



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

Obtención de metano mediante el tratamiento de
vinazas de etanol hidratado utilizando un Reactor
Anaerobio de Manto de Lodos modificado

Tesis que presenta

I.Q.I. Elda Isaura España Gamboa

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán

Septiembre, 2010

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades, Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán a 25 de septiembre del 2010

I.Q.I. Elda Isaura España Gamboa

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE ENERGÍA RENOVABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C., BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LILIANA M. ALZATE GAVIRIA Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO, BAJO LA CODIRECCIÓN DE LA DRA. GALDY HERNÁNDEZ ZÁRATE.

A mis padres Alvar España y Elda Gamboa, por todo su apoyo y cariño
A la memoria de mi abuela Alba María, por creer en mí
A mi hermano Noé, familia y amigos, por todo su cariño

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Liliana Alzate Gaviria por su apoyo, paciencia y ayuda en la elaboración de esta tesis.

A mi codirectora de tesis la Dra. Galdy Hernández Zárata por introducirme en el área de la biología molecular.

A mis tutores interno el Dr. Javier Mijangos Cortés del CICY y externo el I.Q.I. Carlos Peraza Lizama de la UADY, por todas sus recomendaciones en el transcurso de la elaboración de la tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y en especial a la unidad de Energía Renovable, por proporcionar las facilidades para desarrollar el proyecto.

Al Instituto Tecnológico de Boca del Río, por las instalaciones y facilidades proporcionadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 224322 otorgada.

Al M.C. Jorge Domínguez Maldonado, técnico académico de la unidad de energía renovable del CICY, por todo su apoyo prestado en la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros del CICY por su compañía y apoyo.

ÍNDICE

Índice	i
Abreviaturas	iii
Listado de tablas	v
Listado de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción y Objetivos	1
1. Antecedentes	6
1.1. Caracterización de vinazas de diferentes fuentes de materia prima	7
1.1.1. Sacarosa	8
1.1.2. Inulina	10
1.1.3. Almidón	11
1.1.4. Lignocelulosa	13
1.2. Propuestas de tratamiento para vinazas	14
1.3. Conceptos básicos de la digestión anaerobia	15
1.4. Factores que afectan la digestión anaerobia	20
1.4.1. Temperatura	20
1.4.2. pH y alcalinidad	20
1.4.3. Toxicidad	21
1.5. Ventajas y desventajas del tratamiento anaerobio	24
1.6. Bioreactores anaerobios para el tratamiento de vinazas	25
1.6.1. Reactor de película fija (RPF)	26
1.6.2. Reactor de lecho fluidizado (RLF)	27
1.6.3. Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL)	29
1.6.4. Tipo de flujo en el reactor	32
1.7. Diversidad microbiana en reactores anaerobios	34
1.8. Hipótesis	37
2. Metodología	38
2.1. Diseño del RANMAL modificado	39
2.2. Tipo de flujo dentro del reactor	39
2.3. Obtención de vinazas y caracterización físico-química	41

2.3.1. Fermentación de las melazas	41
2.3.2. Obtención de etanol hidratado	42
2.3.3. Caracterización de las vinazas	43
2.4. Inoculación y arranque del reactor	44
2.5. Operación del reactor con vinazas de etanol hidratado	45
2.6. Identificación de grupos bacterianos y arqueas metanogénicas	47
2.6.1. Extracción de ADN	47
2.6.2. Amplificación por PCR	48
3. Resultados y Discusiones	50
3.1. Tipo de flujo dentro del reactor	51
3.2. Obtención de vinazas de etanol hidratado	53
3.3. Operación del reactor	57
3.3.1. Inoculación y arranque del reactor	57
3.3.2. Desempeño del RANMAL y evaluación de la carga orgánica óptima	59
3.3.3. Caracterización del efluente obtenido a la carga óptima	64
3.4. Identificación de grupos bacterianos y arqueas metanogénicas	67
Conclusiones	70
Perspectivas	73
Bibliografía	75

ABREVIATURAS

ADNr: ADN ribosomal
AGVs: Ácidos Grasos Volátiles
ARNr: ARN ribosomal
ARS: Agua Residual Sintética
A_{parcial}: Alcalinidad parcial
A_{intermedia}: Alcalinidad intermedia
A_{total}: Alcalinidad total
BRS: Bacterias Reductoras de Sulfato
C.O: Carga Orgánica
DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno
DDGS: Granos Secos de Destilación con Solubles
DDG: Granos Secos de Destilación
DNS: Ácido 3-5 Dinitro Salicílico
DQO: Demanda Química de Oxígeno
DQO_{efl}: Demanda Química de Oxígeno en el efluente
DQO_{inf}: Demanda Química de Oxígeno en el influente
DQO_{rem}: Demanda Química de Oxígeno removida
E(t): Tiempo de residencia del fluido
FID: Detector de Ionización de Flama
GC: Guanina-Citosina
HMF: Hidroximetilfurfural
MLGE: Manto de Lodo Granular Expandido
MS: Materia Seca
MTBE: Metil Tert-Butil Éter
NAT: Nitrógeno Amoniacal Total
N_{org}: Nitrógeno orgánico
N_T: Nitrógeno Total
N-NH₃: Nitrógeno Amoniacal
pb: Pares de bases
PC: Proteína Cruda
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RANMAL: Reactor Anaerobio de Manto de Lodos

RLF: Reactor de Lecho Fluidizado

RPF: Reactor de Película Fija

R.M: Rendimiento de Metano

TBE: Tris-Borato-EDTA

TRH: Tiempo de Retención Hidráulica

TCD: Detector de Conductividad Térmica

V.B: Volumen de Biogás

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Caracterización de vinazas de diferente fuente rica en sacarosa.	10
Tabla 1.2. Caracterización de vinazas de agave.	11
Tabla 1.3. Caracterización de vinazas de maíz.	12
Tabla 1.4. Caracterización de vinazas de cebada y trigo.	13
Tabla 1.5. Diferentes opciones de tratamiento para vinazas.	15
Tabla 1.6. Estequiometría de reacciones acetogénicas.	17
Tabla 1.7. Estequiometría de reacciones metanogénicas.	18
Tabla 1.8. Clasificación de arqueas metanogénicas y algunas características.	19
Tabla 1.9. Datos de literatura del tratamiento anaerobio de vinazas.	32
Tabla 1.10. Géneros representativos de las Divisiones Proteobacterias y Gram positivas.	35
Tabla 1.11. Diversidad microbiana en diferentes bioreactores.	36
Tabla 2.1. Caracterización físico-química de vinazas de etanol hidratado.	44
Tabla 2.2. Formulación del Agua Residual Sintética.	45
Tabla 2.3. Caracterización físico-química del efluente.	47
Tabla 2.4. Composición del buffer de electroforesis.	48
Tabla 2.5. Grupos microbianos evaluados por PCR.	48
Tabla 2.6. Condiciones del termociclador.	49
Tabla 3.1. Caracterización de vinazas de diferentes fuentes.	54
Tabla 3.2. Concentración de AGVs y etanol en vinazas de etanol hidratado.	56
Tabla 3.3. Parámetros evaluados a diferentes cargas orgánicas.	61
Tabla 3.4. Comparación del tratamiento de vinazas por diferentes autores.	63
Tabla 3.5. Caracterización de vinaza y efluente a la carga orgánica óptima de este estudio.	65
Tabla 3.6. Caracterización de efluentes del tratamiento anaerobio de vinazas por otros autores.	67
Tabla 3.7. Grupos microbianos evaluados por PCR.	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática simplificada de la digestión anaerobia.	16
Figura 1.2. Principales usos del metano.	25
Figura 1.3. Esquema del reactor de película fija.	26
Figura 1.4. Esquema del reactor de lecho fluidizado.	28
Figura 1.5. Esquema del Reactor Anaerobio de Manto de Lodos.	29
Figura 1.6. Gránulos Anaerobios del reactor RANMAL.	30
Figura 1.7. Curvas E (t) para flujo pistón y mezcla completa.	33
Figura 2.1. a) Esquema del RANMAL modificado, b) Sistema instalado.	40
Figura 2.2. a) Inóculo activado, b) Lote de 2 L de fermentación.	42
Figura 2.3. Obtención de etanol hidratado. a) Primera destilación, b) Segunda destilación.	43
Figura 2.4. Lodo granular utilizado en la inoculación.	44
Figura 2.5. Evaluación de la carga orgánica óptima.	46
Figura 3.1. Comparación de la curva del tiempo de residencia (E(t)) dentro del RANMAL propuesto con las curvas proporcionadas por Levenspiel.	51
Figura 3.2. Visualización del tipo de flujo de reactor utilizando un colorante.	52
Figura 3.3. Tiempos de residencia en un cromatograma de vinazas de etanol hidratado.	55
Figura 3.4. Valores obtenidos para cada carga orgánica evaluada.	60
Figura 3.5. Detección del gen ADNr 16S del Dominio <i>Archaea</i> en la carga orgánica óptima.	68

RESUMEN

Un Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL) modificado a escala laboratorio fue utilizado para la obtención de metano mediante el tratamiento de vinazas de etanol hidratado. El comportamiento del flujo dentro del reactor fue estudiado y definido por medio de trazadores de conductividad y tinciones como un flujo de mezcla completa.

El reactor fue operado a condiciones mesofílicas, alimentado semi-continuamente con vinazas de etanol hidratado. El inóculo consistió de un lodo granular proveniente de un RANMAL operado en el tratamiento de vinazas formadas durante la producción de etanol de residuos de plátano. El período de arranque fue de 9 días con una carga orgánica de 5.9 Kg DQO/m³-día, alcanzando una eficiencia de remoción de DQO del 97% y una concentración de 58% de metano en el biogás.

El estudio demostró que a una carga óptima, 17.05 Kg DQO/m³-día, la eficiencia de remoción de DQO fue 66%, alcanzando un rendimiento de metano de 0.40 m³/Kg DQO_{rem}, con una concentración de 84% de metano en el biogás. Estos resultados obtenidos demostraron que este RANMAL modificado para el tratamiento de las vinazas fue exitoso y sobrepasó los valores encontrados en investigaciones previas. También se observó que el efluente del tratamiento anaerobio presentó una disminución en las características químicas en comparación con las vinazas, a excepción del potasio, sulfuro, y nitrógeno amoniacal. Donde, estos dos últimos son conocidos como inhibidores de la digestión anaerobia, sin embargo, la concentración alcanzada de éstos a la carga orgánica de 17.05 Kg DQO/m³-día no afectó la producción de metano.

Durante la operación a carga óptima, se determinó a partir de muestras procedentes del manto, arqueas metanogénicas y bacterias colonizadoras en el RANMAL. Los iniciadores utilizados para la amplificación del gen ADN_r 16S de los Dominios *Archaea* y *Bacteria*, mostró la presencia de las subclases α -, β -, γ -, y δ de las Proteobacterias, bacterias gram positivas con bajo contenido en GC (Guanina-Citosina), bacterias reductoras de sulfato (BRS), *Bacillus* y *Clostridium*. Bacterias gram positivas con alto contenido en GC estuvieron ausentes, esto es benéfico para futuros usos del efluente obtenido de la digestión anaerobia, ya que este grupo incluye especies bacterianas consideradas como patógenos. De igual forma, se identificó que las arqueas metanogénicas que favorecieron la producción de metano pertenecieron a los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales*.

ABSTRACT

A lab-scale modified Upflow Anaerobic sludge Blanket (UASB) was used to obtain methane by treatment of stillage from hydrated ethanol. Conductivity and colored tracer investigations were realized to study the flow behavior in the reactor, obtaining as result a perfect mixer flow.

The reactor was operated at mesophilic conditions and semi-continuously fed with stillage from hydrated ethanol. The seed sludge consisted of granular sludge from a UASB operated for treatment of stillage of the ethanol production from banana residues. The star-up period was 9 days with an Organic Loading Rate (OLR) of 5.9 Kg COD/m³-day, reaching a COD removal efficiency of 97% and a concentration of 58% of methane in the biogas.

The study demonstrated that at optimum OLR, 17.05 Kg COD/m³-day, the COD removal efficiency of the reactor was 66%, reaching a methane yield of 0.40 m³/Kg COD_{removed} with a concentration of 84% of methane in the biogas was. These results obtained showed us that in this modified UASB the treatment of the stillage was successful and overcame the reported values by other researchers. Also it was observed a reduction in the stillage characteristics after the anaerobic treatment, but not in the potassium, sulfide and the ammonia nitrogen, although these values in this optimum OLR were no toxic for the reactor, so the methane production was not affected.

Methanogens and bacteria colonizing UASB bioreactor were determined from samples of the blanket collected at optimal organic loading rate. The primers used for amplification of 16S rDNA of *Bacteria* and *Archaea*, showed the presence of α -, β -, γ -, and δ - subclasses of the Proteobacteria, low GC content Gram-positive bacteria, sulfate reducing bacteria (SRB), *Bacillus* and *Clostridium*. High GC content Gram-positive bacteria were absent. The last group includes bacterial species considered as pathogens, thus the absence of this kind of bacteria is beneficial for future uses of effluents obtained of anaerobic digestion. And methanogenic *Archaea* belonging to the *Methanobacteriales* and *Methanosarcinales* orders favored the production of methane at optimal organic load.

Introducción y objetivos

INTRODUCCIÓN

La producción de etanol para combustible, uso farmacéutico, industrial y bebidas alcohólicas se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial. En el año 2009 la producción mundial alcanzó los 74 billones de litros, siendo Brasil el mayor productor seguido por Estados Unidos y China [1].

En México, el 2 de febrero de 2008 entró en vigor la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, la cual, tiene el objetivo de diversificar las fuentes de energía y crear condiciones que permitan de manera sustentable, el crecimiento económico y la protección de los ecosistemas. Debido a que la introducción de los bioenergéticos requiere de conocer los efectos de la cadena productiva en los diversos sectores, desde la producción de insumos hasta el uso de bioenergéticos, con la finalidad de establecer los procesos y tecnologías más adecuadas se propuso el desarrollo de una prueba piloto que consistió en evaluar el desempeño de la gasolina Magna, sustituyendo el oxigenante actual, Metil Tert-Butil Éter (MTBE), por etanol anhidro en un 6% de mezcla en volumen. El reporte del Instituto Mexicano del Petróleo señala que se obtuvieron resultados satisfactorios y en consecuencia se ha considerado la incorporación de etanol en las gasolinas de la zona metropolitana de Guadalajara como oxigenante para el 2011, por lo que se estima que serán necesarios 176 millones de litros, para ser mezclados con las gasolinas comercializadas. En otra etapa (2012) se introducirá el etanol como oxigenante en las zonas metropolitanas de Monterrey y del Valle de México estimándose una demanda de 626 millones de litros de etanol [2, 3].

La producción de etanol en destilerías consiste principalmente de cuatro pasos: preparación del sustrato dependiendo de la fuente de insumo, fermentación, destilación y almacenamiento [4]. Durante todo este proceso se generan grandes cantidades de residuos conocidos como vinazas. Las características de las vinazas dependen en gran medida de la materia prima utilizada para la obtención de etanol. En el caso de granos de maíz, cebada y trigo existe una gran parte de sólidos insolubles que son separados por centrifugación y mezclados con un almíbar obtenido de los sólidos solubles, esta mezcla es posteriormente secada y al producto final se le conoce como granos secos de destilación con solubles (DDGS por su abreviatura en inglés) y son utilizados en alimentación animal. Por otro lado, las vinazas que generalmente contienen una gran cantidad de sólidos solubles son obtenidas de la caña de azúcar, remolacha, uva, agave y

sorgo dulce. De este tipo de materia prima se pueden obtener entre 9 a 15 litros de aguas residuales por litro de alcohol obtenido y presentan un pH ácido (3.5-5), un color café oscuro y una Demanda Química de Oxígeno (DQO) entre 50-150 g/L [5, 6, 7]. En la literatura se encuentra que este tipo de vinazas son empleadas para fertirrigación por su contenido de nutrientes, principalmente calcio y potasio, y a su alta proporción de materia orgánica. Sin embargo, estas aguas residuales también contiene compuestos fitotóxicos, antibacteriales y recalcitrantes como son los fenoles, polifenoles y metales pesados que producen efectos negativos sobre los microorganismos y las plantas de las zonas de descarga, por lo tanto, un tratamiento de acondicionamiento de estos residuos es necesario antes de su disposición [8, 9, 10].

A la fecha, existen propuestas de tratamientos biológicos y físico-químicos para las vinazas con alto contenido de solubles, los cuales reducen su carácter contaminante al degradar las sustancias orgánicas tóxicas y transformarlas en residuos más biodegradables [5, 7, 11]. Sin embargo, debido al alto contenido orgánico de las vinazas el tratamiento anaerobio resulta ser más efectivo en comparación con los tratamientos aerobios y los físico-químicos [7, 12], por lo que, estos últimos, son empleados como pretratamientos o postratamientos de afinamiento para incrementar la reducción de DQO y color [13, 14, 15, 16] de igual forma, son aplicados como único paso de tratamiento cuando las vinazas se encuentran diluidas [15, 17, 18, 19].

Durante el tratamiento anaerobio se producen bajas cantidades de lodos, requiere de menor cantidad de nutrientes comparado con el tratamiento aerobio y una porción significativa de la DQO (>50%) puede ser convertida en biogás [12, 20]. La composición de este biogás puede variar según las características del desecho a tratar, pero típicamente consiste de 55-80% CH₄, 20-45% CO₂, trazas de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y otras impurezas [21]. Comparado con otros combustibles fósiles, el metano produce menos contaminantes atmosféricos y genera menos dióxido de carbono por unidad de energía, por lo tanto, se ha buscado incrementar su uso en vehículos, aplicaciones industriales y generación de energía eléctrica [22].

Existe una amplia variedad de reactores para llevar a cabo la digestión anaerobia, pero los principalmente utilizados en el tratamiento de vinazas son: Reactor de Película Fija (RPF), Reactor de Lecho Fluidizado (RLF) y Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL). Las principales ventajas que presenta el RANMAL con respecto a los otros reactores son: menor costo de inversión, admite altas cargas orgánicas y al no tener un

material de soporte se elimina la posibilidad de obstrucciones, ventajas que lo hacen una de las mejores opciones para el tratamiento anaerobio de las vinazas.

