobic digestion.

INTRODUCCIÓN

La digestión anaeróbica es un proceso biológico de degradación orgánica bacteriana en ausencia de oxígeno, en el que se produce principalmente una mezcla de gases y un componente acuoso o sedimento formado por residuos digeridos y sin digerir (Quispe y col., 2005). La digestión anaeróbica por cultivos mixtos – denominados consorcios microbianos – es favorecida económicamente debido a que las condiciones de esterilización, manipuleo y mantención, son más sencillas que con un cultivo puro, además, los cultivos mixtos están conformados por un gran número de diferentes microorganismos separados en familias metabólicas, de tal forma que el producto metabólico de una puede servir de sustrato para la otra, haciendo el proceso metabólico global mucho más eficiente (Sánchez y col., 1994). Durante la digestión anaeróbica, las moléculas complejas presentes en la materia orgánica (polisacáridos, celulosa, hemi-celulosa, lignina, xilano, etc) se descomponen para dar como productos finales metano y dióxido de carbono. El proceso consta de cuatro etapas: Hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Bouallagui y col., 2005, Adekunle and Okolie, 2015) (Figura 1).

La paja de cebada (*Hordeum vulgare*) es un residuo agrícola que constituye un problema en las labores de explotación agrícola afectando al medio ambiente en todas las regiones del mundo (Quispe y col., 2005). Está formada por compuestos orgánicos complejos, insolubles y de alto peso molecular (compuestos lignocelulósicos), como la lignina, celulosa y hemicelulosa (Wang y col., 1999). Su hidrólisis durante la digestión anaeróbica está catalizada por enzimas bacterianas extracelulares que la transforman en productos simples, solubles y de bajo peso molecular (Tabla 1). Éste paso es llevado a cabo principalmente por bacterias anaeróbicas estrictas como los bacteroides y clostridios, y algunas anaeróbicas facultativas como las del género *Streptococci* (Yadvika y col., 2004).

Los productos de la hidrólisis son fermentados por microorganismos acidogénicos presentes en el cultivo mixto generando hidrógeno, dióxido de carbono y ácidos grasos volátiles (AGVs). Los AGVs comprenden un amplio grupo de moléculas de ácido carboxílico de bajo peso molecular como el ácido acético, propiónico, butírico, valérico y algunos amino ácidos (Jain y col., 1998; Ábalos y col., 2000). Bacterias acetogénicas como *S. wolfei* y *S. wolini* pueden retransformar los AGVs en ácido acético e hidrógeno como productos principales (Yadvika y col., 2004). Por otro lado, bacterias metanogénicas como *Methanosarcina spp* y *Methanotrix spp* transforman el ácido acético en metano (Geeta y col., 1994).

En el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) se han desarrollado modelos para la digestión anaeróbica de la papa (*Solarum tuberosum*) (Quispe y col., 2004), de frutas y verduras (Crespo y col., 2005, Álvarez y col., 2005) y de varios residuos agrícolas (Álvarez y col., 2005, Chávez y col., 2006, Chambi y col., 2007 y Grados y col., 2008) utilizando cultivos mixtos presentes en lodos y aguas residuales. En estos estudios, los AGVs totales obtenidos tras la digestión anaeróbica fueron utilizados como sustratos para la obtención de etanol, sulfuro de hidrógeno, metano y poli-hidroxialcanoatos.

Varios métodos cromatográficos han sido descritos para la determinación de AGVs individuales (Angelidaki y col., 1990; Manni y Caron, 1995; Albert y Martens, 1997; Pan y col., 1995; Yo, 1999). Sin embargo la mayoría de éstos requieren la preparación de la muestra y extracción de los AGVs antes de ser inyectados al cromatógrafo. Algunos métodos incluyen la filtración y centrifugación (Angelidaki y col., 1990), la extracción previa con un solvente (Manni and Caron, 1995) y la micro extracción en fase sólida directamente de la fase acuosa (Pan y col., 1995; Yo, 1999).