La digestión anaerobia está fundamentada en un complejo de microorganismos que llevan a cabo el proceso en cuatro pasos, se inicia con la hidrólisis, en la que los polímeros orgánicos complejos son hidrolizados en compuestos orgánicos solubles más simples; la acidogénesis y acetogénesis son el segundo y tercer paso respectivamente, finalizando con la metanogénesis [23]. Debido a que la interacción de los microorganismos en la producción de biogás no está claramente entendida [24], existe un gran interés en analizar la estructura y funcionamiento de las comunidades microbianas endógenas residentes en los ambientes productores de biogás. Actualmente, las comunidades microbianas son analizadas por la utilización de diversas técnicas moleculares, como la construcción de bibliotecas del gen ADNr 16S. La aplicación de estos métodos proporciona información cualitativa valiosa, incluyendo las interacciones sintróficas y competitivas entre la estructura microbiana y el desempeño del proceso [24, 25]

Por lo que en este trabajo se investigaron aspectos fundamentales y prácticos del tratamiento anaerobio de vinazas obtenidas de la producción de alcohol hidratado (96% de pureza), utilizando un Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL) consiguiendo como producto el metano, componente principal del biogás, un efluente con características potencialmente apropiadas para ser usado en la fertirrigación de cultivos y la identificación de grupos de microorganismos presentes a las condiciones óptimas de operación del reactor.

Los datos obtenidos nos proporcionarán las bases necesarias para el tratamiento de vinazas obtenidas en la producción de etanol tipo combustible, el cuál será próximamente producido en grandes cantidades en nuestro país.

Objetivos

Objetivo principal

Evaluar el desempeño de un RANMAL modificado en el tratamiento de vinazas provenientes de la producción de etanol hidratado, para la recuperación de energía en forma de metano y de un efluente con características ambientalmente más amigable.

Objetivos secundarios

1. Determinar la composición físico-química de las vinazas crudas y el efluente obtenido del RANMAL.
2. Evaluar la carga óptima del reactor por medio del rendimiento de producción de metano por kilogramo de DQO removida ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{Kg DQO}_{\text{rem}}$)
3. Identificar arqueas metanogénicas y grupos bacterianos al alcanzar las condiciones óptimas de operación en el RANMAL.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. Caracterización de vinazas de diferentes fuentes de materia prima

En la actualidad, el etanol posee diferentes usos y dependiendo de éstos su grado de pureza puede variar. En su uso como combustible se necesita un 99.9% de pureza, por otro lado, en una bebida alcohólica se encuentra en un intervalo de 5 a 40%. Las características de las vinazas a partir de un alcohol con mayor concentración son más complejas químicamente respecto a las obtenidas de una bebida alcohólica, debido a que durante el proceso de destilación de un etanol con mayor concentración, la presencia de melanoidinas, cetonas, compuestos aromáticos, ésteres, entre otros, se encuentra en las vinazas en una mayor cantidad al compararlas con las obtenidas en la producción de bebidas alcohólicas, ya que una parte de los compuestos anteriormente mencionados permanecen en las bebidas para proporcionar un mejor sabor y aroma [26].

Las características de las vinazas también son afectadas por la procedencia de la materia prima utilizada para la producción de etanol, las cuales son clasificadas en 4 principales fuentes [20, 27, 28]:

1. *Sacarosa*, una de las más atractivas, debido a que los azúcares se encuentran en una forma más simple. Éstas se encuentran en caña de azúcar, remolacha, uva y sorgo dulce.
2. *Inulina*, está formada por un polisacárido compuesto por fructosa, ésta se encuentra en varias plantas como *Agave spp.*, bardana, *Dioscorea spp.*
3. *Almidón*, en ésta los carbohidratos presentan una mayor complejidad molecular, por lo que necesitan ser transformados en azúcares más simples, introduciendo un paso adicional, con lo que se incrementan los costos de inversión y operación. Cereales como el maíz, trigo y cebada al igual que tubérculos como yuca, camote y papa forman parte de este tipo de fuente.
4. *Lignocelulosa*, son las más abundantes, sin embargo, la complejidad de sus azúcares hacen que la conversión a carbohidratos fermentables sea difícil, entre estas se encuentra la madera, residuos agrícolas y forestales.

En general, se puede encontrar en la literatura que el principal problema de las vinazas son los colorantes, los cuales presentan un tono café oscuro, debido

principalmente a la presencia de caramelos de azúcares sobrecalentados, furfurales de la hidrólisis de ácidos, melanoidinas de la reacción de Maillard de azúcares (carbohidratos) con proteínas de grupos amino y por último, compuestos fenólicos como el ácido tánico y húmico [7, 20]. Los compuestos fenólicos y las melanoidinas también son considerados compuestos tóxicos ya que pueden inhibir o reducir la actividad de los microorganismos [6, 10]; lo que representa un grave problema para las propuestas de tratamiento biológico.

A continuación se describirán las principales características de las vinazas dependiendo de la fuente de materia prima utilizada para la producción de etanol.

1.1.1. Sacarosa

Vinazas de azúcar de caña.

Los jugos frescos de la caña de azúcar tienen un alto contenido de sacarosa y no se requiere de una hidrólisis previa para la alimentación, debido a que este disacárido puede ser descompuesto por las levaduras durante el proceso de producción del etanol. De igual forma, el etanol se puede producir a partir de melazas, las cuales al igual que el jugo de caña presentan un alto contenido de sacarosa y son un subproducto de la concentración y precipitación del azúcar durante el proceso de cristalización [10, 20, 28]

Como se puede observar en la Tabla 1.1, las vinazas de melazas de caña poseen un mayor valor de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), nitrógeno, fósforo, potasio y sulfatos en comparación con las vinazas del jugo de caña, esto es debido a que la concentración de azúcar en las melazas, a través del proceso de cristalización, incrementa el contenido de compuestos orgánicos no fermentables y estos forman parte de la composición final en la vinaza [20].

La información disponible sugiere que los mayores componentes orgánicos presentes en vinazas, al utilizar cualquier tipo de sustrato rico en sacarosa son: el glicerol, etanol, ácido láctico, ácido acético, oxalato, malato y un alto contenido de compuestos fenólicos [10]. De igual forma, existe presencia de nitrógeno, el cual se origina principalmente de las células de los microorganismos y las proteínas presentes en el sustrato [20].

Vinazas de azúcar de remolacha.

Al igual que el azúcar de caña es utilizado para la producción de sacarosa y generalmente, el etanol es producido a partir de las melazas del azúcar de remolacha. Este tipo de materia prima contiene un compuesto rico en nitrógeno llamado betaína, el cual tolera temperaturas de hasta 200°C y es considerado como un compuesto difícil de degradar, por lo tanto, éste se convierte en el principal componente de las vinazas cuando se utiliza como sustrato el azúcar de remolacha [10]. Se han proporcionado datos de que las vinazas de remolacha poseen un mayor contenido de proteínas que las vinazas de azúcar de caña y los principales ácidos orgánicos presentes son: oxalato, lactato, acetato, malato y piruvato [10, 29]. Como se puede observar en la Tabla 1.1, estas vinazas presentan altas concentraciones de nitrógeno total, donde aproximadamente el 40% corresponde a nitrógeno orgánico [10, 20]. De igual forma, presentan un alto contenido de potasio y sulfatos, estos últimos debido al proceso de sulfatación usado en la producción del azúcar [29].

Vinazas de sorgo dulce.

Esta materia prima contiene dos tipos de carbohidratos, sacarosa y almidón, pero es considerado como una fuente de sacarosa debido a que la proporción que contiene es mayor que la del almidón [20]. La vinaza del sorgo dulce, posee un mayor valor biológico que el bagazo de azúcar de caña cuando es usado como alimento para animales, debido a que es rico en nutrientes y minerales. De igual forma, esta vinaza contiene niveles similares de celulosa al bagazo de azúcar de caña y por lo tanto es un buen prospecto para la obtención de pulpa [30]. Las características de este tipo de vinazas se puede observar en la Tabla 1.1.

Vinazas de uva.

Es una fuente con alto contenido de azúcar, en los pasos de fermentación y clarificación del vino, las vinazas alcanzan un alto contenido de materia orgánica (presencia de bacterias, levaduras vivas o muertas, residuos de uva) y nitrógeno total (Tabla 1.1), sin embargo, el contenido de nitrógeno total es bajo en comparación con otras

fuentes como azúcar de caña, remolacha, papa y cebada. Los niveles de potasio son elevados debido a su presencia en sales tartáricas utilizadas durante la difusión ácida de las vinazas para la producción de ácido tartárico. También presentan alto contenido de magnesio debido a sales de magnesio solubles presentes en los productos utilizados en la industria del alcohol. La concentración de manganeso en el vino está entre 1 y 3 mg/L, debido a que se encuentra en la semilla de la uva. El uso de hexacianoferrato de potasio para la eliminación de hierro en el vino genera precipitación de zinc, por lo cual, está presente en las vinazas, de igual forma, el pH ácido de las mismas hace que se favorezca la solubilidad del plomo (metal pesado) tanto en las tinas fermentadoras como en los equipos destiladores del etanol [8, 20, 31, 32].

Los ácidos orgánicos generalmente encontrados en este tipo de vinazas son: ácido láctico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético y ácido málico. Los compuestos fenólicos se encuentran entre 29 y 474 mg/L [33].

Tabla 1.1. Caracterización de vinazas de diferente fuente rica en sacarosa

Fuente	BOD (g/L)	COD (g/L)	N(total) (mg/L)	P(total) (mg/L)	K (mg/L)	S(total) SO ₄ (mg/L)	pH	Referencia
Jugo de caña	Nd	nd	102	71	1,733	nd	4.60	[34]
	16.7	30.4	628	130	1,952	1,356	4.04	[20]
Melazas de caña	Nd	nd	408	102	4,893	nd	4.80	[34]
	Nd	nd	153	1	9,073	nd	4.50	[34]
	39	84.9	1,229	187	5,124	3,478	4.46	[20]
	50	95.0	1,000	40	11,000	1,500	4.50	[35]
	39	84.9	1,230	190	5,100	3,480	4.46	[36]
Melazas de remolacha	44.9	91.1	3,569	163	10,030	3,716	5.35	[20]
	Nd	80.5	1,800	nd	nd	nd	5.20	[6]
	44.9	91.1	3,570	160	10,000	3,720	5.35	[36]
	27.5	55.5	4,750	nd	nd	3,500	4.30	[37]
Uvas (vino)	14.5	50.2	105	118	354	nd	4.20	[8]
	16.3	27.5	650	65	118	120	4.20	[32]
Uvas (cognac)	Nd	26.0	nd	nd	800	nd	3.00	[20]
Sorgo dulce	46.0	79.9	800	1990	nd	nd	4.50	[20]

nd= no disponible

1.1.2. Inulina

Vinazas de agave.

El *Agave tequilana* Weber variedad azul, es la principal fuente de materia prima

para la producción de Tequila, una de la más importantes agro-industrias productoras de etanol en México. Las vinazas producidas por esta materia prima están compuestas por sustancias que permanecen en el fondo del destilador cuando el agave fermentado debe ser destilado [38].

Estas vinazas están conformadas por pequeñas fibras de agave que no son retenidas en el paso de filtración del jugo, residuos de levadura, fructosa, glucosa, aldehídos, trazas de alcohol y elementos como calcio, sodio, magnesio, y hierro son encontrados en baja concentración [38, 39]. Otros compuestos presentes son los furanos, piranos, compuestos nitrogenados y sulfurados, metil 2-furuato, 5-hidroximetil furfural y ácidos grasos de cadena larga y corta que no son digeridos por las levaduras [38]. Se ha demostrado que las vinazas de agave poseen un menor contenido de sulfatos y potasio en comparación de las obtenidas de azúcar de caña y de remolacha, lo que las hace más fáciles de degradar (Tabla 1.2) [40].

Tabla 1.2. Caracterización de vinazas de agave

Fuente	BOD (g/L)	COD (g/L)	N(total) (mg/L)	P(total) (mg/L)	K (mg/L)	S(total) SO ₄ (mg/L)	pH	Referencia
Agave (tequila)	20.6	66.3	na	41	290	880	3.4	[40]
Agave (tequila 100%)	Na	66.3	na	na	240	875	3.4	[38]
Agave (tequila)	Na	55.2	na	na	345	780	3.4	[38]

nd= no disponible

1.1.3. Almidón

Vinazas de maíz.

Actualmente, las vinazas que se obtienen a partir del maíz se utilizan como alimento para animales como el ganado. La fracción sólida y líquida que se obtiene directamente después del proceso de destilación se le conoce como vinaza entera, la cual, está compuesta principalmente por fibra, aceite, compuestos proteicos del grano y almidón sin fermentar [41]. La vinaza entera es centrifugada para separar los sólidos insolubles presentes, obteniéndose de este proceso la “vinaza delgada” y los granos húmedos, ambas corrientes pasan por un proceso de secado obteniéndose el “almíbar” y Granos Secos de Destilación (DDG por sus siglas en inglés) respectivamente, finalmente

al combinar estas dos corrientes y ser sometidas a secado se obtienen los Granos Secos de Destilación con Solubles (DDGS por sus siglas en inglés) [41, 42, 43].

El almíbar, anteriormente mencionado, es viscoso y tiene alta osmolaridad, lo que impide que la remoción completa del agua sea difícil de llevarse a cabo por medio de equipos convencionales de secado. Éste contiene entre un 30 y 40% de materia seca, compuesta por un 40% de proteína, 15% de ceniza, 20% de grasas y el 25% restante por otros compuestos. Posee altas concentraciones de elementos, como el sodio, potasio y fósforo [42, 44].

Por otro lado, los DDGS están compuestos por grasa cruda, fibra, proteína (33% y 67% en peso de soluble y de lenta degradación respectivamente), altas concentraciones de elementos como el fósforo y potasio y un contenido de sulfuro no muy elevado (Tabla 1.3) [42]. Además, se ha observado que la mayor cantidad de nitrógeno se encuentra en aminoácidos y péptidos más que en proteínas, ya que existen altos niveles de alanina y prolina [20].

Tabla 1.3. Caracterización de vinazas de maíz

Parámetro	[44]		[45]	[42]		[43]
	DDGS (mg/Kg)	Almíbar (mg/Kg)	DDGS (mg/Kg)	DDGS (mg/Kg)	Almíbar (mg/Kg)	Almíbar (mg/Kg)
Proteína	Nd	nd	274,000	250,000	197,000	75,000
Potasio (K)	11,200	23,200	6,500	4,400	23,200	nd
Fósforo (P)	8,520	15,200	7,200	7,100	15,200	3,100
Azufre (S)	5,770	7,400	nd	3,300	7,400	nd
Nitrógeno total	Nd	nd	nd	nd	nd	12,000

nd= no disponible

Vinazas de cebada.

Al igual que las de trigo, pasan por el mismo proceso al que se somete las de maíz, es decir, se producen vinazas delgadas y granos de destilación. La vinaza de cebada tiene una gran cantidad de nitrógeno, debido al alto contenido de proteínas, que puede producir niveles inhibitorios de amonio/amoniaco en los efluentes de este tipo de destilerías; de igual forma, se ha observado que poseen una menor cantidad de proteína cruda comparada con la del trigo [20, 46]. La presencia de pentosas, beta-glucanos, cenizas y subproductos del proceso de fermentación como el glicerol y ácidos orgánicos han sido encontrados en este tipo de vinaza [47].

Como se puede observar en la Tabla 1.4, el contenido de almidón es bajo pero poseen un alto contenido de fibra [47]. Así mismo, los granos de destilación tienen un alto contenido de proteína cruda, sin embargo, ésta es menor que la presente en las vinazas delgadas [46].

Vinazas de trigo.

Los granos de destilación de trigo contienen menos del 2% de almidón, presenta mayores niveles de proteína y de fibra; pero menores contenidos de lípidos [48]. Al igual que las vinazas de cebada presentan un alto contenido de nitrógeno (4.09-8.8 g/L), debido al contenido proteico (Tabla 1.4) [36].

Tabla 1.4. Caracterización de vinazas de cebada y trigo

Parámetro (mg/Kg de MS)	[46]		[48]		[47]		
	Vinaza delgada		Granos de destilación		Granos de destilación	Vinaza delgada	Granos de destilación
	Trigo	Cebada	Trigo	Cebada	Trigo	Trigo	Cebada
Carbohidratos totales	522,000	555,000	663,000	707,000	nd	nd	nd
Fibra	352,000	367,000	739,000	700,000	363,000	163,000	362,000
Almidón	30,000	13,000	24,000	6,000	14,000	0	4,000
Proteína Cruda	366,000	308,000	275,000	201,000	452,000	223,000	240,000
Proteína Soluble (g/ Kg de PC)	237,000	174,000	40,000	36,000	nd	nd	nd

MS: Materia Seca, PC: Proteína Cruda.
nd= no disponible

1.1.4. Lignocelulosa

Las principales fuentes lignocelulósicas para la producción de etanol son la biomasa herbácea y la madera (dura y suave), al igual, que los desperdicios sólidos industriales y municipales de origen orgánico [20, 49]. Éstas están compuestas principalmente por una mezcla de carbohidratos en forma de biopolímeros (celulosa y hemicelulosa), lignina, extractivos y cenizas. La lignina, es una molécula muy compleja conformada por unidades de fenilpropano unidas en una estructura tridimensional. Generalmente las maderas suaves contienen más lignina que las maderas duras [50].

El principal residuo presente en estas vinazas es la lignina, debido a su resistencia a la degradación química y enzimática. La cantidad de ésta depende del tipo de fuente lignocelulósica empleada en el proceso de fermentación. Otros compuestos presentes son: ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), azúcar residual entre otros componentes [50]. Generalmente, las características de este tipo de vinazas son comparables a las que se obtienen de azúcar o almidón [20] con dos posibles excepciones, contener un mayor nivel de metales pesados por el proceso de hidrólisis ácida que se aplica y la presencia de inhibidores inusuales, como los extractivos (terpenos y esteroides, grasas y componentes inorgánicos) y compuestos fenólicos presentes en la fuente de alimentación [50].

1.2. Propuestas de tratamiento para vinazas

Desde los comienzos de los 70's, estos residuos han sido directamente depositados sobre suelos debido a que poseen un cierto valor como fertilizante, sin embargo, el aumento de la carga orgánica, la putrefacción y los malos olores producidos son los principales problemas que se generan al realizar esta práctica. Además, recientes investigaciones han demostrado que la disposición directa al suelo provoca contaminación de las aguas subterráneas [33].

Las diferentes tecnologías que han sido exploradas para reducir las características contaminantes de las vinazas se clasifican en dos principales grupos, los tratamientos biológicos y los físico-químicos (Tabla 1.5).