Los métodos que emplean la filtración, lidian en general con muestras complejas, sólidas o viscosas, esto conduce a la necesidad del mantenimiento extensivo y continuo del sistema de filtración para obtener el flujo requerido (Boe y col., 2007). No obstante, se ha desarrollado una técnica directa de extracción de AGVs – técnica *Headspace* – basada en la volatilización de los mismos hacia el espacio superior existente entre la muestra (fase líquida) y la tapa del tubo (Boe, y col., 2007). Una vez volatilizados, los AGVs que componen la muestra son retirados e inyectados directamente al cromatógrafo de gases (Chen y col., 1994; Ábalos y col., 2000; Ábalos y Bayona, 2000) (Figura 2). La técnica *Headspace* elimina la necesidad de utilizar solventes para la extracción, es simple, rápida, sensible y permite el análisis de componentes volátiles – como los AGVs – a partir de soluciones o mezclas complejas sin la interferencia de otros compuestos no volátiles (Chen y col., 1994).

El objetivo de este estudio fue utilizar la técnica *Headspace* asociada al análisis por cromatografía de gases para identificar y cuantificar los AGVs individuales producidos tras la digestión anaeróbica de paja de cebada (*Hordeum vulgare*) por el consorcio microbiano TACANA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Consorcio microbiano “TACANA”, recolectado de la comunidad de Santa Rosa de Maravilla, provincia Ixiamas, La Paz - Bolivia. Estudios anteriores confirman que éste consorcio posee capacidad degradativa de material celulósico y xilanósico (Chambi y col., 2007).

Activación del consorcio TACANA

El consorcio fue inoculado en medio Anaeróbico fluido (línea comercial Scharlaw Chemie S.A. Barcelona – Spain), en condiciones de cultivo estacionarias (Batch) durante 7 días a 37 °C.

Digestión anaeróbica de paja de cebada

En botellas de 100 mL de capacidad, se colocaron 4 u 8 g (5 y 10% p/v respectivamente) de paja de cebada. Se añadió 80 mL de medio basal 11 (NH_4Cl 100 g/L, NaCl 10 g/L, $\text{MgCl}_{2.6}\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L, $\text{CaCl}_{2.2}\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_{4.3}\text{H}_2\text{O}$ 200 g/L, $\text{FeCl}_{3.4}\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L, H_3BO_3 60 mg/L, HCl 25% v/v 6,5 mL, $\text{CoCl}_{2.6}\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, $\text{MnCl}_{2.4}\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L, $\text{NaMoO}_{4.2}\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, ZnCl_2 70 mg/L, $\text{NiCl}_{2.6}\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L, $\text{CuCl}_{2.2}\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L, NaSeO_3 3 mg/L, NaOH 0,5 g/L, NaHCO_3 8,5 g/L). El medio fue saturado con N_2 , las botellas fueron selladas con anillos metálicos y autoclavadas. Cada botella fue inoculada con 5 mL de consorcio microbiano. Las botellas fueron cultivadas a 37 °C por 30 días. La concentración de AGVs totales fue monitoreada durante todo el proceso.

Cuantificación de AGVs totales

Los AGVs totales fueron determinados por el método de titulación descrito por Buchauer (1998). El cultivo microbiano fue centrifugado a 3500 rpm por 10 min y filtrado (20 μm). La muestra fue titulada con H_2SO_4 0.1 N desde un pH de 5 a 4. El volumen gastado es proporcional a la cantidad de AGVs totales. Las mediciones fueron realizadas por duplicado y los cálculos de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{AGVs totales (mg/L)} = (131340 \times N \times \text{VAg/Vm}) - 3.08 \times (\text{pHi} - 25)$$

Dónde:

- N = Normalidad del ácido sulfúrico (mmol/L)
- VAg = Volumen de ácido sulfúrico gastado (de pH 5 a 4)
- Vm = Volumen de la muestra
- pHi = pH inicial de la muestra

Identificación y cuantificación de AGVs individuales

La identificación y concentración de AGVs individuales fue realizado por cromatografía de gases a través del método *Headspace* (Ábalos y col. 2000, Boe y col., 2007, Ábalos y Bayona, 2000). Un volumen de 9 mL de muestra fue transferido y sellado en un vial de 10 mL de capacidad. La muestra fue incubada a 60 °C por 24 h para asegurar que los AGVs pasen al estado gaseoso. Después de este periodo, 0.5 mL de la fase aérea fue inyectada en un cromatógrafo de gases (Clarus 500 Perkin Elmer) acoplado a un detector de ionización a llama. Los AGVs de la muestra fueron impulsados por hidrógeno a través de una columna ELITE-1 (30 m x 0.25 mm) para su separación. Según Ábalos y col (2000), la temperatura inicial del horno fue programada a 70 °C por 3 min, luego incrementada a razón de 15 °C/min hasta 200 °C. La temperatura final fue mantenida por 3 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron programadas a 260 °C. Para identificar los AGVs individuales de la muestra, se determinaron los tiempos de retención empleando soluciones estándar de ácido acético, propiónico, iso-butírico, n-butírico, iso-valérico y n-valérico (Figura 4). El cálculo de la concentración de AGVs individuales en la muestra, fue realizado a través de curvas de calibración empleando diluciones seriadas de ácido acético, propiónico, n-butírico y n-valérico (Figura 5), las determinaciones fueron realizadas por duplicado (Figuras 6 y 7).

RESULTADOS

Concentración de AGVs totales

La concentración de AGVs totales producidos tras 30 días de digestión anaeróbica de paja de cebada al 5 y 10% p/v por el consorcio TACANA, fue de 8.1 ± 0.236 g/L y 10.2 ± 0.199 g/L, respectivamente (Figura 3).

Identificación de AGVs individuales

El cromatograma obtenido tras la separación de una mezcla de AGVs estándar extraídos a través del método *Headspace* (Ábalos y col. 2000) (Véase Materiales y métodos), señala los tiempos de retención del ácido acético (2,71 min), ácido propiónico (4,12 min), ácido i-butírico (5,21 min), ácido n-butírico (5,68 min), ácido i-valérico (6,62 min) y ácido n-valérico (7,25 min) (Figura 4).

Cuantificación de AGVs individuales

En la Figura 5 se observan las curvas de calibración de AGVs estándar, como del ácido acético (Figura 5A), propiónico (Figura 5B), n-butírico (Figura 5C) y n-valérico (Figura 5D).

El análisis de las muestras correspondientes a los sobrenadantes obtenidos tras 30 días de digestión anaeróbica de paja de cebada al 5 y 10% p/v por el

consorcio TACANA, indica la presencia de tres AGVs: ácido acético (2,71 min), ácido propiónico (4,12 min) y ácido n-butírico (5,68 min), identificados según sus tiempos de retención (min) (Figuras 6 y 7).

Por otro lado, las áreas de los picos ($\mu\text{V s}$) correspondientes a los tres AGVs identificados en las muestras, fueron interpolados utilizando las ecuaciones de la rectas provenientes de las curvas de calibración (Figura 5). Los resultados indican la producción de $37,7 \pm 1,58$ mM de ácido acético, $1,09 \pm 0,023$ mM de ácido propiónico y $133 \pm 2,54$ mM de ácido n-butírico tras la digestión anaeróbica de paja de cebada al 5% p/v (Figura 6), y $72,2 \pm 1,85$ mM de ácido acético, $0,98 \pm 0,18$ mM de ácido propiónico y $62,1 \pm 2,12$ mM de ácido n-butírico con paja de cebada al 10% p/v (Figura 7).

Figura 1. Etapas clave del proceso de la digestión anaeróbica: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Extraído de Adekunle and Okolie, 2015).