Los tratamientos biológicos consisten en la introducción de microorganismos que utilizan los compuestos orgánicos presentes como sustrato y de esta forma reducir el aspecto contaminante. Estos tratamientos pueden ser clasificados dependiendo del tipo de microorganismo utilizado como aerobios o anaerobios, siendo aerobios los microorganismos que necesitan de oxígeno para su crecimiento y los anaerobios los que crecen en ausencia del mismo. El alto contenido orgánico de las vinazas hace al tratamiento anaerobio más atractivo en comparación con el tratamiento aerobio [7, 12], además de que este último necesita un insumo de energía para la aireación y el 50% de la DQO se transforma en lodo. Mientras que en la digestión anaerobia una porción significativa de la DQO (>50%) puede ser transformada en una fuente de energía

renovable (biogás), la producción de lodo es baja y requiere menor cantidad de nutrientes [12, 20].

Por otro lado, los tratamientos físico-químicos generalmente utilizan diversos reactivos para oxidar los contaminantes orgánicos presentes [20]. Éstos al igual, que el tratamiento aerobio son empleados como pretratamientos o postratamientos de afinamiento para incrementar la reducción de DQO y color [13, 14, 15, 16] de igual forma, pueden ser aplicados como único paso de tratamiento cuando las vinazas se encuentran diluidas [15, 17, 18, 19].

Tabla 1.5. Diferentes opciones de tratamiento para vinazas

Tratamientos	vinaza	%remoción DQO	%remoción color	Referencia	
Anaerobio	RANMAL Lecho fijo Lecho fluidizado	Concentrada	60-82.5	dg	[14, 51, 52, 53]
Aerobio	Bacteriano	Pretratamiento anaerobio	46-77.4	7.33-91.2	[54, 55, 56]
	Fúngico	Diluida	99	48-86.33	[17, 57, 58]
	Cultivo mixto	Pretratamiento Anaerobio	51	67	[14]
	Algas	Diluida	61	52-60	[7, 59, 60]
Físico-químico	Absorción	Pretratamiento Anaerobio	76-88	93-95	[61]
	Coagulación-floculación	Pretratamiento Anaerobio	74	87	[5, 62]
	Ozonización	Diluida	27-62	35-87	[19, 63]
	Oxidación electroquímica	Diluida	40-92	83-99	[15, 18, 64]
	Electrocoagulación	Diluida	63-76	98-99	[16, 65]

dg: difícil de degradar

1.3. Conceptos básicos de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia es el proceso de descomposición de materia orgánica por un consorcio de microorganismos en un ambiente libre de oxígeno [66]. El esquema general de la conversión de los sustratos orgánicos a metano está indicado en la figura 1.1. y consta de cuatro etapas:

1. Hidrólisis. En esta etapa los biopolímeros como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y grasas son inicialmente hidrolizados, por enzimas extracelulares segregadas por microorganismos hidrolíticos, a unidades más pequeñas como

carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. Dependiendo de la estructura de la pared celular de los microorganismos, las enzimas tienen diferentes localizaciones y éstas a su vez tienen un impacto sobre la degradación del sustrato [67, 68].

2. **Acidogénesis.** Los aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos de cadena larga son utilizados por organismos fermentativos o por anaerobios oxidativos. Los productos carbónicos de estas reacciones son acetato, hidrógeno o compuestos intermediarios, como el propionato y butirato, los cuales después serán convertidos a acetato e hidrógeno [67, 69].

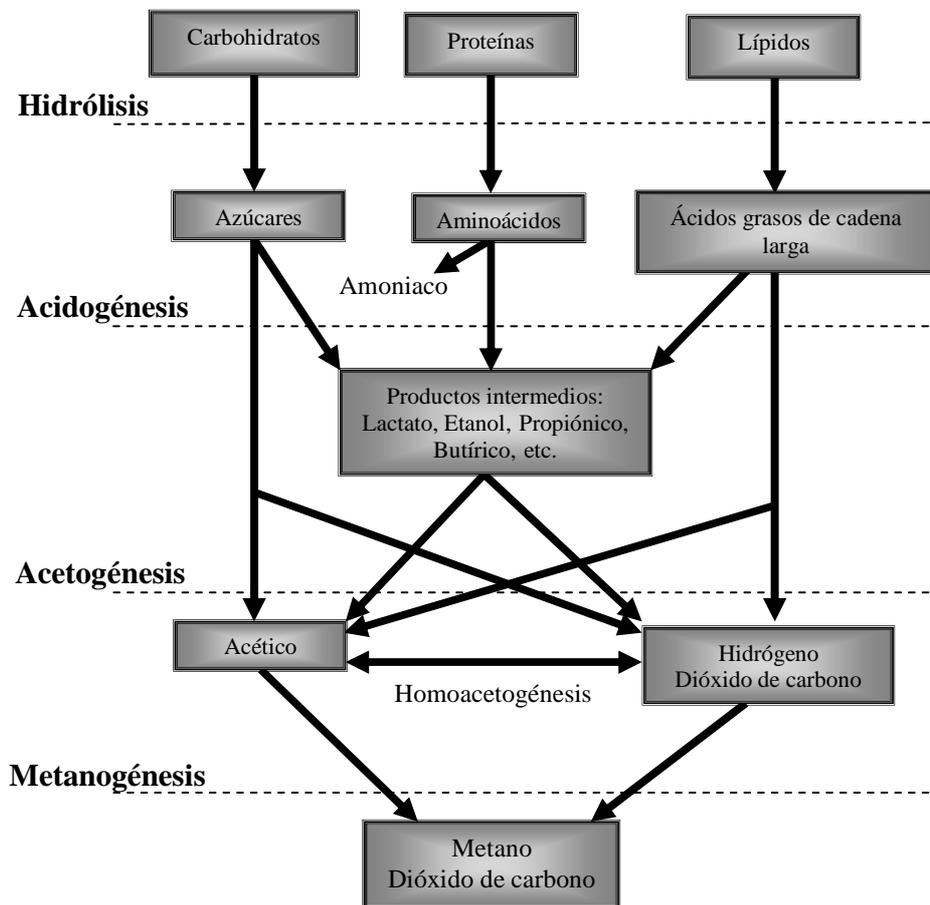


Figura 1.1. Representación esquemática simplificada de la digestión anaerobia [70].

3. Acetogénesis. El acetato es uno de los intermediarios más importantes en la digestión anaerobia, durante esta etapa las bacterias fermentativas, acetogénicas sintróficas y homoacetogénicas son las principales contribuidoras para su producción. Las bacterias fermentativas y las acetogénicas sintróficas convierten los ácidos grasos en acetato, biogás (H_2 y CO_2) y otros subproductos, mientras que las homoacetogénicas pueden utilizar H_2 y CO_2 para producir acetato (Tabla 1.6). La acumulación de H_2 disuelto en el líquido o altas presión parcial de H_2 puede alterar el flujo de electrones en las rutas bioquímicas de los microorganismos y llegar a inhibir la fermentación y acetogénesis [67, 71, 72]

Tabla 1.6. Estequiometría de reacciones acetogénicas [72, 73, 74, 75]

<i>Reacciones acetogénicas sintróficas:</i>	
1	Propionato $C_2H_5COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$
2	Butirato $C_3H_7COO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
3	Propionato $C_2H_5COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + 3CHOO^- + H^+$
4	Butirato $C_3H_7COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CHOO^- + H^+$
5	Ácido propiónico $C_2H_5COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$
6	Ácido butírico $C_3H_7COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$
7	Ácido butírico $2C_3H_7COOH + CO_2 + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 4CH_3COOH$
8	Glucosa $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
9	<i>Homoacetogénesis:</i> $2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$

4. Metanogénesis. Los metanógenos son microorganismos anaerobios estrictos los cuales producen metano como parte de su metabolismo energético. En 1990, se propuso el Dominio *Archaea* para éstos, debido a sus propiedades únicas [76]. La lista de sustratos para su crecimiento puede ser dividida en tres grupos (Tabla 1.7). En el primer grupo, el donador de electrones es H_2 , formato ($CHOO^-$) o algunos alcoholes y el aceptor de electrones es CO_2 , el cuál es reducido a metano. A los microorganismos metanógenos capaces de utilizar al H_2 como un donador de electrones para reducir al CO_2 se le conocen como hidrogenotróficos [67, 76, 77, 78]. El formato también puede ser un sustrato importante, aunque su concentración en ambientes metanogénicos es

bajo, debido a que es rápidamente producido y consumido [67]. En el segundo grupo, el sustrato es una variedad de compuestos que contienen grupos metilos, los cuales son reducidos a metano [66, 77]. Finalmente, en el tercer grupo, la síntesis de metano procede de una reacción acetoclástica, en la cual el carbono metil del acetato es reducido a metano y el carbono carboxil es oxidado a CO₂, la capacidad de catabolizar este sustrato está limitado a las especies *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (“*Methanothrix*”) [77].

Tabla 1.7. Estequiometría de reacciones metanogénicas [67, 77]

	<i>Primer grupo:</i>
1	Hidrógeno $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
2	Formato $4CH_3COO^- \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$
3	2-Propanol $4C_3H_7OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 4C_3H_6O + 2H_2O$
4	Etanol $C_2H_5OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COO^-$
5	Metanol $CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$
6	Metanol $4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$
	<i>Segundo grupo</i>
7	Metilamina $4CH_3NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4^+$
8	Dimetilamina $2(CH_3)_2NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4^+$
9	Trimetilamina $4(CH_3)_3N + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_4^+$
10	Dimetilsulfuro $2(CH_3)_2S + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2S$
	<i>Tercer grupo</i>
11	Acetato $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$

La conversión del acetato a metano por las poblaciones metanogénicas es el paso limitante en la producción de biogás, debido a que los microorganismos metanógenos poseen una baja velocidad de crecimiento, que da como resultado un tamaño de población relativamente bajo [78]. Se ha mostrado que a condiciones normales, cerca del 70% del metano es formado por los metanógenos acetoclásticos y el 30% restante por los hidrogenotróficos [23, 67]. La clasificación de las arqueas metanogénicas y algunas características de sus familias se encuentran en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8. Clasificación de arqueas metanogénicas y algunas características [67,77]

Orden	Familia	Género	Características
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	- Bacilos largos o cortos, los cuales usan H ₂ + CO ₂ , algunas veces formato y algunos alcoholes como sustrato.
		<i>Methanobrevibacter</i>	- Cocos, los cuales usan solamente H ₂ + metanol.
		<i>Methanosphaera</i>	- Gram-positivas.
		<i>Methanothermobacter</i>	- Contienen pseudomureina.
	Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i>	- Bacilos, los cuales usan H ₂ + CO ₂ como sustrato. - Gram-positivas. - Contienen pseudomureina. - Hipertermófilos.
Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanococcus</i>	- Cocos irregulares, los cuales usan H ₂ + CO ₂ , y formato como sustrato.
		<i>Methanothermococcus</i>	- Gram-negativas.
		<i>Methanocaldococcus</i>	- Cocos irregulares, los cuales usan H ₂ + CO ₂ , y formato como sustrato.
		<i>Methanotorris</i>	- Gram-negativas. - Hipertermófilos.
Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i>	- Bacilos, placas o cocos irregulares, los cuales usan H ₂ + CO ₂ , frecuentemente formato y algunos alcoholes como sustrato.
		<i>Methanoculleus</i>	- Gram-negativas.
		<i>Methanofollis</i>	
		<i>Methanogenium</i>	
		<i>Methanolacinia</i>	
		<i>Methanoplanus</i>	
		<i>Methanocorpusculum</i>	
Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	- Cocos pequeños e irregulares, los cuales usan H ₂ + CO ₂ , formato, y algunos alcoholes como sustrato.
		<i>Methanospirillum</i>	- Gram-negativas. - Células en forma de espiral, las cuales usan H ₂ + CO ₂ y formato como sustrato. Algunas cepas también usan 2-propanol y 2-butanol. - Gram-negativas.
Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	- Pseudosarcina o cocos irregulares, los cuales usan acetato, algunas veces H ₂ + CO ₂ , compuesto metilado como sustrato. El formato nunca es utilizado.
		<i>Methanococcoides</i>	
		<i>Methanohalobium</i>	
		<i>Methanohalophilus</i>	
		<i>Methanobus</i>	- Gram-negativas o positivas.
		<i>Methanomethylovorans</i>	
		<i>Methanomicrococcus</i>	
Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosalsum</i>	
		<i>Methanoseta</i>	
		<i>(Methanotherix)</i>	
Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosalsum</i>	
		<i>Methanoseta</i>	- Bacilos recubiertos, los cuales usan acetato, como único sustrato. - Gram-negativas.

1.4. Factores que afectan la digestión anaerobia

1.4.1. Temperatura

Tiene un importante efecto sobre las propiedades físico-químicas de los componentes encontrados en la digestión del sustrato, de igual forma, domina sobre la velocidad de crecimiento y metabolismo de los microorganismos [79, 80]. La digestión anaerobia puede ser realizada en 3 intervalos de temperatura: psicrófila (10-20°C), mesófila (25-45°C) o termófila (45-65°C) [81].

Varios estudios afirman que a condiciones termofílicas se presentan diferentes beneficios, entre los cuales se encuentran: incremento en la solubilidad de los compuestos orgánicos, mejora en velocidad de reacción biológica y química e incremento en la tasa de muerte de patógenos [79, 82]. Por otro lado, Dinsdale *et al.* [83], encontraron que en el tratamiento anaerobio de un agua residual, proveniente de la producción de café instantáneo, a condiciones mesofílicas existe un mayor porcentaje de remoción de materia orgánica al compararse con condiciones termofílicas. Una desventaja que presenta las condiciones termofílicas es que al aplicar altas temperaturas se incrementa el nitrógeno amoniacal libre, el cual es inhibitorio para los microorganismos [79], se ha mostrado que una reducción en la temperatura de 55 a 46°C durante la digestión anaerobia, proporciona un incremento en el rendimiento de biogás en reactores con alto contenido de nitrógeno amoniacal [82].

A condiciones psicrófilas, el crecimiento máximo específico y la tasa de utilización de sustrato decrece, las reacciones biológicas y químicas ocurren a una velocidad menor que a condiciones mesofílicas. Se ha demostrado que a bajas temperaturas la producción de biogás, la actividad metanogénica y la composición de la comunidad microbiana se ven afectados [80, 84].

1.4.2. pH y alcalinidad

Dentro de la digestión anaerobia se encuentran diferentes especies de microorganismos y cada una tiene un intervalo de pH, en el cual su crecimiento es mejor y la función de sus procesos metabólicos se encuentra a un nivel óptimo [85]. Las arqueas metanogénicas son extremadamente sensibles al pH, encontrándose su valor óptimo

entre 6.5 y 7.2, por otro lado, las bacterias fermentativas son menos sensibles y pueden funcionar en un intervalo más amplio entre 4.0 y 8.5 [79]. Como se indicó anteriormente, el grupo limitante para la producción de biogás son las metanogénicas acetoclásticas, por lo que es necesario asegurar la neutralidad del pH para una operación y control exitoso de la digestión anaerobia [86].

Dos factores asociados con el pH son la alcalinidad del sistema y la producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs). Durante la producción de AGVs en la digestión anaerobia el pH tiende a disminuir. Esta reducción puede ser controlada por la actividad de microorganismos metanógenos, los cuáles producen compuestos con capacidad buffer como: dióxido de carbono, amonio y bicarbonato [79]. La alcalinidad en un digester anaerobio es una medida de esta capacidad buffer dentro del contenido en el reactor. Una alcalinidad alta puede ser un indicador de que el sistema está seguro contra fluctuaciones de pH, mientras que una alcalinidad baja indica que un incremento repentino en la concentración de AGVs puede disminuir el pH e inhibir a los microorganismos [85]. Esta alcalinidad puede incrementarse con la adición de buffers comerciales como: carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, entre otros [86].

1.4.3. Toxicidad

Una amplia variedad de sustancias que inhiben el crecimiento microbiano o producen otro efecto negativo sobre la digestión anaerobia, como la disminución de producción de metano y la acumulación de ácidos grasos, han sido indicadas en estudios previos. Existe una gran variación en los niveles de inhibición/toxicidad, debido principalmente a la complejidad del proceso de digestión anaerobia, donde mecanismos como el antagonismo, el sinergismo y la aclimatación pueden afectar significativamente el efecto de inhibición [87].

A continuación se discuten algunos efectos tóxicos comunes en la digestión anaerobia.

Ácidos grasos volátiles (AGVs)

Es bien conocido, que cuando los AGVs son acumulados, el proceso de digestión

puede llegar a una total inhibición. Existe controversia sobre la concentración permisible de éstos en un digestor, sin embargo, se puede asumir que un incremento en la concentración de los mismos será un indicador de la posible falla del proceso como resultado de condiciones no balanceadas [85].

Se ha demostrado que los AGVs poseen efectos negativos a bajas concentraciones sobre microorganismos gram positivos pero no para microorganismos gram negativos. Las arqueas metanogénicas pueden ser afectadas debido a su pared celular, la cual es similar a la de las bacterias gram positivas. Los AGVs muestran una fuerte toxicidad hacia el consorcio anaerobio debido a su adsorción sobre la pared celular, lo cual interfiere con el transporte o su función protectora, además de tender a formar una capa flotante con el lodo, lo que trae como consecuencia un lavado del mismo [70, 87, 88].

Varias sustancias, como la albúmina, el almidón, los ácidos biliares y el colesterol, pueden reducir el efecto de toxicidad, debido a la formación de complejos o adsorbentes que compiten en la pared celular. La bentonita y el calcio también son sustancias que pueden prevenir la inhibición. La bentonita debido a su capacidad floculante y el calcio debido a su capacidad de formar precipitados e incrementar la tensión superficial [70].

Nitrógeno amoniacal

Es producido durante la degradación de la materia nitrogenada, principalmente proteínas y urea. El amonio (NH_4^+) y el amoniaco libre (NH_3) son las dos formas predominantes de nitrógeno inorgánico presente durante la digestión anaerobia. Se ha indicado que el amoniaco libre es el más tóxico de ambos, debido a que éste puede pasar a través de la membrana celular de los microorganismos, causando un desbalance de protones y deficiencia de potasio [79, 87].

Estudios han mostrado efectos inhibitorios del NH_3 sobre el metabolismo de microorganismos metanógenos. Al añadir amoniaco a un digestor, el pH se incrementa hasta alcanzar un equilibrio químico. Sin embargo, como el amoniaco inhibe al metabolismo de los metanógenos, los AGVs son acumulados resultando en la disminución del pH. Si la alcalinidad dentro del digestor es adecuada, ésta tiende a estabilizar el proceso de digestión a cierta concentración de AGVs y pH. Con una

alcalinidad insuficiente, el digestor tiende a acidificarse, deteniéndose de esta forma la producción de metano [89].

Se cree que concentraciones cercanas a los 200 mg/L de amoníaco son benéficas para el proceso de digestión anaerobia, debido a que el nitrógeno es un nutriente esencial para los microorganismos anaerobios. Un intervalo amplio de concentraciones de amoníaco para la inhibición ha sido indicado en la literatura. La concentración de Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) para una reducción del 50% en la producción de metano se encuentra en el intervalo de 1,700 a 14,000 mg/L. La diferencia entre estas concentraciones puede ser atribuida a la variedad entre sustratos e inóculo, condiciones ambientales (temperatura y pH), y períodos de aclimatación (adaptación de los microorganismos metanógenos a altas concentraciones de amoníaco) [87].

Sulfuro

El sulfato es comúnmente encontrado en muchas aguas residuales. Bajo condiciones anaerobias, es utilizado como un aceptor de electrones y como consecuencia es reducido a sulfuro por Bacterias Reductoras de Sulfato (BRS) [87]. Dos etapas de inhibición existen como resultado de la reducción del sulfato: inhibición primaria debido a la competencia por sustratos orgánicos o inorgánicos, lo que disminuye la producción de metano; inhibición secundaria, la cual resulta de la toxicidad del sulfuro a varios grupos microbianos [79, 87].

La reducción del sulfato es realizado por dos grupos de BRS por medio de oxidación incompleta, las cuales reducen los compuestos a acetato y CO_2 , y por oxidación completa, en la cual se convierte el acetato a CO_2 y HCO_3^- , durante ambos procesos se produce el sulfuro de hidrógeno [87, 90, 91].

Las BRS pueden metabolizar un gran número de sustratos como, alcoholes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y ácidos grasos de cadena larga. De igual forma, compiten con las bacterias fermentativas, acetogénicas o arqueas metanogénicas por acetato, H_2 , propionato y butirato. Normalmente, la inhibición a través de la competencia no ocurre en la primera etapa de la digestión debido a que las BRS no son capaces de degradar biopolímeros, por lo tanto, dependen de microorganismos fermentativos para degradar estos compuestos y metabolizar los productos de la degradación. Por otro lado, los microorganismos acetogénicos y metanogénicos son

afectados por la presencia de BRS debido a que compiten por los mismos productos de fermentación [79]. El sulfuro de hidrógeno puede interferir con el metabolismo de asimilación de sulfuro afectando el pH intracelular. En sistemas anaerobios, metanógenos y bacterias sintróficas que degradan propionato son generalmente más sensibles a la inhibición por sulfuro. Los valores de concentración de sulfuro para que ocurra inhibición sobre metanógenos están generalmente dentro del intervalo de 30 a 250 mg/L [92].

1.5. Ventajas y desventajas del tratamiento anaerobio

La digestión anaerobia presenta varias ventajas con respecto a otros tipos de tratamiento de residuos orgánicos, entre las que se encuentran [21, 23, 93]:

- *Alta eficiencia.* Buenas eficiencias de remoción son alcanzadas en estos sistemas, incluso a altas cargas orgánicas y bajas temperaturas.
- *Simplicidad.* La construcción y operación de reactores para digestión anaerobia son relativamente simples.
- *Flexibilidad.* El tratamiento anaerobio puede fácilmente ser aplicado a pequeña o gran escala.
- *Bajo requerimiento de espacio.* Los espacios son menores comparados con los sistemas convencionales.
- *Baja producción de lodo.* La cantidad es baja en comparación con las tecnologías de tratamiento aerobio, debido a las velocidades de crecimiento de los metanógenos. Además, este lodo puede ser preservado por largos períodos de tiempo sin una reducción significativa en su actividad, por lo que, puede ser utilizado como inóculo para la puesta en marcha de nuevos reactores.
- *Bajo consumo de energía.* A menos que el influente del reactor requiera ser calentado, el consumo de energía es mínimo. La recuperación de energía es producida durante el proceso de digestión anaerobia en forma de biogás, el cual está compuesto por 55-80% CH₄, 20-45% CO₂, trazas de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y otras impurezas, sus propiedades físicas y químicas son semejantes a las del gas natural; por lo tanto, puede ser utilizado para procesos de calentamiento, iluminación, producción de energía eléctrica y remplazar al diesel o la gasolina en vehículos de transporte (Figura 1.2).

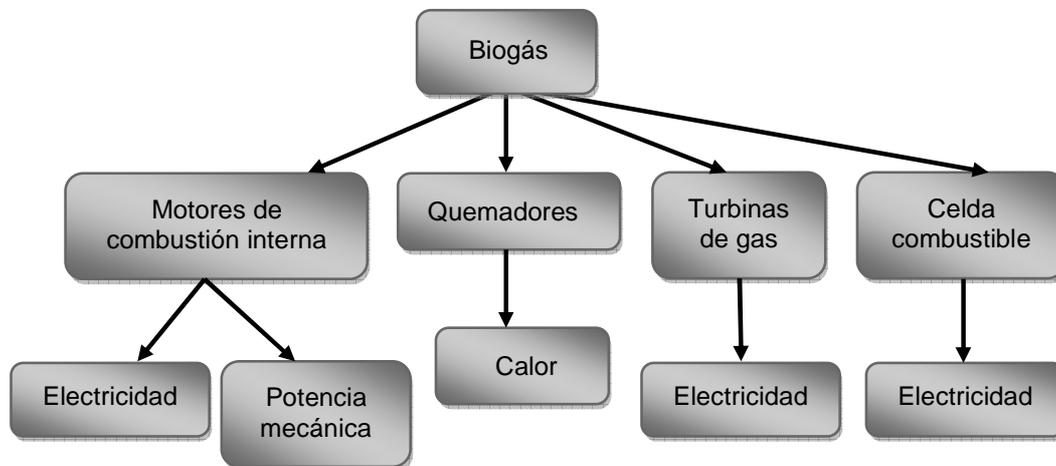


Figura 1.2. Principales usos del metano [21]

Entre las principales desventajas se encuentran [93]:

- *Baja remoción de patógenos y nutrientes.* Los patógenos son parcialmente removidos al igual que los nutrientes y por lo tanto un tratamiento de afinamiento es necesario.
- *Posible largo período de arranque.* Cuando no hay un buen inóculo disponible, el arranque de un reactor anaerobio puede requerir más tiempo que el arranque de un aerobio, debido principalmente a la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos metanógenos.
- *Posibles malos olores.* El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es producido durante el proceso anaerobio, especialmente cuando existe una alta concentración de sulfato en el influente, por lo que se requiere de un manejo apropiado del biogás para evitar malos olores.

1.6. Bioreactores anaerobios para el tratamiento de vinazas

En la actualidad existe una gran variedad de reactores anaerobios para el tratamiento de vinazas. A continuación se presentan los más comunes.

1.6.1. Reactor de película fija (RPF)

También es conocido como de lecho fijo, consiste en la inmovilización de microorganismos sobre un soporte inerte para limitar la pérdida de biomasa e incrementar la actividad microbiana por unidad de volumen de reactor (Fig. 1.3). Como consecuencia se puede obtener una mayor remoción de DQO a menores Tiempos de Retención Hidráulico (TRH) y mejor tolerancia a cargas orgánicas tóxicas [4, 12]. El soporte inerte o empaquetado dentro del reactor proporciona una mayor área de superficie de contacto para el crecimiento microbiano. El influente pasa a través del medio y los microorganismos anaerobios se fijan por si mismos creando una capa delgada de bacterias anaerobias llamada biopelícula, la cual le da al digestor su nombre [94, 95]. En estos reactores se han empleado una gran variedad de materiales de soporte entre los que se encuentran: poliuretano, cerámica, carbón activado granular, cloruro de polivinilo y medio plástico [4, 12]. Algunas características importantes para estos materiales son la alta porosidad, gran área superficial, propiedades de superficie adecuadas para la adherencia de pesos ligeros y la economía [51]. El carbón activado granular como medio de soporte es relativamente caro, pero debido a sus propiedades adsorbentes contribuyen a incrementar la estabilidad del proceso [12].

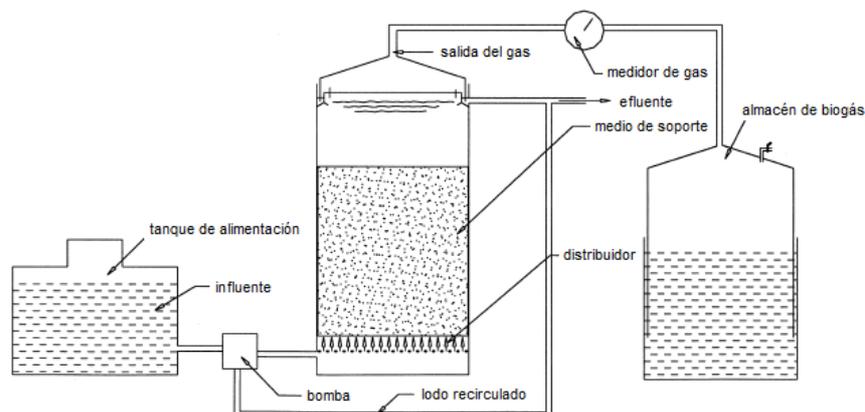


Figura 1.3. Esquema del reactor de película fija [96]

Bhavik *et al.* [51] investigaron tres tipos de empaque (carbón, fibra de coco y fibra de nylon), con el fin de identificar el que permita mantener la mayor biomasa bacteriana

dentro del reactor y por lo tanto mejorar la eficiencia de biodegradación de vinazas. Los resultados demostraron que el empaque realizado con fibra de coco presenta una mayor estabilidad en el reactor, obteniendo una remoción de DQO de 60% y una producción de 7.25 m³ de biogás por m³ de reactor al día (m³/m³-día) al aplicar una carga orgánica de 23.25 Kg DQO/ m³-día. El empaque de carbón con esta misma carga obtuvo una remoción de DQO del 16% y una producción de biogás de 0.5 m³/m³-día; mientras que el empaque de nylon no mostró una reducción apreciable de DQO y la producción del biogás fue de 0.2 m³/m³-día; con lo que se puede concluir que la fibra de nylon y carbón como materiales de empaque no son capaces de soportar altas cargas orgánicas.

Bories y Ranyal [52] investigaron el comportamiento de un reactor de película fija a escala laboratorio para el tratamiento de vinazas de caña de azúcar, operándolo por 220 días e incrementando la carga orgánica hasta 20 Kg DQO/m³-día. Se observó que la remoción de DQO fue de 71 a 73.8% a una carga orgánica de 11.4 Kg DQO/m³-día y ésta decreció a 61.9 % al aumentarla a 20.4 Kg DQO/m³-día.

Cho *et al.* [97] estudiaron el efecto de la forma de inoculación sobre el desempeño de un reactor de lecho fijo para el tratamiento de vinazas sintéticas. Realizaron una división de un inóculo inicial de 1.7 L en 1, 2, 3 y 4 inoculaciones, obteniéndose una producción de biogás de 0.4-0.6, 0.5-0.8, 0.7-1.0 y 0.8-1.1 L/día y una eficiencia final de remoción de DQO de 66.5, 84.2, 90.4 y 94.2% respectivamente. Con lo que concluyeron que tanto la eficiencia de producción de biogás como la de remoción de DQO aumentan directamente con el número de inoculaciones realizadas al reactor.

En un estudio comparativo entre un reactor de película fija y un Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL) para el tratamiento de vinazas, se observó que cuando la carga orgánica se encontraba por arriba de los 9.5 Kg DQO/m³-día, la eficiencia de remoción de la misma decreció de manera lenta en el reactor de película fija y de manera rápida en el RANMAL, debido a que el RANMAL perdió más fácilmente a los microorganismos comparado con el reactor de película fija [98].

1.6.2. Reactor de lecho fluidizado (RLF)

Consiste de un recipiente vertical que contiene un medio inorgánico (roca, arena, carbón activado, resinas de intercambio aniónico o catiónico). En este tipo de reactor el

medio inorgánico se encuentra de forma fluidizada, con el objetivo de inducir una inmovilización celular y por lo tanto mantener una mayor cantidad de biomasa en el reactor e incrementar el tiempo de residencia celular [4, 12]. El residuo a tratar puede pasar de modo ascendente o descendente sobre la población de microorganismos que se encuentran en los espacios dentro de los transportadores y sobre la superficie. (Fig. 1.4) [94, 95].

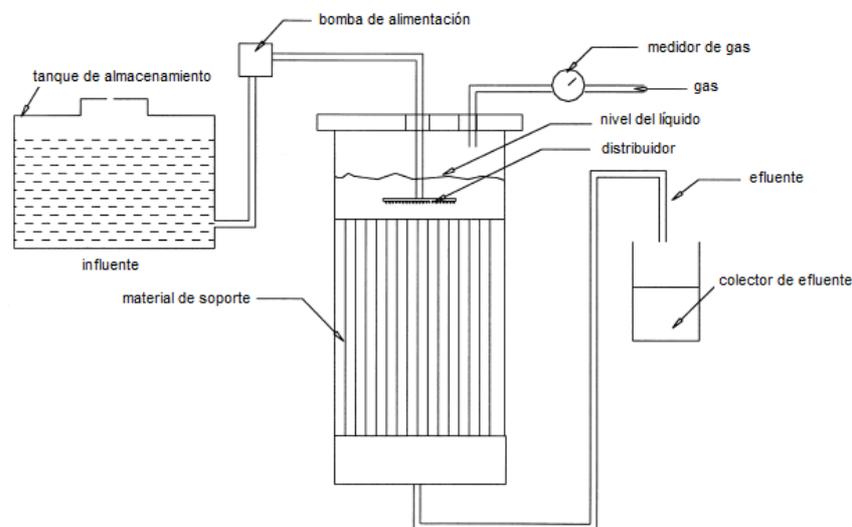


Figura 1.4. Esquema del reactor de lecho fluidizado [92]

Fernández *et al.* [99] demostraron que la carga orgánica y el nivel de fluidización tienen una fuerte influencia sobre la remoción de DQO y por lo tanto con la tasa de producción de metano, también observaron que la remoción de DQO fue mayor cuando el diámetro del material de soporte era mayor.

El tratamiento de vinazas en reactores de lecho fluidizado a condiciones termofílicas ha sido investigado, en estos sistemas se puede alcanzar una reducción de DQO mayor a 82.5%, carga orgánica de 32.3 Kg DQO/m³-día correspondiente a un TRH de 0.46 días [14].

En un estudio comparativo, para el tratamiento de vinazas de uva, entre un reactor de película fija y uno de lecho empacado, se obtuvo que la tecnología de éste último es más efectiva, debido fundamentalmente a que favorece el transporte de los microorganismos en el volumen del reactor, por lo tanto aumenta el contacto entre los microorganismos y el sustrato [100].

1.6.3. Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL)

El RANMAL es el digestor más popular de alta tasa de velocidad que ha sido utilizado para el tratamiento de varios tipos de residuos, debido principalmente a las siguientes ventajas [7, 96]:

- Este tipo de tecnología requiere menor inversión cuando es comparada con un sistema de película fija o de lecho empacado.
- Las fermentaciones ácidas, metanogénesis y la sedimentación tienen lugar en el mismo tanque, por lo que los sistemas de tratamiento son muy compactos.
- No existe un empaque de relleno, por lo tanto se elimina la posibilidad de obstrucciones.
- El consumo de potencia es baja, debido a que se puede utilizar el biogás producido para cubrir con los requerimientos energéticos del sistema.

El éxito del RANMAL se debe a la estabilización de una cama de lodos densa en el fondo del reactor, en la cual los procesos biológicos se llevan a cabo. Este lodo se forma básicamente por la acumulación de sólidos suspendidos y el crecimiento microbiano [93]. Otra característica de este tipo de reactor es la presencia de un separador sólido-gas (Fig. 1.5), el cual tiene la función de retener el lodo anaerobio dentro del reactor [96].

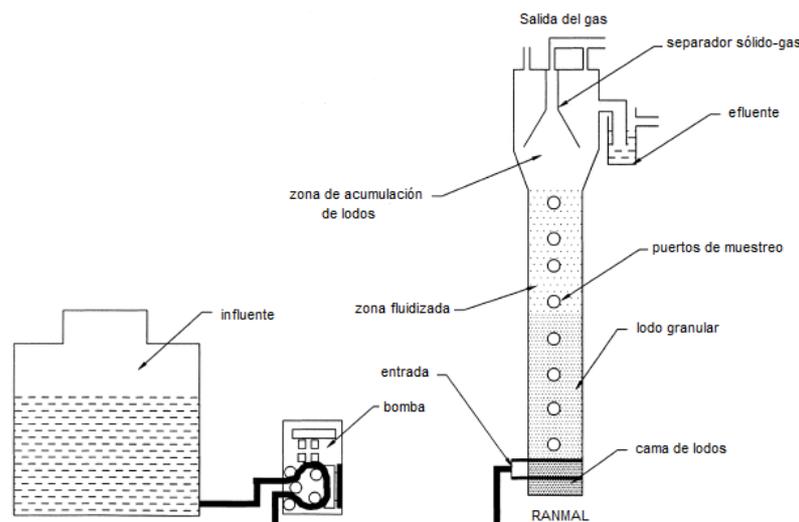


Figura 1.5. Esquema del Reactor Anaerobio de Manto de Lodos [96]

La cantidad y la actividad de la población metanogénica son muy importantes para incrementar la capacidad de proceso del RANMAL. Por lo tanto, un nivel adecuado de retención de microorganismos metanógenos en el reactor proporcionará un buen comportamiento del digestor en términos de remoción de DQO y eficiencia de metano, además de una mayor calidad del efluente [101]. Una forma para incrementar el tiempo de retención celular en este tipo de reactores es mediante la formación de lodo granular. Estos gránulos son biopelículas esféricas (Fig. 1.6) desarrolladas por la auto-agregación de las células microbianas presentes en el reactor. Con la presencia de lodo granular el reactor es capaz de soportar mayores cargas orgánicas [102, 103]. Se ha observado que cuando los gránulos poseen un diámetro entre 1-5 mm el reactor RANMAL puede soportar cargas orgánicas por arriba de los 40 Kg DQO/m³-día, sin embargo, el control del tamaño del gránulo dentro del reactor es muy difícil, además de que la formación del gránulo es afectada por el cambio en la calidad del influente al reactor [104].