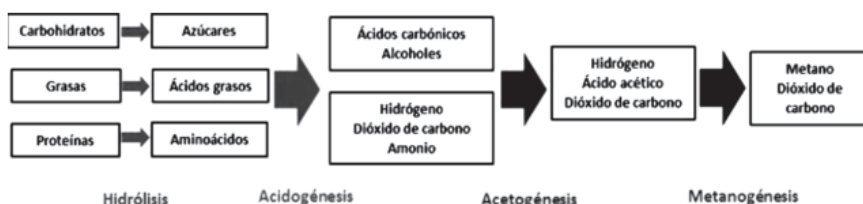


Figura 2. Representación esquemática del sistema de extracción *Headspace* (Extraído de Queiroz y col., 2001)

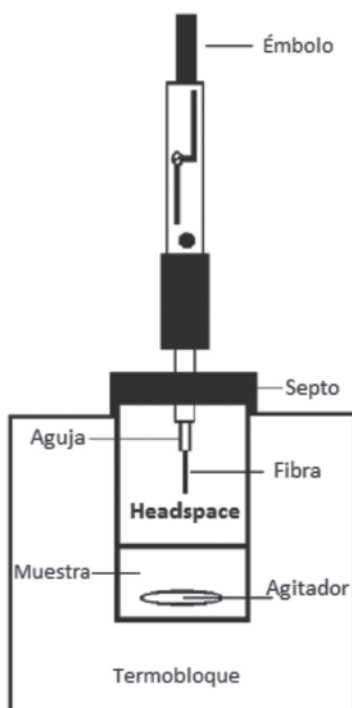


Figura 3. Cuantificación de AGVs totales (método de titulación: Buchauer, 1998) producidos durante la digestión anaeróbica de paja de cebada al 5 y 10% p/v respectivamente, por el consorcio TACANA.

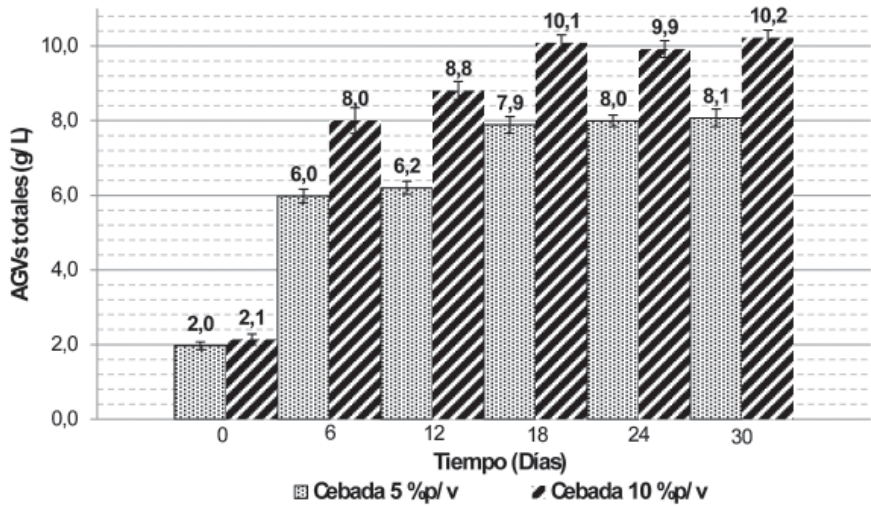


Figura 4. Determinación de los tiempos de retención de AGVs estándar a través del sistema de extracción *Headspace* asociado a cromatografía de gases.