Figura 1.6. Gránulos Anaerobios de un reactor RANMAL [103]

Harada *et al.* [53], trabajaron con el tratamiento de vinazas diluidas (10 g DQO/L) utilizando una carga orgánica de 28 Kg DQO/m³-día en un reactor RANMAL operado de forma termofílica, obteniendo una remoción de DQO entre 39-67%, mayor de 80% para la remoción de DBO y una producción de metano de 0.29 m³ /Kg DQO_{rem}; durante este estudio se pudo observar que el lodo es capaz de adquirir mayor actividad en degradar las vinazas después de un largo período de aclimatación.

Las vinazas de la destilación de whisky fueron tratadas usando un digestor RANMAL operado a temperatura mesofílica, el reactor se desestabilizó a cargas mayores de 15 Kg DQO/m³-día cuando las vinazas no fueron diluidas y a una carga de 12 DQO/m³-día alcanzaron un remoción de DQO de aproximadamente 90% [105].

Uzal *et al.* [106] investigaron el efecto de administrar y suprimir nutrientes sobre el potencial de producción de metano a partir de vinazas de whisky. Se observó que la producción de biogás no fue afectada, ya que ésta se mantuvo en un valor constante de 0.020 m³/Kg DQO_{rem}. Además se presenció una disminución en la calidad del efluente a una concentración de DQO de 20.92 g/L en el influente, debido a la reducción de la actividad metabólica por los efectos tóxicos de la vinaza sobre la biomasa granular.

La tecnología de Manto de Lodo Granular Expandido (MLGE), es una forma modificada de RANMAL en donde una mayor velocidad de líquido superficial es aplicado (5-10 m/h). Debido a las altas velocidades de ascensión una parte significativa del manto de lodo granular se encontrará expandido o en estado fluidizado en las regiones más altas del mismo, ocasionando un mejor contacto entre el residuo y el lodo [14, 96]. El tratamiento anaerobio de vinazas de bebidas alcohólicas, fue investigado en un reactor MLGE a escala piloto a 20°C y con un volumen de 225.5 L. La eficiencia de remoción de la DQO estuvo por arriba del 80% a una carga orgánica de 12.6 Kg DQO/m³-día. Los valores de TRH y velocidad de ascensión de líquido aplicados fueron 2.1 a 1.2 h, y 4.4 a 7.2 m/h respectivamente [14].

También pueden existir reactores híbridos, que resultan de la combinación de dos tipos de sistemas en un solo reactor. Un estudio a escala laboratorio de un reactor híbrido, combinando un RANMAL y un RPF, fue operado de forma continua para la biodegradación de vinazas. Este estudio mostró que a un TRH de 5 días y una carga orgánica de 8.7 Kg DQO/m³-día, la eficiencia de remoción de DQO fue del 79% alcanzando una producción de metano de 0.34 m³/Kg DQO_{rem} [107]. En la Tabla 1.9 se compara el desempeño de cada uno de los reactores utilizados para el tratamiento de vinazas, en términos de remoción de DQO y producción de metano.

Tabla 1.9. Datos de literatura del tratamiento anaerobio de vinazas

Origen de Vinaza	Reactor	Carga orgánica (Kg DQO/m ³ -día)	TRH (días)	DQOrem (%)	Producción metano (m ³ CH ₄ / Kg DQO _{rem})	Referencia
Vinaza	RANMAL	28.00	2.80	67.0	0.29	[53]
Cerveza	RANMAL	0.48	5.00	50.0	0.31	[108]
	RANMAL	0.75	3.00	83.0	0.33	[108]
	RANMAL	1.53	0.75	91.0	0.32	[108]
	RANMAL	2.91	0.50	85.0	0.34	[108]
Whisky	RANMAL	15.00	2.10	90.0	nd	[4]
	RANMAL	5.46	2.10	80.0	nd	[105]
Cerveza	MLGE	12.60	0.09	80.0	nd	[14]
Vinaza	RANMAL+ filtro	8.70	5.00	79.0	0.34	[107]
Vinaza**	RPF (nylon)	23.25	20.00	nd	0.20 *	[51]
	RPF (nylon)	6.20	30.00	62.0	2.90 *	[51]
	RPF (carbón)	23.25	8.00	16.0	0.50 *	[51]
	RPF (carbón)	6.20	30.00	80.0	2.40 *	[51]
	RPF (coco)	23.25	8.00	60.0	7.25 *	[51]
	RPF (coco)	6.20	30.00	80.0	2.90 *	[51]
Vinaza**	RPF (PVC)	11.40	4.00	71.6	5.60 *	[52]
	RPF (PVC)	20.40	2.70	61.9	8.00 *	[52]
	RPF	10.50	4.04	76.8	nd	[99]
Vinaza	RLF	20.00	nd	80.0	nd	[99]
Vino	RLF	4.50	3.30	85.0	nd	[4]
Vinaza	RLF	32.30	0.46	82.5	nd	[14]

* m³/m³-día

** Material de empaque entre paréntesis

nd= no disponible

1.6.4. Tipo de flujo en el reactor

El estudio del tipo de flujo que existe dentro de un reactor para el tratamiento de las vinazas es importante para verificar si existe el contacto adecuado entre los microorganismos y el sustrato. La técnica para analizar el flujo está basada en la introducción de un trazador dentro del influente del reactor, seguido por la observación de una señal de salida en el efluente [109]. Los distintos elementos del fluido, al seguir diferentes caminos a lo largo del reactor, tardarán tiempos diferentes en pasar a través del mismo. La distribución de estos tiempos en la corriente del fluido se le denomina

distribución de la edad a la salida (E), o distribución del tiempo de residencia del fluido ($E(t)$). Éste se obtiene de dividir la concentración a la salida en el tiempo t entre la superficie total del área bajo la curva [110]. Al comparar la curva $E(t)$ obtenida con los datos experimentales del reactor estudiado con las curvas $E(t)$ para flujo de mezcla completa o pistón (Fig. 1.7), se puede concluir que tipo de flujo predomina.

$$E(t) = \frac{C_{salida}(t)}{\int_0^{\infty} C_{salida}(t)dt}$$

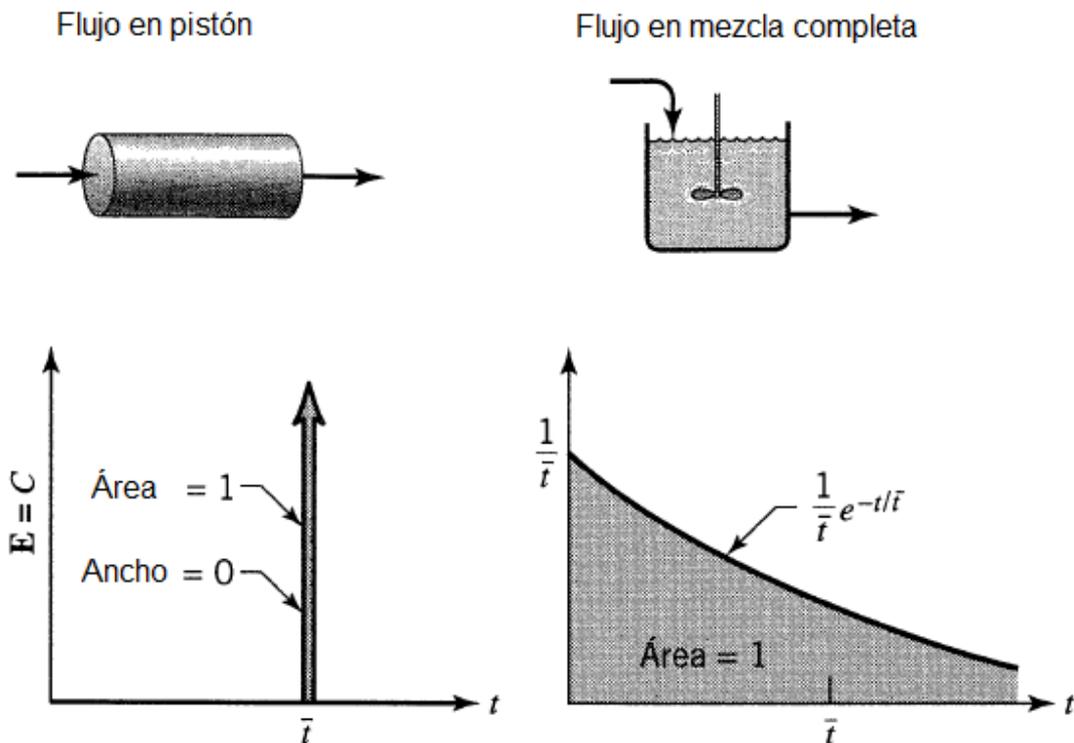


Figura 1.7. Curvas $E(t)$ para flujo pistón y mezcla completa [109]

1.7. Diversidad microbiana en reactores anaerobios

La digestión anaerobia de la materia orgánica compleja es llevada a cabo por un consorcio microbiano compuesto por los integrantes de los Dominios *Bacteria* y *Archaea*. Conforme ha progresando la investigación en la Microbiología Molecular, la comunidad científica ha notado que los microorganismos encontrados en ambientes anaerobios son extremadamente diversos y sus interacciones y funciones metabólicas aún no son entendidas a detalle [111]. Para comprender la diversidad microbiana en ambientes anaerobios, la secuenciación del gen ADNr 16S ha sido la técnica molecular más utilizada [112, 113, 114]. El gen ADNr 16S se transcribe a una secuencia de nucleótidos que forman parte de la subunidad menor (16S) de la molécula del ARN ribosomal (ARNr). La función del ARNr ha sido conservada a través de la evolución, de tal forma que las secuencias de los genes ADNr 16S proveen información filogenética y taxonómica. Esta molécula presenta tanto regiones conservadas (comunes a varios microorganismos) como regiones variables (únicas para microorganismos particulares), las cuales pueden ser utilizadas para la identificación microbiana. Las secuencias que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético y que no están presentes en otros grupos, pueden ser utilizadas para el diseño de iniciadores utilizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permitiendo así ubicar a cada microorganismo dentro de un determinado grupo microbiano, género, especie o subespecie [115].

En términos generales, la diversidad microbiana que se observa comúnmente en digestores anaerobios, está representada por las Divisiones: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes* y *Bacteroides*. El grupo de las proteobacterias presenta 4 subdivisiones: alpha, beta, gamma y delta (Tabla 1.10) [111]. Además de encontrarse microorganismos gram positivos bajos en GC y altos en GC. La designación de GC se refiere a la propiedad de que miembros de un particular subgrupo bacteriano, tienen en su ADN, la relación de bases guanina (G) y citosina (C) muy por encima (alto en GC) o muy por debajo (bajo en GC) del 50% (Tabla 1.10) [116]. En el Dominio *Archaea*, las clases *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanosarcinales* y *Thermoplasmata* son encontradas. De igual forma, en condiciones psicrófilicas se ha observado la presencia de *Crenarchaeota*, la cual es un filo de las arqueas [111, 114, 117].

Tabla 1.10. Géneros representativos de las Divisiones Proteobacterias y gram positivas

Grupo bacteriano	Género bacteriano
Proteobacterias alpha (<i>P. alpha</i>)	<i>Rhodospirillum</i> ^a , <i>Rhodopseudomona</i> ^a , <i>Rhodobacter</i> ^a , <i>Rhodomicrobium</i> ^a , <i>Brucella abortus</i> , <i>Ehrlichia erwingii</i> , <i>Rickettsia typhi</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> .
Proteobacterias beta (<i>P. beta</i>)	<i>Rhodocyclus</i> ^a , <i>Rhodoferax</i> ^a , <i>Spirillum</i> , <i>Nitrosomonas</i> , <i>Sphaerotilus</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Zymomonas</i> .
Proteobacterias gamma (<i>P. gamma</i>)	<i>Chromatium</i> ^a , <i>Thiospirillum</i> ^a , <i>Beggiatoa</i> , <i>Leucothrix</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Legionella</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Pseudomonas vibrio</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> .
Proteobacterias delta (<i>P. delta</i>)	<i>Desulfomonas</i> , <i>Myxococcus</i> , <i>Bdellovibrio</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfuromonas</i> , <i>Desulfobulbus</i> .
Gram positivas altas en GC	<i>Actinomyces</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Frankia</i> , <i>Micrococcusluteus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> .
Gram positivas bajas en GC	<i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Streptococcus</i> .

^a organismos fototróficos

Debido a que la digestión anaerobia es regida por diversos factores (tipo de sustrato, temperatura, pH, entre otros), al cambiar uno de ellos la diversidad microbiana varía (Tabla 1.11). Se puede observar que cuando un reactor se encuentra en un período de intoxicación, los géneros/especie dominantes de arqueas son *Methanobacterium* y *Methanosaeta concilli*. La presencia de *Methanosaeta concilli*, la cual es una arquea metanogénica acetoclástica, es mayor que el de *Methanobacterium*, debido a los altos niveles de ácidos grasos, especialmente de ácido acético y al ir disminuyendo la concentración de los AGVs el género *Methanobacterium* comienza a predominar [118].

Sarti *et al.* [119] sugirieron que las bacterias acidogénicas, arqueas metanogénicas, bacterias sulfato-reductoras y oxidadores de acetato muestran un potencial de interacción fisiológica, con lo cual se obtienen altas tasas de remoción de sulfatos cuando estos se encuentran en altas concentraciones. Sin embargo, al incrementar la concentración de sulfato a 3 g/L, los microorganismos metanógenos son inhibidos y la diversidad microbiana disminuye.

Se puede observar en la Tabla 1.11 que a condiciones psicrófilicas se encuentra una división característica del Dominio *Archaea*, la denominada *Crenarchaeota*, la cual está conformada por arqueas capaces de crecer a condiciones extremas y generalmente se encuentra en aguas marinas.

Tabla 1.11. Diversidad microbiana en diferentes bioreactores

Condiciones del bioreactor	Dominio Bacteria	Dominio Archaea	Referencia
Reactor de Película fija, residuo rico en sulfato (1-2 g SO ₄ ²⁻ /L), condiciones mesofílicas.	<i>P. Beta</i> (<i>Aminomonas</i> spp. y <i>Thermanaerovibrio</i> spp.) y <i>P. Delta</i> (<i>Desulfovibrio</i> spp. y <i>Desulfomicrobium</i> spp.)	<i>Methanosaeta</i> spp.	[119]
Reactor de escala real para el tratamiento del exceso de lodos en un planta de tratamiento de aguas residuales, condiciones mesofílicas.	<i>P. Alpha</i> , <i>P. Beta</i> (<i>Variovorax</i>), <i>P. Gamma</i> , <i>P. Delta</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Chloroflexi</i> y filos menores	<i>Methanotrinx</i> , <i>Methanosaeta</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanospirillum</i> y <i>Methanoculleus</i> .	[120]
Arranque de un reactor termofílico para el tratamiento de excretas de ganado.	Bacterias gram positivas bajas en GC (<i>Bacillus thermoterrestris</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Clostridium hydroxybenzoicum</i> , <i>Eubacterium limosum</i> y <i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>), <i>Bacteroides</i> sp., <i>P. beta</i> (<i>Zoogloea</i> sp.), <i>P. gamma</i> (bacteria oxidadora de sulfuro, <i>Pseudomonas halodentificans</i> y <i>Pseudomonas pertucinogena</i>)	<i>Methanoculleus thermophilicus</i> y <i>Methanosarcina thermophila</i>	[121]
Sistema de reactores de película fija y de lecho lixiviado para el tratamiento de residuos de maíz a condiciones mesofílicas.	nd	<i>Methanomicrobiales</i> (<i>Methanocorpusculum</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanospirillum</i> , <i>Methanofollis</i> y <i>Methanomicrobium</i>), <i>Methanosarcinales</i> (<i>Methanosaeta</i> , <i>Methanosarcina</i> y <i>Methanimicrococcus</i>) y <i>Methanobacteriales</i> (<i>Methanobacterium</i> y <i>Methanobrevibacter</i>)	[122]
Reactor a escala real para la obtención de biogás a partir de residuos de maíz, centeno y estiércol líquido.	<i>Firmicutes</i> (<i>Clostridia</i>) y <i>Bacteroidetes</i>	<i>Methanoculleus bourgenis</i>	[24]
Reactor anaerobio mesofílico durante un periodo de intoxicación por AGVs.	Bacterias gram positivas bajas en GC, Spirochetes, <i>Bacteroides</i> , Cytophagales y <i>Synergistes</i> .	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosaeta concilii</i> .	[118]
MLGE psicrófilico para el tratamiento de un agua residual sintética.	<i>P. Delta</i> , <i>Flexibacter</i> , <i>Cytophagales</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>P. Beta</i> .	<i>Methanosarcina</i> y <i>Crenarchaeota</i>	[114]
Reactor anaerobio para el tratamiento de productos farmacéuticos a condiciones psicrófilicas.	<i>Cytophaga-bacteroides</i> , <i>Proteobacteria</i> y <i>Bacteroides</i> .	<i>Crenarchaeota</i> , <i>Methanosarcinales</i> , <i>Methanomicrobiales</i> .	[117]
RANIMAL a condiciones mesofílicas para el tratamiento de un agua residual rica en sulfatos.	<i>Desulfobulbus</i> spp., <i>Syntrophobacter</i> spp.	<i>Methanosaeta</i> , <i>Methanobacterium</i>	[73]

nd= no disponible

1.8. Hipótesis

El desempeño en cuanto a la producción y porcentaje de metano en el biogás por Kg de DQO removido en el tratamiento de vinazas de alcohol hidratado, químicamente más complejas, utilizando un RANMAL modificado será semejante al tratamiento de vinazas de bebidas alcohólicas.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Diseño del RANMAL modificado

Para el proceso de digestión anaerobia de vinazas provenientes de la producción de etanol hidratado, se diseñó y construyó en acrílico un RANMAL con un volumen útil de 3 L. En la parte superior se colocó un sedimentador de alta tasa, el cual tuvo la función de retener la mayor cantidad de sólidos suspendidos presentes y posteriormente ser recirculados por medio de una bomba, a la parte inferior del RANMAL donde se encontraba el manto de lodos. Esta recirculación pasó por un baño térmico para mantener condiciones de temperatura mesofílicas (30 ± 5 °C) dentro del reactor.

Se adaptaron dos salidas en la parte superior del prototipo, las cuales tuvieron las siguientes funciones:

- *Recolección del efluente.* Esta salida fue conectada a un recipiente de vidrio para la colección del efluente obtenido del reactor.
- *Cuantificación del biogás.* Por medio de esta salida se midió el volumen del biogás producido mediante un gasómetro con un volumen total de 20 litros.

En la parte inferior, se colocó un punto de muestreo y una conexión en T para la alimentación del reactor. Para realizar la instalación se utilizó una tubería de 3/8". En la Figura 2.1 se presenta el esquema del reactor y el sistema instalado.

2.2. Tipo de flujo dentro del reactor

La identificación del tipo de flujo por medio del tiempo de residencia hidráulica $E(t)$, se realizó cuando se concluyeron las respectivas pruebas de estanqueidad (ausencia de fugas) dentro del reactor. Se utilizó una solución de cloruro de sodio (NaCl) con una concentración de 200 g/L como trazador, el cual fue inyectado con un pulso de 10 ml a través del punto de muestreo. Se midió la conductividad eléctrica inicial dentro del reactor ($t=0$) y se monitoreó la conductividad del efluente por 23 horas, hasta alcanzar un valor semejante a la inicial ($t=0$). El TRH de operación del reactor fue de 24 horas.

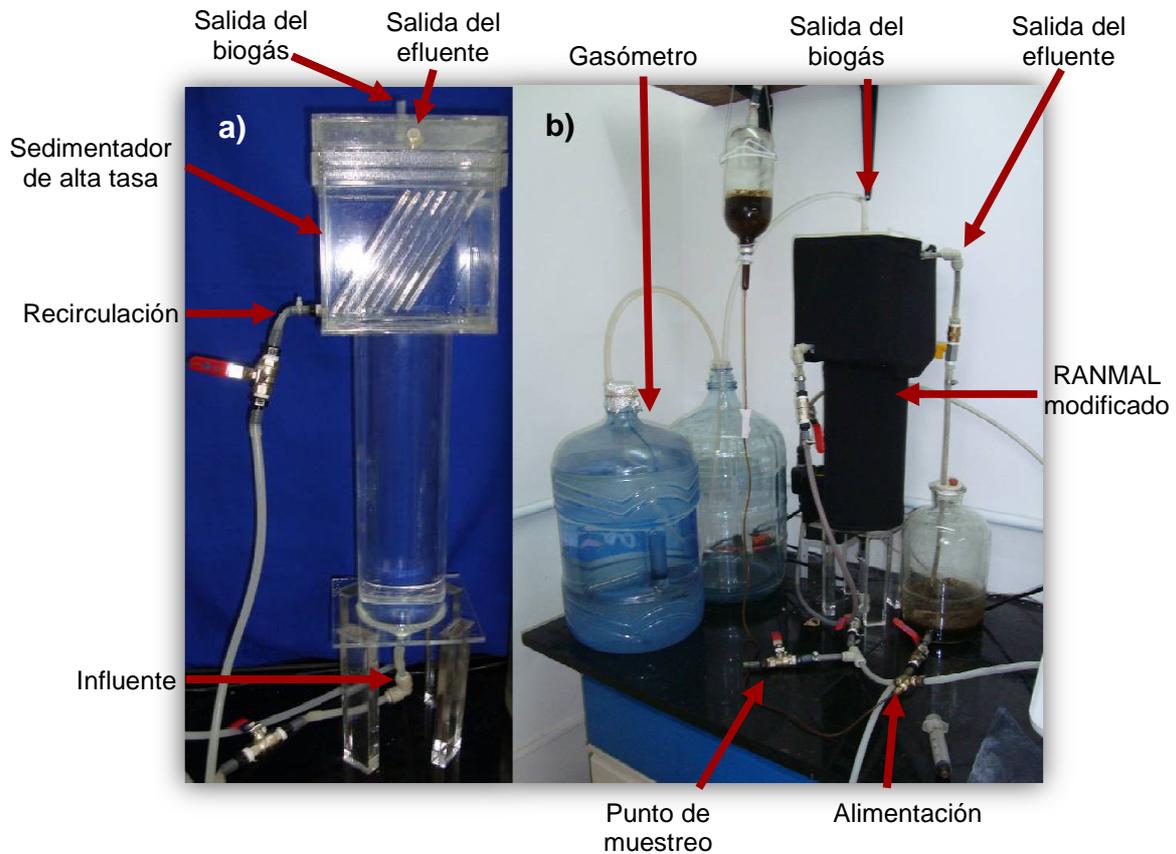


Figura 2.1. a) Esquema del RANMAL modificado, b) Sistema instalado

Se calculó el tiempo de residencia hidráulica mediante la siguiente fórmula [109]:

$$E(t) = \frac{C_{salida}(t)}{\int_0^{\infty} C_{salida}(t)dt}$$

Donde:

$C_{salida}(t)$ = Conductividad eléctrica en el efluente del reactor al tiempo t .

$\int_0^{\infty} C_{salida}(t)dt$ = Área bajo la curva de la conductividad del efluente con respecto al tiempo.

La Curva de residencia hidráulica se obtuvo graficando $E(t)$ con respecto al tiempo y se comparó con las curvas correspondientes a flujo de mezcla completa y pistón.

Para comprobar visualmente el tipo de flujo, se colocó una solución colorante (pintura vegetal) a la alimentación y se registró fotográficamente a los 3 y 5 minutos. Se analizó la dispersión del trazador colorante dentro del reactor y se comparó con fotos de la dispersión de colorantes dentro de reactores de mezcla completa y pistón.

2.3. Obtención de vinazas y caracterización físico-química

Las vinazas de este estudio se obtuvieron de la fermentación de melazas de caña de azúcar para la producción de etanol hidratado, es decir, el etanol obtenido presentó una concentración igual al 96%.

2.3.1. Fermentación de las melazas

La fermentación se realizó en lotes de 2 L de melaza de caña de azúcar diluida hasta obtener un valor de 20° Brix, el cual representa la concentración de azúcares presentes. El volumen de inóculo necesario para cada lote fue del 10% del volumen total a fermentar (200 ml), el cual se preparó en melazas diluidas a 6° Brix y se sometió al siguiente proceso de activación:

- Se adicionó 0.3 g de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$
- Se calentó a 30°C
- Una vez alcanzada la temperatura se agregó 1 g de levadura *Sacharomyces cerevisiae*
- Se dejó en aireación por 24 horas a una temperatura de 30°C, para favorecer el crecimiento de la levadura.

Posteriormente se adicionaron a cada lote de 2 L de melaza diluida, previamente calentado a 30°C, el inóculo y 3 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se dejó en incubación por 3 días a 30°C en un cuarto de cultivo. Al terminar este período de tiempo se determinaron los grados brix de la fermentación y al existir una amplia reducción de los mismos se consideró como exitosa.

Para la determinación de azúcares reductores por el método de ácido 3-5 dinitro salicílico (DNS) y azúcares totales por el método de fenol, se tomaron muestras del lote al inicio y al final de cada fermentación

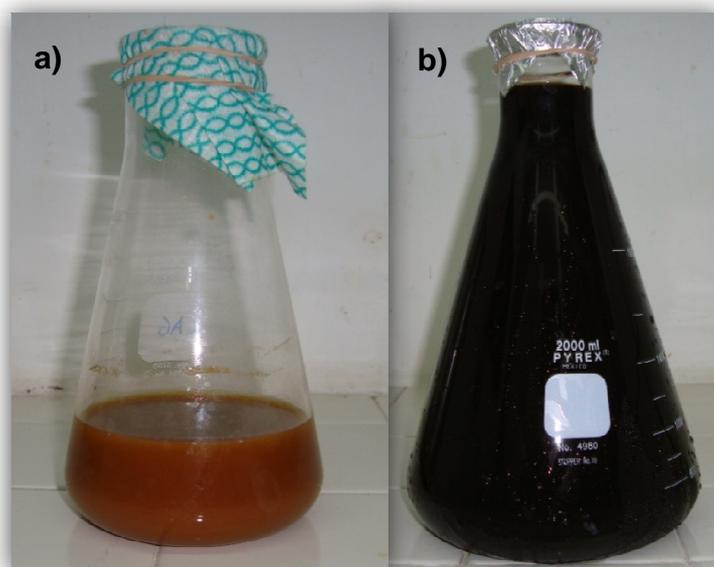


Figura 2.2. a) Inóculo activado, b) Lote de 2L de fermentación

2.3.2. Obtención de etanol hidratado

Los dos litros de fermentación se sometieron a un proceso de destilación en un intervalo de temperatura de 75-85 °C utilizando una columna vigreux (Fig. 2.3). Durante esta etapa se obtuvo en el destilado una mezcla de etanol, agua y otros compuestos de punto de ebullición dentro del intervalo de temperatura. El residuo que se forma se le conoce como vinaza y durante esta etapa se obtiene la mayor cantidad.

Posteriormente, para obtener un mayor grado de pureza en el etanol, el destilado fue sometido a una segunda destilación, en la cual a 75°C se obtuvieron todos los compuestos con menor punto de ebullición que el etanol y a 79°C se obtuvo el etanol con un grado de pureza de 96% (Fig. 2.3). Esta pureza se evaluó por medio de un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un Detector de Ionización de Flama (FID). La columna utilizada fue ECTM – WAX (30 m de longitud y 0.53 mm de

diámetro); se utilizó nitrógeno como gas acarreador, el horno fue operado en una rampa de temperatura de 50, 100 y 200°C, la temperatura en el detector fue de 200°C y en el inyector 200°C.

Los compuestos obtenidos a los 75°C y los fondos en la segunda destilación se mezclaron con la vinaza de la primera destilación, siendo esta mezcla la vinaza de etanol hidratado.

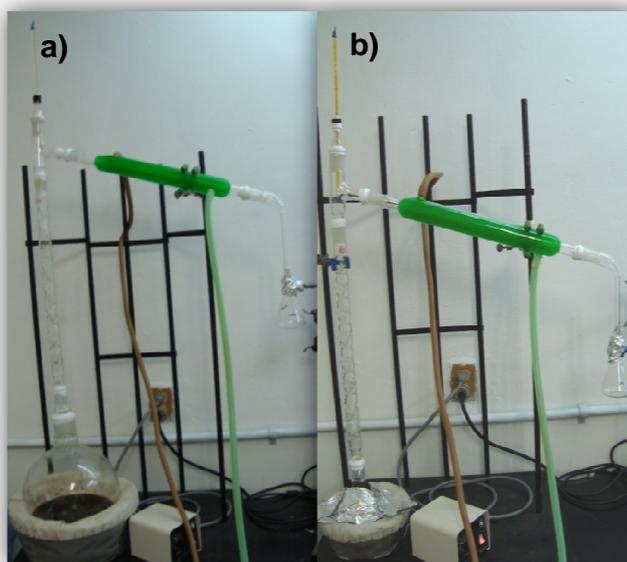


Figura 2.3. Obtención de etanol hidratado. a) Primera destilación, b) Segunda destilación

2.3.3. Caracterización de las vinazas

Se realizó la caracterización físico-química de las vinazas mediante la medición de Demanda Química de Oxígeno (DQO), Nitrógeno total (N_T), Nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$), Fósforo total (PO_4^{3-}), Sulfatos (SO_4^{2-}) y Sulfuro (S^{2-}), utilizando un colorímetro Hach DR/890 (Hach Company, Loveland, CO, USA) siguiendo las instrucciones del kit (Tabla 2.1). El potencial de hidrógeno (pH), Nitrógeno orgánico (N_{org}) y Potasio (K^+) se determinaron de acuerdo a procedimientos estandarizados [123]. Los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y etanol fueron determinados por cromatografía de gases; para esto se prepararon las muestras por filtración (papel filtro whatman No. 41) y fueron analizadas en el cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un detector de ionización de flama (FID) empleando la columna $EC^{TM} - 1000$ (30 m de longitud y 0.32

mm de diámetro), se utilizó nitrógeno como gas acarreador y las temperaturas de operación fueron 240, 160 y 250 °C para el inyector, horno y detector respectivamente.

Tabla 2.1. Caracterización físico-química de vinazas de etanol hidratado

Parámetro	Instrumento/Método
pH	Potenciómetro/Método estandarizado
DQO	Colorímetro Hach DR-890/8000
N _T	Colorímetro Hach DR-890/10072
N-NH ₃	Colorímetro Hach DR-890/10031
PO ₄ ³⁻	Colorímetro Hach DR-890/8190
SO ₄ ²⁻	Colorímetro Hach DR-890/8051
S ²⁻	Colorímetro Hach DR-890/8131
N _{org}	Método estandarizado
K ⁺	Absorción atómica/Método estandarizado
AGVs	Cromatografía de gases

2.4. Inoculación y arranque del reactor

La inoculación del reactor se realizó con 2.5 L de lodos granulados (Figura 2.4) provenientes de un RANMAL operado para el tratamiento de vinazas obtenidas de la producción de etanol a partir de residuos de plátano, 1 L de Agua Residual Sintética (ARS) como fuente de sustrato, cuya composición se encuentra en la Tabla 2.2 y el volumen faltante fue completado con agua de llave.



Figura 2.4. Lodo granular utilizado en la inoculación

Tabla 2.2. Formulación del Agua Residual Sintética [124]

Componente	Cantidad
Azúcar comestible	5 g/L
Ácido acético glacial	0.5 g/L
NaHCO ₃ comercial	1 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
K ₂ HPO ₄	0.2 g/L
Agua de llave	1000 ml

Después de la inoculación se alimentó 200 ml de ARS por 6 días. Durante esta etapa se mantuvo el pH del reactor por arriba de 6.6, utilizando bicarbonato de sodio (NaHCO₃) como buffer. Al observar la producción de biogás se comenzó a alimentar con 150 ml de vinaza y se cuantificó la producción de biogás, mediante un gasómetro, el cual está basado en el desplazamiento de un volumen de solución salina acidificada equivalente solo al biogás que desplaza el espacio ocupado por el líquido del recipiente [125]. El porcentaje de metano en el biogás se cuantificó en el cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un Detector de Conductividad Térmica (TCD) empleando la columna Molesieve (30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro), utilizando nitrógeno como gas acarreador y las temperaturas de operación fueron 75, 30 y 200 °C para el inyector, horno y detector respectivamente. De igual forma, se realizó la cuantificación de remoción de DQO por acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%DQO_{rem} = \frac{DQO_{in} - DQO_{eflu}}{DQO_{in}} \times 100$$

Donde: $\%DQO_{rem}$ = Porcentaje de remoción de DQO

DQO_{in} = DQO del influente

DQO_{efl} = DQO del efluente

2.5. Operación del reactor con vinazas de etanol hidratado

Se evaluó la operación del reactor a partir de las siguientes cargas orgánicas: 7.27, 9.60, 11.67, 14.74, 17.05, 18.55, 22.16 Kg DQO/m³-día, con el objetivo de encontrar la óptima para el reactor. Estas cargas fueron obtenidas fijando un caudal inicial de 150 ml

de vinazas crudas al día y aumentando 50 ml de las mismas hasta observar un deterioro en la operación del reactor (Fig. 2.5).

El RANMAL se operó a condiciones mesofílicas y a un pH mayor a 6.6, añadiendo NaHCO_3 de ser necesario para mantenerlo. Se cuantificó la presencia de AGVs mediante titulación de acuerdo a procedimientos estandarizados [123]; la alcalinidad intermedia, parcial y total, al igual que el coeficiente alfa se determinaron según procedimientos publicados por Poggi *et al.* [126]. Se cuantificó el volumen de biogás producido diariamente mediante el gasómetro y se obtuvo el porcentaje de metano en el biogás, mediante cromatografía de gases con las condiciones mencionadas anteriormente. El monitoreo de estos parámetros nos permitió evaluar el correcto desempeño del reactor.

Al efluente obtenido para cada carga orgánica se le realizó la caracterización físico-química que se encuentra en la Tabla 2.3, de acuerdo a los métodos mencionados previamente.

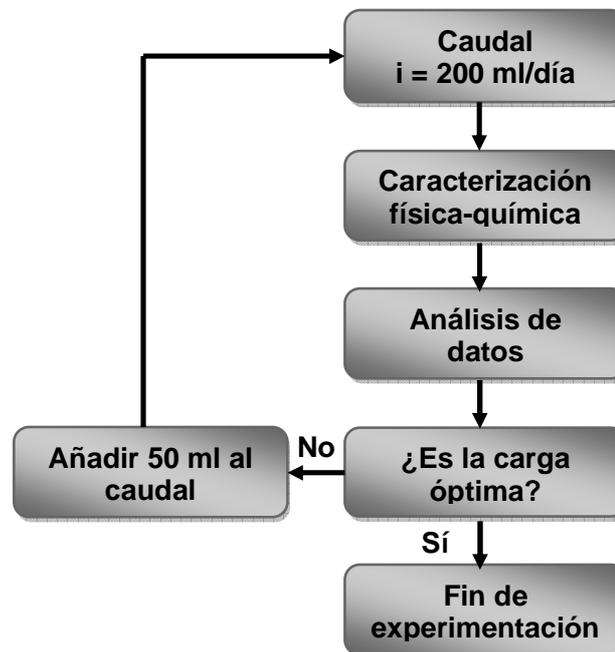


Figura 2.5. Evaluación de la carga orgánica óptima

Tabla 2.3. Caracterización físico-química del efluente

Parámetro	Instrumento/Método
pH	Potenciómetro/Método estandarizado
DQO	Colorímetro Hach DR-890/8000
N _T	Colorímetro Hach DR-890/10072
N-NH ₃	Colorímetro Hach DR-890/10031
PO ₄ ³⁻	Colorímetro Hach DR-890/8190
SO ₄ ²⁻	Colorímetro Hach DR-890/8051
S ²⁻	Colorímetro Hach DR-890/8131
N _{org}	Método estandarizado
K ⁺	Absorción atómica/Método estandarizado
AGVs	Cromatografía de gases

2.6. Identificación de grupos bacterianos y arqueas metanogénicas

2.6.1. Extracción de ADN

Al alcanzar la carga óptima del reactor se colectó una muestra de sedimento (50 g peso húmedo) del puerto de muestro localizado en el RANMAL. Esta muestra fue almacenada a -80°C.

El ADN fue extraído utilizando el método comercial PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc.), siguiendo las instrucciones proporcionadas. Para ello se pesaron 0.25 g de sedimento en un tubo PowerBead®, se añadió una solución de SDS y se agitó por 10 min a máxima velocidad en un vortex, con el fin de homogeneizar la muestra y lisar las células microbianas. Los tubos fueron centrifugados a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió y se trató con dos soluciones que precipitaron el material orgánico e inorgánico, se centrifugó por 1 min a 10,000 x g a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió una solución con alta concentración de sales y la mezcla se transfirió a un filtro, el cual fue centrifugado a 10,000 x g por 1 min, descargando el líquido que pasa por el filtro y quedando el ADN en el filtro. Se lavó el ADN del filtro con una solución de etanol, centrifugando a 10,000 x g por 1 min y descargando el líquido que pasó por el filtro, por último este filtro se colocó en un tubo eppendorf nuevo y se obtuvo el ADN colocando 100 µl de agua libre de nucleasas sobre el centro del filtro.