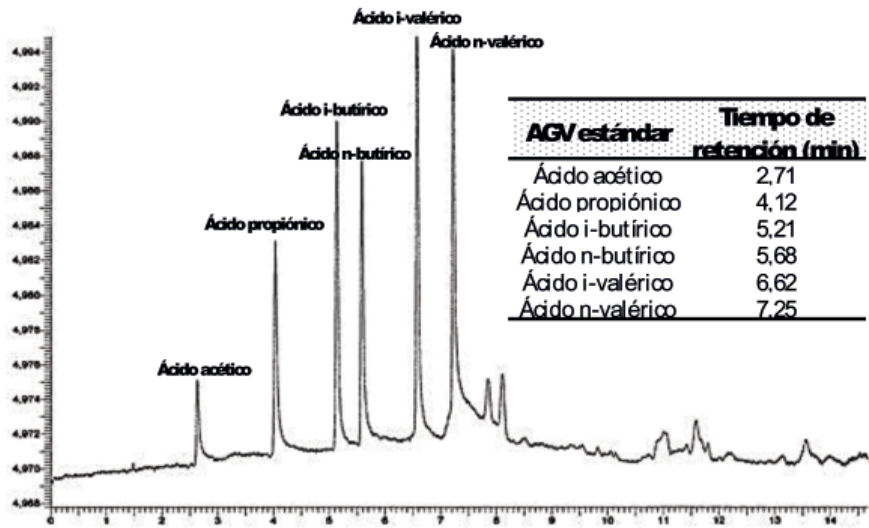


Figura 5. Curvas de calibración de AGVs estándar. A. Ácido acético ($R^2=0.9937$).
B. Ácido propiónico ($R^2=0.9941$). C. Ácido n-butírico ($R^2=0.9916$).
D. Ácido n-valérico ($R^2=0.96$).

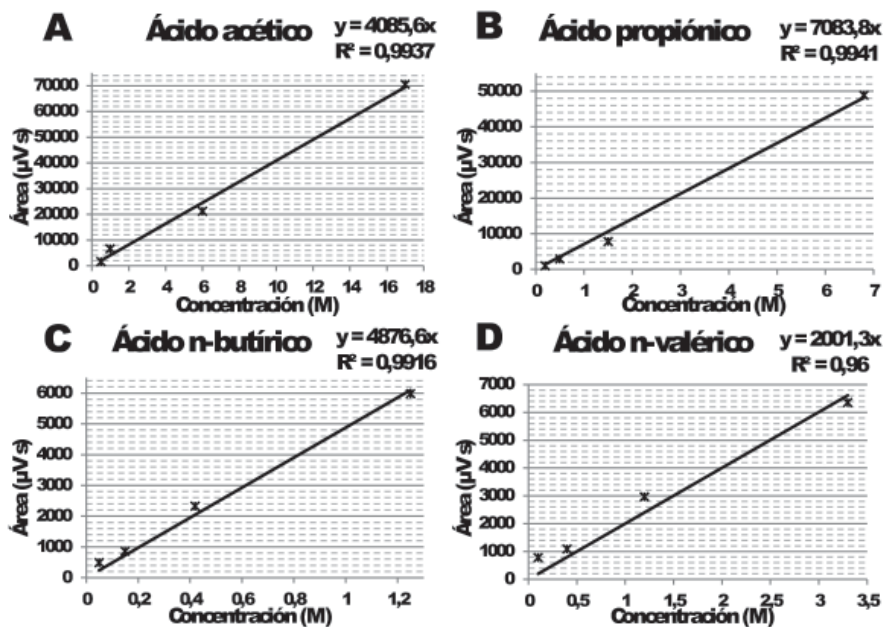


Figura 6. Identificación y cuantificación de AGVs individuales producidos tras 30 días de digestión anaeróbica de paja de cebada al 5% p/v por el consorcio TACANA.