Para la visualización del ADN se preparó un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio (0.25 µg/ml). La electroforesis se realizó con un buffer de Tris-Borato-EDTA (TBE 1X). Posteriormente, la muestra de ADN fue mezclada con buffer de carga (0.25% azul de

bromofenol, 0.25% xilencianol, 30% glicerol v/v en agua) y se corrió a 80V durante 70 minutos. El gel fue visualizado y fotografiado bajo un transiluminador de luz UV.

Tabla 2.4. Composición del buffer de electroforesis [127]

Buffer	Solución de Trabajo	Solución Stock Concentrada (por litro)
Tris-Borato-EDTA (TBE)	1 x : 0.089 M Tris-Borato 0.002 M EDTA	10 x : 54 g Tris Base 27.5 g ácido bórico 20 ml 0.5 M EDTA

2.6.2. Amplificación por PCR

Para la identificación de grupos pertenecientes a los Dominios *Bacteria* y *Archaea*, se realizaron amplificaciones por PCR de las secuencias del gen ADNr 16S, utilizando iniciadores que han sido indicados en trabajos previos (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Grupos microbianos evaluados por PCR

Grupo	Tamaño molecular (pb)	Referencia
Dominio <i>Archaea</i>		
<i>Archaea</i>	273	[128]
Metanógenos	500	[128]
<i>Methanobacterales</i>	343	[128]
<i>Methanosarcinales</i>	354	[128]
Dominio <i>Bacteria</i>		
<i>Proteobacterias alpha</i>	510	[129]
<i>Proteobacterias beta</i>	600	[129]
<i>Proteobacterias gamma</i>	800	[129]
<i>Proteobacterias delta</i>	230	[129]
Bacterias gram + altas en GC	700	[129]
Bacterias gram + bajas en GC	1270	[129]
<i>Bacillus</i>	647	[129]
Bacterias reductoras de sulfato	100	[129]
<i>Clostridium</i>	1200	[130]
ADNr 16S <i>Bacteria</i>	-	[130]

Donde pb: pares de bases

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50 µl conteniendo: 1 µM de cada uno de los iniciadores Dominio-, grupo- o especie- específicos correspondiente, 50 ng de ADN, 68 mM de buffer de PCR 10X [10 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween-20], 1.5 mM de MgCl₂, 1U de la enzima Taq ADN polimerasa (*Bioline, USA, Inc.*) y 250 µM de cada desoxinuclétido (dATP, dCTP, dGTP y

dTTP). Se utilizó un termociclador Apollo ATC 201 programado bajo las condiciones que se encuentran en la Tabla 2.6. En cada reacción de PCR se incluyeron controles negativos, sustituyendo el ADN por 5 µl de agua libre de nucleasas. Los oligonucleótidos fueron sintetizados comercialmente (*Alpha DNA*).

Tabla 2.6. Condiciones del termociclador

Etapa	Ciclos		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	1		94	5
Amplificación	30	Desnaturalización	94	1
		Alineamiento	Específica para cada par de iniciadores	1
		Extensión	72	2
Extensión final	1		72	10
Mantenimiento			4	Indefinido

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% (p/v), previamente teñidos con bromuro de etidio (0.25 µg/ml). La electroforesis se llevó a cabo utilizando buffer TBE 1X y a 80 V por 70 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 1,000 pb y de 10,000 pb (*HyperLadder I y IV Bionline, USA, Inc.*). La visualización de las bandas se realizó bajo un transiluminador de luz UV (302 nm, *LMS 20E, UVP Inc.*) y los geles fueron fotografiados con cámara digital para el registro electrónico de los resultados. Se consideró como un resultado positivo la presencia de bandas en el peso molecular esperado para cada grupo.

Capítulo 3. Resultados y Discusiones

Los resultados en este capítulo se obtienen de los promedios de los parámetros evaluados.

3.1. Tipo de flujo dentro del reactor

Al realizar la curva del tiempo de residencia hidráulica con los valores de conductividad obtenidos en el efluente del RANMAL propuesto en este estudio (figura 3.1), se puede observar un tipo de flujo semejante al de mezcla completa cuando se comparó con las curvas de residencia hidráulica proporcionadas por Levenspiel [109].

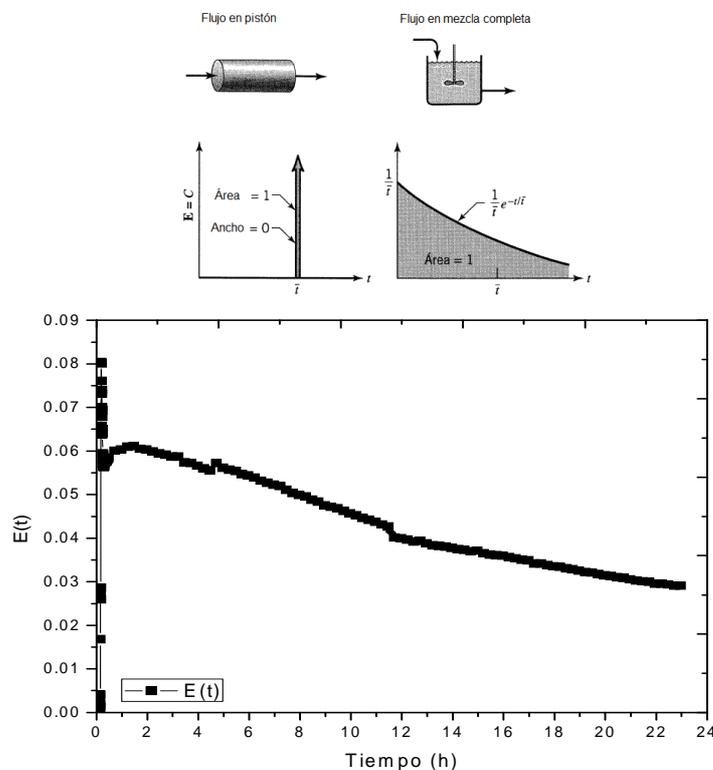


Figura 3.1. Comparación de la curva del tiempo de residencia ($E(t)$) dentro del RANMAL propuesto con las curvas proporcionadas por Levenspiel.

El incremento y la reducción repentina de $E(t)$ en los primeros minutos del muestreo, nos indica la presencia de una zona de corto circuito, es decir, al introducir un pulso en la alimentación una pequeña parte de ésta tiende a pasar directamente hacia la salida y posteriormente distribuirse de manera homogénea dentro del reactor.

También se pudo observar que el TRH experimental fue mayor al TRH teórico (1 día), debido a que después de 23 horas de monitoreo la conductividad no había regresado a su estado inicial, lo que indica que este prototipo presentó una mayor retención del sustrato, debido a la presencia del sedimentador de alta tasa colocado en la parte superior del RANMAL.

Al observar la distribución del colorante vegetal dentro del reactor (figura 3.2c), se verificó la presencia de un tipo de flujo de mezcla completa como se puede observar en la figura 3.2a, debido a que este colorante se distribuyó homogéneamente en todo el reactor, a diferencia del flujo tipo pistón, el cual, mostraría una distribución no uniforme como se observa en la figura 3.2b.

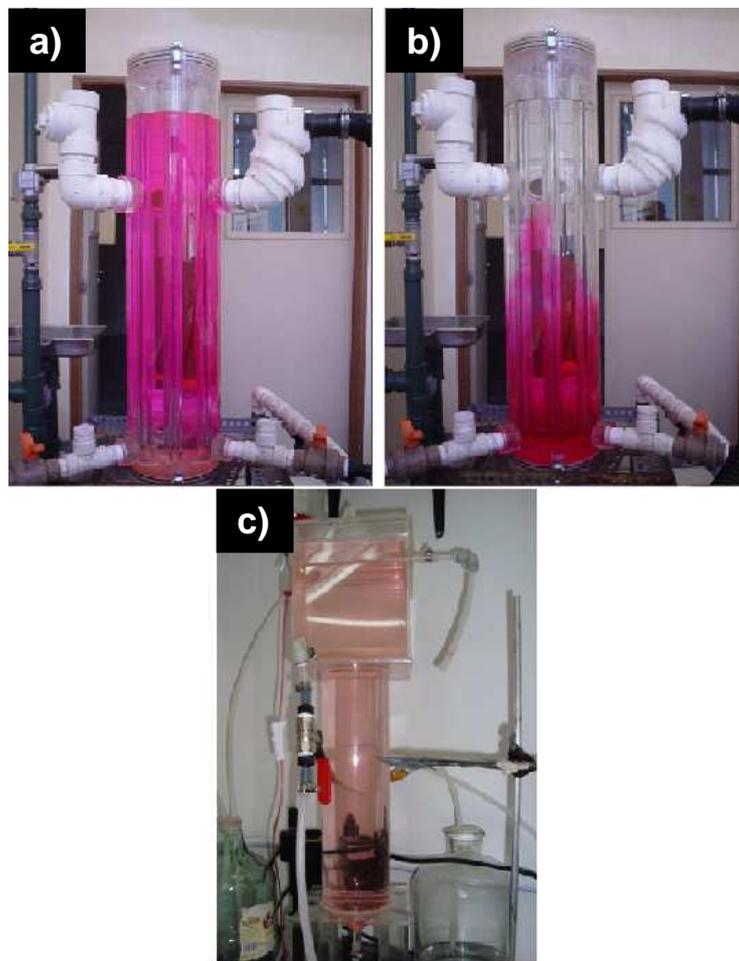


Figura 3.2. Visualización del tipo de flujo de reactor utilizando un colorante. a) Flujo de mezcla completa [110] b) Flujo pistón [110] c) Tipo de flujo en este estudio.

El comportamiento dinámico del flujo dentro de este tipo de reactores, donde las fases sólida, líquida y gaseosa interactúan, está relacionado con distintos factores como la intensidad de mezclado, el grado de segregación de la materia, tipo de entrada del influente, velocidad de ascensión, profundidad del manto de lodos y la velocidad de producción de biogás. Por lo tanto, existen estudios donde se ha descrito mejor la hidrodinámica de un RANMAL por el modelo de mezcla completa con algunos cortos circuitos y zonas muertas [131, 132, 133] y por otro lado por medio de un modelo flujo pistón [134].

En este estudio, el prototipo propuesto presentó un comportamiento dinámico de mezcla completa atribuyéndolo a la forma concéntrica de la entrada del influente, este tipo de flujo favorece el contacto adecuado entre el sustrato y los microorganismos. Factores como la profundidad del manto de lodos, la velocidad en la producción de biogás, entre otros, son los que pueden ejercer influencia en el cambio del comportamiento dinámico del prototipo propuesto, sin embargo para la evaluación de esto se necesitaría utilizar trazadores inertes en la digestión anaerobia como el cloruro de litio o rodamina [110, 131, 134, 135].

3.2. Obtención de vinazas de etanol hidratado

Cada lote de melaza diluida a 20° brix contenía en promedio 104.01 ± 6.7 g/L de azúcares totales, de los cuales 70% eran azúcares reductores. Al terminar la fermentación se obtuvo una reducción de 93 y 87 % para los azúcares reductores y totales respectivamente. La concentración del etanol hidratado obtenido mediante la doble destilación fue 96%.

Las características de las vinazas obtenidas en comparación con otros estudios se encuentran en la Tabla 3.1. Se pudo observar que las vinazas de nuestro estudio presentaron un pH ácido (4.0) y debido a que éstas se obtuvieron de la producción de alcohol hidratado una mayor complejidad química se vio reflejada en el contenido de DQO (121 g/L) encontrándose por arriba de los valores proporcionados por investigaciones previas y siendo hasta 3 veces mayor en comparación con las obtenidas durante la producción de una bebida alcohólica como el vino. De igual forma, la concentración de

sulfato (5,336 mg/L) se encontró fuera del intervalo de la literatura, lo cual se atribuye al $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ añadido como fuente de nitrógeno para las levaduras durante la fermentación.

Tabla 3.1. Caracterización de vinazas de diferentes fuentes

Fuente	DQO (g/L)	N _T (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	pH	Referencia
Jugo de caña	nd	102	71	1,733	nd	4.6	[34]
	30.4	628	130	1,952	1,356	4.0	[20]
Melazas de caña	nd	408	102	4,893	nd	4.8	[34]
	nd	153	1	9,073	nd	4.5	[34]
	84.9	1,229	187	5,124	3,478	4.5	[20]
	95.0	1,000	40	11,000	1,500	4.5	[35]
	84.9	1,230	190	5,100	3,480	4.5	[36]
Melazas de remolacha	91.1	3,569	163	10,030	3,716	5.4	[20]
	80.5	1,800	nd	nd	nd	5.2	[6]
	91.1	3,570	160	10,000	3,720	5.4	[36]
	55.5	4,750	nd	nd	3,500	4.3	[37]
Uvas (vino)	50.2	104.9	118	354	nd	4.2	[8]
	27.5	650	65	118	120	4.2	[32]
	26.0	nd	nd	800	nd	3.0	[20]
Sorgo dulce	79.9	800	1,990	nd	nd	4.5	[20]
Melaza de caña	121.0	1,341	141	7,262	5,336	4.0	Este estudio

nd= no disponible

El nitrógeno total presente se encontró en el valor superior del intervalo para las vinazas de melazas de caña y por encima de las obtenidas durante la producción de vino. Sin embargo, este permaneció por debajo de las obtenidas de remolacha debido a la ausencia del compuesto betaína en la caña de azúcar. El nitrógeno y el sulfato presente en residuos son degradados por el consorcio bacteriano durante la digestión anaerobia produciendo nitrógeno amoniacal y sulfuro respectivamente, los cuales poseen efectos inhibitorios sobre la digestión anaerobia afectando de esta forma el rendimiento de metano. Según datos en la literatura valores cercanos a 200 mg/L de nitrógeno amoniacal son benéficos para la digestión anaerobia mientras que el intervalo inhibitorio se encuentra entre 1,700 a 14,000 mg/L [87]. Para el sulfuro la concentración de inhibición se encuentra entre 30 y 250 mg/L [92]. Estos valores mencionados pueden variar dependiendo del sustrato utilizado y las condiciones a la que es operado el reactor.

Debido a que las vinazas de este estudio presentan altas concentraciones de nitrógeno total y sulfato se monitoreó la concentración de nitrógeno amoniacal y sulfuro obteniendo 160 mg/L y 169 mg/L respectivamente. Con lo que podemos observar que en

el caso del nitrógeno amoniacal se encuentra dentro de los valores benéficos para la digestión anaerobia, mientras que para el valor del sulfuro es inhibitorio.

En la Figura 3.3, se representa los principales componentes presentes en las vinazas utilizadas en este estudio y en la Tabla 3.2, se muestran las concentraciones de cada uno de estos compuestos.

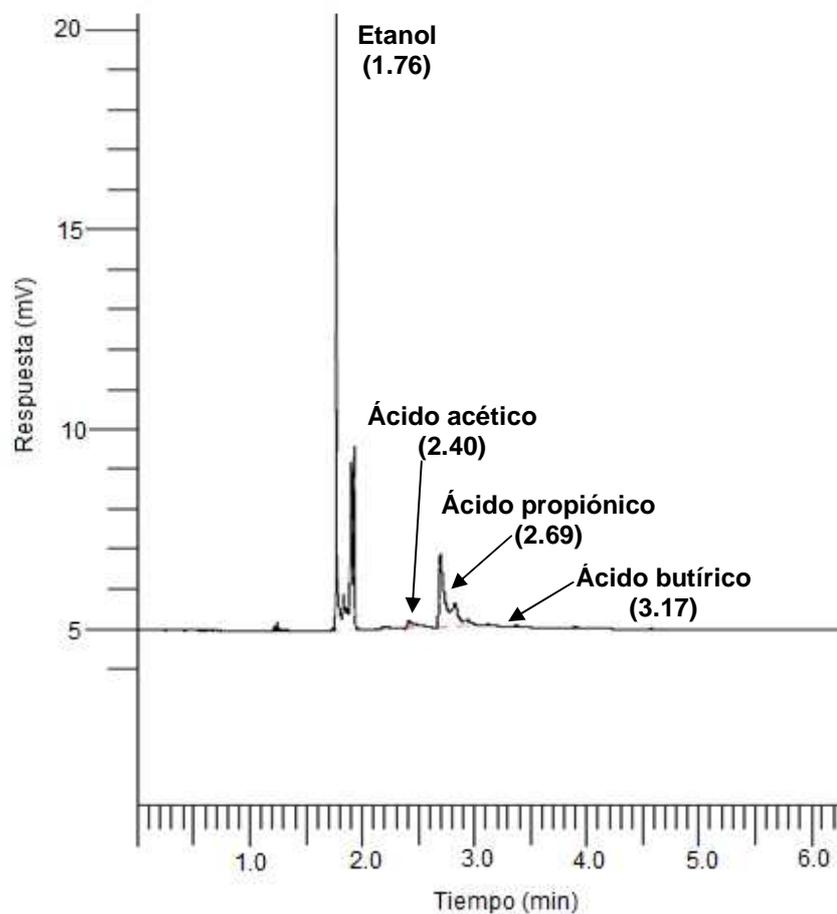


Figura 3.3. Tiempos de residencia en un cromatograma de vinazas de etanol hidratado.

Tabla 3.2. Concentración de AGVs y etanol en vinazas de etanol hidratado

Parámetro	Valor ^a	Tiempo de residencia ^b
Ácido acético	2,237	2.40
Ácido propiónico	4,304	2.69
Ácido butírico	nd	3.17
Etanol	21,007	1.76

nd= valor no detectado (0 mg/L)

^a Todos los valores en mg/L.

^b Tiempo en el cromatograma en min

La información disponible en la literatura sugiere que el etanol y el ácido acético son unos de los mayores componentes orgánicos que se encuentran en las vinazas, debido a que, son producidos por las levaduras durante el proceso de fermentación [10, 136]. Nitayavardhana y Khanal [137], evaluaron la concentración de etanol en vinazas de la producción de etanol hidratado a escala laboratorio a partir de melazas de caña; encontrando un valor de 15,750 mg/L. Al comparar la concentración alcanzada en nuestro estudio (21,007 mg/L) podemos observar que es ligeramente mayor al valor proporcionado por estos autores, lo cual se atribuye al proceso de destilación utilizado, ya que para asegurar una pureza de 96% en el alcohol producido, una parte de éste se perdió en la destilación de compuestos más volátiles, los cuales fueron introducidos en la vinaza de este trabajo. Sin embargo, durante la digestión anaerobia este etanol puede ser transformado de forma directa a metano mediante arqueas metanogénicas capaces de utilizarlo como donador de electrones [67, 76, 77, 78], y por lo tanto, puede llegar a ser benéfico e incrementar el rendimiento de metano.