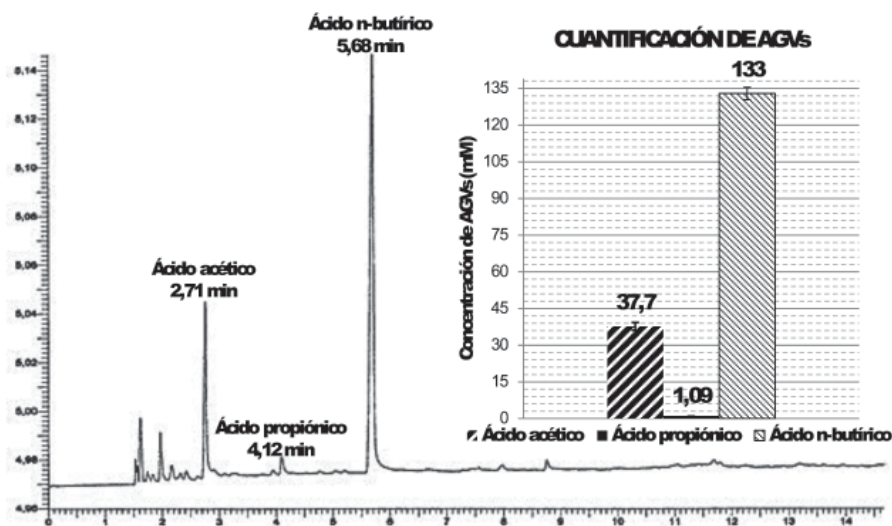


Figura 7. Identificación y cuantificación de AGVs individuales producidos tras 30 días de digestión anaeróbica de paja de cebada al 10% p/v por el consorcio TACANA.

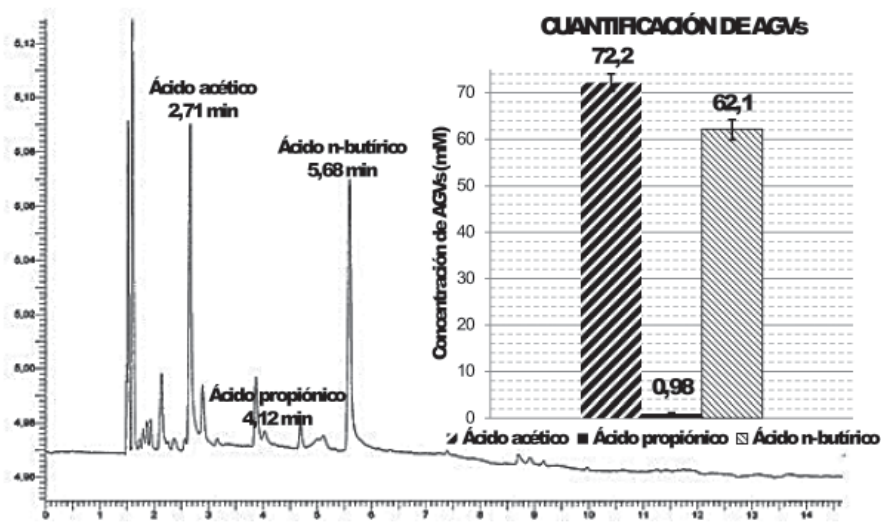


Tabla 1. Algunas enzimas hidrolíticas bacterianas extracelulares producidas durante la digestión anaeróbica.

ENZIMAS	SUSTRATOS	PRODUCTOS
Proteinasa	Proteínas	Aminoácidos
Celulasa	Celulosa	Celobiosa, glucosa
Hemicelulasa	Hemicelulosa	Glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, galactosa, ácido glucorónico
Amilasa	Almidón	Glucosa
Lipasa	Grasas	Ácidos grasos, glicerol
Pectinasa	Pectina	Galactosa, arabinosa, ácido poligalacturónico

DISCUSIÓN

La concentración de AGVs totales es un importante indicador para el monitoreo de la digestión anaeróbica y puede ser fácilmente determinada por titulación (Powell y Archer, 1989; Buchauer, 1998; Steyer y col., 2002). Éste indicador otorga información rápida y confiable sobre el estado del proceso en comparación con otros indicadores como el pH, la alcalinidad y la producción de gas (Ahrling y col., 1995; Björnsson y col., 2000; Hickey y Switzenbaum, 1991; Hill y Holmberg, 1988; Mechichi y Sayadi, 2005).

Sin embargo, la identificación y cuantificación de los AGVs individuales provee mucha más información sobre el estado del proceso de digestión anaeróbica. Estudios anteriores resaltan la importancia del ácido iso-butírico e iso-valérico (Cobb y Hill, 1991; Hill y Bolte, 1989), que actúan como indicadores de riesgo tempranos para predecir el fracaso o éxito global de la

digestión anaeróbica (Ahring y col., 1995; Cobb y Hill, 1991). Además, se ha sugerido que los niveles de ácido iso-butírico y n-butírico son los mejores indicadores de estrés (Ahring y col., 1995). Por tanto, la detección de los cambios metabólicos durante la digestión anaeróbica a través de la determinación de los AGVs individuales, es un parámetro importante para el control, optimización y éxito del proceso (Boe y col., 2007).

En el presente estudio, la concentración de AGVs totales se incrementó (de $8,1 \pm 0,24$ a $10,2 \pm 0,2$ g/L) al aumentar la concentración de paja de cebada (de 5 a 10% p/v, respectivamente), debido a una mayor disponibilidad de sustrato orgánico. Aunque la concentración de AGVs totales permite monitorear el estado del proceso de la digestión anaeróbica, la técnica *Headspace* aplicada en éste estudio, permitió identificar y cuantificar de forma rápida y sencilla los AGVs individuales que son indicadores más precisos. Así, se evidenció un aumento en la concentración de ácido acético (de $37,7 \pm 1,58$ a $72,2 \pm 1,85$ mM) y una disminución de ácido n-butírico (de $133 \pm 2,54$ a $62,1 \pm 2,12$ mM) al incrementar la concentración de paja de cebada (de 5 a 10% p/v, respectivamente). Estos datos indican la producción de diferentes cantidades de AGVs individuales al utilizar distintas concentraciones de sustrato orgánico durante la digestión anaeróbica. Adicionalmente, los cromatogramas obtenidos muestran varios picos sin identificar con tiempos de retención inferiores al del ácido acético (2,71 min) situados en un rango de 1,5 a 2,5 min (Figuras 6 y 7), posiblemente correspondientes a compuestos volátiles de menor peso molecular como el ácido fórmico y otros compuestos gaseosos como el metano, CO_2 , SH_2 entre otros.

La identificación y cuantificación de AGVs individuales producidos durante la digestión anaeróbica de compuestos orgánicos, es un parámetro muy importante debido al interés biotecnológico que tienen como materia prima para la producción no sólo de fuentes de energía renovables como el biogas y el bioetanol (Biorefinería), sino también para la producción de compuestos amigables con el medio ambiente como los poli-hidroxialcanoatos (Plástico biodegradable).

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto ASDI-SAREC por el apoyo y financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS

- Ábalos, M., Bayona, J.M., Pawliszyn, J. (2000). Development of a *Headspace* solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. *Journal of Chromatography A* 873: 107 – 115.
- Ábalos, M., Bayona, J.M. (2000). Application of gas chromatography coupled to chemical ionisation mass spectrometry following *Headspace* solid-phase microextraction for the determination of free volatile fatty acids in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 891: 287 – 294.
- Adekunle, K.F. and Okolie, J.A. (2015). A review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 6: 205 – 212.
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:559 – 565.
- Albert, D.B., Martens, C.S. (1997). Determination of low-molecular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Marine Chemistry* 56: 27 – 37.

- Álvarez, M. (2005). Microbial treatment of heavy metal leachates. Tesis de Doctorado. Lund University. Lund – Sweden.
- Angelidaki, I., Petersen, S.P., Ahring, B.K. (1990). Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 469 – 472.
- Björnsson, L., Murto, M., Mattiasson, B. (2000). Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 844 – 849.
- Boe, K., Batstone, D.J., Angelidaki, I. (2007). An innovative online VFA monitoring system for the anaerobic process, based on *Headspace* gas chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 96(4): 712 – 721.
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Ben, R., Hamdi, M. (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biotechnology* 40: 989 – 995.
- Buchauer, K. (1998). A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to wastewater and sludge treatment. *Processes. Water S.A.* 24: 49 – 56.
- Chambi, E., Álvarez, M., Giménez, A. (2007). Optimización de las condiciones más favorables para la producción de biogas mediante digestión anaeróbica de la paja de quinua (*Chenopodium quinua* wildenow) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*). Tesis de Licenciatura. I.I.F.B., Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia.
- Chávez, G., Álvarez, M., Giménez, A. (2006). Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico. Tesis de Maestría. I.I.F.B., Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia.
- Chen, A., Liao, P.H., Lo, K.V. (1994). *Headspace* analysis of malodorous compounds from swine wastewater under anaerobic treatment. *Biores Technol* 49: 83 – 87.
- Crespo, C., Álvarez, M., Giménez, A. (2005). Biogénesis de sulfuro de hidrógeno empleando ácidos grasos volátiles producidos por la hidrólisis de vegetales y frutas en descomposición. Tesis de Licenciatura. I.I.F.B., Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia.
- Cobb, S.A., Hill, D.T. (1991). Volatile fatty acid relationships in attached growth anaerobic fermenters. *Trans ASAE* 34: 2564 – 2572.
- Geeta, G.S., Suvarna, C.V., Jagdeesh, K.S. (1994). Enhanced methane production by sugarcane trash pretreated with *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Microbiol. Biotechnol* 9(2): 113 – 117.
- Grados, R., Álvarez, M. (2008). Optimización de las condiciones para la producción de poli-hidroxialcanoatos mediante la digestión anaeróbica de desechos agrícolas. Tesis de Licenciatura. I.I.F.B., Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia.
- Hickey, R.F., Switzenbaum, M.S. (1991). Thermodynamics of volatile fatty-acid accumulation in anaerobic digesters subject to increases in hydraulic organic loading. *Res J Water Pollut Control Fed* 63: 141 – 144.
- Hill, D.T., Holmberg, R.D. (1988). Long chain volatile fatty acid relationships in anaerobic digestion of swine waste. *Biol Wastes* 23: 195 – 214.
- Hill, D.T., Bolte, J.P. (1989). Digester stress as related to iso-butyric iso-valeric acids. *Biol Wastes* 8: 33 – 37.
- Jain, S.R., Mattiasson, B. (1998). Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biometathation process. *Biotech. Lett* 20(8): 771 – 775.
- Manni, G., Caron, F. (1995). Calibration determination of volatile fatty acids in waste leachates by gas chromatography. *J Chromatogr A* 690: 237 – 242.
- Mechichi, T., Sayadi, S. (2005). Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochem* 40: 139 – 145.
- Pan, L., Adams, M., Pawliszyn, J. (1995). Determination of fatty acids using solid phase micro extraction. *Anal. Chem.* 67: 4396 – 4403.
- Powell, G.E., Archer, D. (1989). On-line titration method for monitoring buffer capacity total volatile fatty acid levels in anaerobic digesters. *Biotechnol Bioeng* 33: 570 – 577.
- Queiroz, S., Collins, C. e Jardim, I. (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim Nova* 24(1): 68 – 76.
- Quispe, D., Álvarez, M., Giménez, A. (2005). Establecimiento de las condiciones para la producción de biogas a partir de ácidos grasos volátiles obtenidos de la hidrólisis anaeróbica de la papa (*Solanum tuberosum*) a nivel de laboratorio. Tesis de Licenciatura. I.I.F.B., Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia.
- Sanchez, J.M., Arijó, S., Muñoz, M.A., Morinigo, M.A., Borrego, J.J. (1994). Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. *Appl. Microbiol Biotechnol* 41(4): 480 – 486.
- Steyer, J.P., Bouvier, J.C., Conte, T., Gras, P., Soubie, P. (2002). Evaluation of a four year experience with a fully instrumented anaerobic digestion process. *Water Sci Technol* 45: 495 – 502.
- Wang, Q., Kuninobu, M., Kakimoto, K., Ogawa, H.I., Kato, T. (1999). Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pre-treatment. *Bioresour Technol* 68(3): 309–313.
- Yadvika, S., Sreekrishnana, T.R., Kohli, S., Rana, V. (2004). Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. *Biore-source Technology* 95: 1 – 10.
- Yo, S.P. (1999). Analysis of volatile fatty acids in wastewater collected from a pig farm by a solid phase microextraction method. *Chemosphere* 38: 823 – 834.