Se ha encontrado en la literatura que la presencia de ácido acético es mayor en comparación con el ácido propiónico y el butírico en distintos tipos de vinazas. Bories y Raynal [52] obtuvieron una concentración de 1,600, 120 y 660 mg/L para ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico respectivamente en una vinaza de la producción de alcohol a partir de melaza de caña. Robertiello [138], al analizar una vinaza de remolacha encontró un valor de 2,690 mg/L para el ácido acético presente, mientras que para el propiónico solamente registró trazas. De igual forma, Parnaudeau *et al.* [10], encontraron que el ácido acético, en una vinaza de melaza de caña, representaba el 2.6% de la materia carbonácea mientras que el propiónico y butírico solamente el 0.8 y 0.1% respectivamente y Benitez *et al.* [11], encontraron una concentración de 1,330 mg/L de ácido acético para una vinaza de producción de vino. En nuestro estudio, se observó que el ácido acético se encuentra dentro del intervalo proporcionado por los estudios de los autores anteriormente mencionados, sin embargo, el ácido propiónico presentó una mayor

concentración, esto nos sugiere que durante la fermentación alcohólica existió la presencia de bacterias fermentativas, las cuales utilizaron los azúcares presentes en las melazas para la producción de este ácido graso volátil.

La presencia de ácidos como el acético, el propiónico y el butírico proporcionan un sustrato que se puede integrar fácilmente al proceso de digestión anaerobia. Sin embargo, se ha demostrado que valores por arriba de los 10,000 mg/L de AGVs totales, puede producir un efecto inhibitorio sobre la digestión anaerobia causando una disminución en el pH del sistema, el cual, sin una capacidad buffer suficiente inhibe el inicio de producción de metano [139]. Las vinazas de nuestro estudio tienen una concentración aproximada de AGVs totales de 7,000 mg/L, por lo que se encuentra cerca del nivel inhibitorio y fue necesario un control adecuado del sistema anaerobio donde fueron tratadas.

De acuerdo a la caracterización físico-química de las vinazas de este estudio, se pudo observar que fueron químicamente más complejas al compararse con las obtenidas en investigaciones previas y en bebidas alcohólicas, debido a que presentaron valores dentro y cercanos a intervalos inhibitorios de la digestión anaerobia.

3.3. Operación del reactor

3.3.1. Inoculación y arranque del reactor

Los reactores anaerobios en estudios previos encontrados en la literatura, son inoculados con diferentes tipos de lodos, el floculento y el granular, donde el lodo granular presenta la ventaja de una elevada concentración de microorganismos, los cuales poseen alta actividad metabólica para utilizar los sustratos e incrementar la producción de metano, lo que hace que el proceso alcance mejores rendimientos en tiempos cortos, disminuyendo así el tiempo de arranque [140].

Molina *et al.* [141] obtuvieron un tiempo de arranque de 60 días en un reactor híbrido (RANMAL + filtro) para el tratamiento de vinazas de vino, utilizando como inóculo lodos floculentos colectados de dos digestores anaerobios para el proceso de aguas residuales de una industria azucarera y del proceso de producción de tableros de fibra, estos autores utilizaron una carga orgánica inicial de 0.5 Kg DQO/m³-día, la cual, fue

incrementada hasta alcanzar 5 Kg DQO/m³-día obteniendo una remoción del 98% de la DQO y un porcentaje de metano en el biogás entre 70 y 74%. De igual forma, Gao *et al.* [101], encontraron un tiempo de arranque de 40 días en un RANMAL para el tratamiento anaerobio de vinazas de la producción de vino a condiciones mesofílicas, para la inoculación del reactor utilizaron lodos floculentos del tratamiento anaerobio de aguas residuales domésticas, el RANMAL fue operado con una carga orgánica inicial de 0.42 Kg DQO/m³-día y fue incrementada hasta 5.6 Kg DQO/m³-día, alcanzando una remoción de DQO de 93.8% y una producción de metano de 2.3 L CH₄/L-día. Cronin y Lo [108], obtuvieron un tiempo de arranque de 16 días en un RANMAL operado para el tratamiento de aguas residuales de una cervecera, donde el inóculo utilizado fue obtenido de una planta de tratamiento de lodos activados (floculentos) de aguas residuales, durante este período operó con una carga orgánica de 7 Kg DQO/m³-día y consideraron que el arranque había terminado al alcanzar una reducción de DQO de 71% y 41% de metano en el biogás.

Por otro lado, Wolmarans y de Villiers [142] estudiaron el período de arranque de un RANMAL para el tratamiento de vinazas de melaza de caña, utilizando como inóculo un lodo granular obtenido de un RANMAL operado para el tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera, se encontró que el proceso se estabilizó en una semana (7 días) con una carga orgánica entre 4 y 8 Kg DQO/m³-día, obteniendo una remoción de DQO por arriba del 90%.

En nuestro estudio, el RANMAL fue inoculado con lodos granulares procedentes de un reactor anaerobio operado anteriormente para el tratamiento de vinazas de la producción de alcohol a partir de residuos de plátano. Durante los primeros 6 días después de la inoculación, se introdujo una carga orgánica de 0.34 Kg DQO/m³-día utilizando un agua residual sintética, mediante la cual se produjo 418 ml en promedio de biogás. A partir del séptimo día se aumentó la carga orgánica a 5.9 Kg DQO/m³-día correspondiendo a 150 ml de vinaza de etanol hidratado y la producción de biogás aumentó a 2 L por día en promedio. Al noveno día, con igual carga, la concentración de metano en el biogás fue 58% y remoción de DQO 97%, con estos últimos valores y basados en la literatura se consideró que el reactor había alcanzado su fase de arranque y se encontraba listo para su proceso de operación.

Los tiempos de arranque mencionados por Molina *et al.* [141] y Gao *et al.* [101], se encontraron por arriba del alcanzado en nuestro estudio, esto se debió a que estos

autores consideraron como finalizada su etapa de arranque cuando se lograron apreciar pequeños gránulos en el manto del RANMAL. Singh *et al.* [140], señalaron que el tiempo de formación de estos gránulos durante el arranque de un RANMAL, varía con el tipo de agua residual que va a ser tratada, mencionaron que para el tratamiento de vinazas de la producción de bebidas alcohólicas se encuentra en el intervalo de 30 a 44 días, el cual es semejante al obtenido por los autores anteriormente mencionados, mientras que para vinazas de la producción de alcohol hidratado puede tardar 180 días, debido a la complejidad que presentan estas últimas.

Por otro lado, se puede observar que nuestro tiempo de arranque de 9 días es cercano a los 16 días obtenidos por Cronin y Lo [108], sin embargo, el porcentaje de metano (58%) en el biogás de nuestro estudio es mayor al 41% alcanzado por estos autores, lo que nos indica que las arqueas metanogénicas presentes en el inóculo utilizado por nosotros poseían una mayor actividad metabólica que las que se encontraban en el estudio de estos autores. Esto también se puede atribuir al estado granular que presentó nuestro inóculo, ya que estudios como el de Stronach *et al.* [143] han demostrado que un RANMAL inoculado con lodos granulares presentan una alta eficiencia de remoción de DQO y elevado contenido de metano en un lapso de tiempo entre 5 y 10 días. Otro factor que puede estar relacionado con el bajo tiempo de arranque, es la procedencia del inóculo, como se puede observar, Wolmarans y de Villiers [142] y nuestro estudio, presentaron los más bajos tiempos de arranque y en ambos estudios se utilizaron como inóculos lodos provenientes de reactores anaerobios para el tratamiento de vinazas. Vadlani y Ramachandran [144] demostraron que al utilizar como inóculo lodos provenientes del tratamiento anaerobio de vinazas en el arranque de un RANMAL, el tiempo puede reducirse en un 40% comparado con lodos anaerobios del tratamiento de aguas residuales domésticas, debido a que la actividad metanogénica específica es mayor en los lodos de tratamiento de vinazas.

3.3.2. Desempeño del RANMAL y evaluación de la carga orgánica óptima

El comportamiento del RANMAL modificado en cada una de las cargas orgánicas evaluadas se muestra en la Figura 3.4.

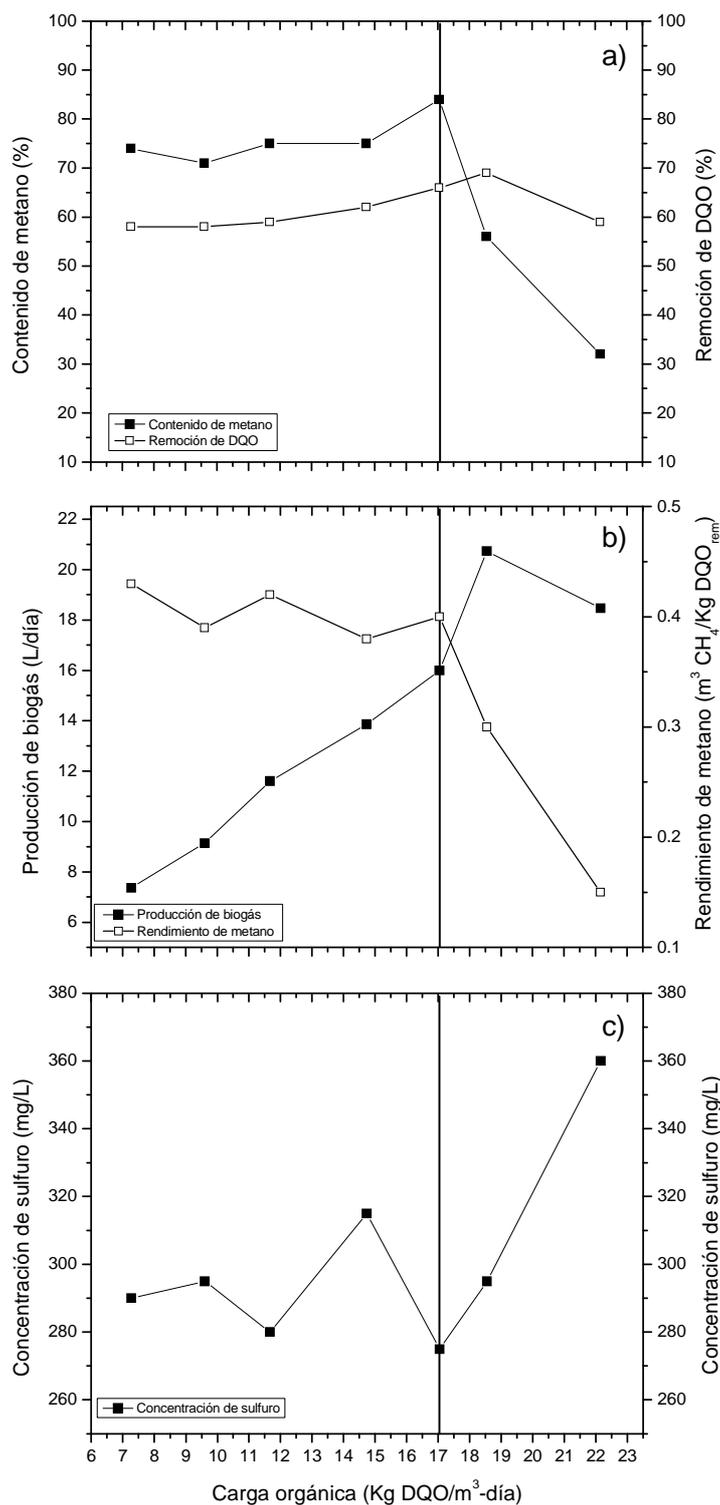


Figura 3.4. Valores obtenidos para cada carga orgánica evaluada: a) Porcentaje de remoción de DQO y contenido de metano (%), b) Producción de biogás en litros por día (L/d) y rendimiento de metano en m³ de metano por Kg de DQO removido (m³ CH₄ / Kg DQO_{rem}), c) Concentración de sulfuro (mg/L).

Durante este estudio la vinaza introducida no fue sometida a un proceso de dilución para alcanzar las cargas orgánicas anteriormente mencionadas. Los valores del desempeño del reactor al igual que las alcalinidades y los AGVs fueron determinados de acuerdo a los procedimientos publicados por Poggi *et al* [126] y se encuentran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros evaluados a diferentes cargas orgánicas

Parámetro ^a	Cargas Orgánicas Evaluadas (Kg DQO/m ³ -día)						
	7.27	9.60	11.67	14.74	17.05	18.55	22.16
TRH (días)	15	12	10	9	7.5	7	6
DQO _{inf} (g/L)	109.10	115.20	116.70	126.34	127.89	123.66	132.94
DQO _{efl} (g/L)	45.70	47.70	46.60	48.43	43.45	36.80	54.80
% DQO _{rem}	58	58	58	62	66	69	59
V.B. (L)	7.28	9.14	11.60	13.86	16.00	20.74	18.46
% CH ₄	74	71	75	75	84	56	32
R.M (m ³ /Kg DQO _{rem})	0.43	0.39	0.42	0.38	0.40	0.30	0.15
pH del reactor	7.87	7.80	7.57	7.47	6.96	6.83	6.57
A _{parcial} (mg/L)	5,750	4,300	3,920	3,080	3,020	1,880	2,100
A _{intermedia} (mg/L)	2,940	2,235	1,860	1,920	1,890	2,530	2,080
A _{total} (mg/L)	5,815	4,385	3,820	3,460	3,400	3,470	3,130
AGVs (mg/L)	4,791	3,780	3,000	3,144	3,072	3,942	3,000
Coficiente alfa	0.51	0.52	0.47	0.62	0.63	1.35	0.99

^aV.B.: Volumen de Biogás producido; R.M.: Rendimiento de Metano; A_{parcial}: Alcalinidad parcial; A_{intermedia}: Alcalinidad intermedia; A_{total}: Alcalinidad total. Todas las alcalinidades están expresadas en mg/L de NaHCO₃ y los AGVs en mg/L de H₃COOH.

Como se puede observar en la Figura 3.4 a) y b), el mayor contenido de metano en el biogás (84%) se encontró en la carga orgánica de 17.05 Kg DQO/m³-día, alcanzando una producción de 16 litros de biogás al día y un rendimiento de metano de 0.40 m³ CH₄/ Kg DQO_{rem}.

En las cargas orgánicas de 7.27 y 11.67 Kg DQO/m³-día se registraron rendimientos de metano ligeramente mayores al alcanzado en la de 17.05 Kg DQO/m³-día (0.43 y 0.42 CH₄/ Kg DQO_{rem} respectivamente), sin embargo, los tiempos de retención hidráulica son 15 y 10 días respectivamente, lo que se traduce en la necesidad de reactores con un mayor volumen para el tratamiento de un caudal específico de vinazas y por lo tanto un mayor costo y tiempo para llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia de este tipo de residuo. De igual forma, en estas cargas orgánicas el porcentaje de remoción de DQO fue de 58% y el contenido de metano fue 74 y 75% para 7.27 y 11.67 Kg DQO/m³-día respectivamente, los cuales son valores menores a los alcanzados en 17.05 Kg DQO/m³-día.

En la Figura 3.4 a) se aprecia que el porcentaje de remoción de DQO en las tres

primeras cargas orgánicas empleadas se mantuvo en un valor constante de 58% y fue a partir de 14.74 Kg DQO/m³-día cuando un incremento en la remoción fue observado, obteniéndose como valores máximos 69% y 66% correspondiendo a 18.55 y 17.05 Kg DQO/m³-día respectivamente. Posteriormente, al alcanzar un valor de 22.16 Kg DQO/m³-día la remoción descendió a 59%, indicando un deterioro en el proceso. En la Figura 3.4 b), se puede ver que la producción de biogás presentó un comportamiento de incremento lineal hasta la carga orgánica de 17.05 Kg DQO/m³-día y fue a partir de 18.55 Kg DQO/m³-día, cuando se observó un aumento drástico.

De acuerdo a los valores obtenidos, la carga orgánica de 18.55 Kg DQO/m³-día presentó una mayor remoción de DQO y producción de biogás en comparación con 17.05 Kg DQO/m³-día, sin embargo, el rendimiento y contenido de metano fue menor, por lo que se consideró que existió una inhibición sobre las arqueas metanogénicas presentes en el reactor pero no sobre los demás microorganismos de la digestión anaerobia. El incremento en la producción de biogás se atribuyó a la actividad de las bacterias fermentativas y reductoras de sulfatos, las cuales utilizaron la materia orgánica presente en las vinazas para la producción de CO₂ y H₂S, por lo tanto, el valor de remoción de DQO no presentó una disminución a este valor de carga orgánica.

Como se puede observar en la Tabla 3.3, el pH del reactor disminuyó a una carga orgánica de 22.16 Kg DQO/m³-día hasta alcanzar un valor de 6.57, además, se obtuvo solamente un 32% de contenido de metano en el biogás. Todos estos resultados nos indican que a partir de una carga orgánica de 18.55 Kg DQO/m³-día se observó la disminución del desempeño del RANMAL y a la carga de 22.16 el sistema colapsó.

Un aspecto importante en la disminución del desempeño del reactor puede ser atribuido a la reducción del sulfato, presente en las vinazas, a sulfuro. Este último tiene la capacidad de inhibir el metabolismo de las arqueas metanogénicas y como consecuencia disminuye la remoción de DQO y el rendimiento de metano [79, 87]. Como se puede ver en la Figura 3.4 b) y c) el sulfuro está inversamente relacionado con el rendimiento de metano, ya que al disminuir la concentración del sulfuro el rendimiento de metano aumenta. Es importante resaltar que durante todo el período de funcionamiento del RANMAL, la concentración de sulfuro presentó valores superiores al intervalo de inhibición de 30-250 mg/L encontrado en la literatura [92], donde el mayor contenido de metano en el biogás (84%) se obtuvo a una concentración de 275 mg/L y fue hasta 360 mg/L en la última carga orgánica cuando presentó un importante efecto negativo sobre el

rendimiento del metano. Por lo que podemos afirmar que los microorganismos presentes en este estudio son altamente tolerantes al ion sulfuro, presentando buenos rendimientos incluso a una alta concentración del mismo.

Al analizar todos los datos obtenidos, podemos asumir que la carga óptima es 17.05 Kg DQO/m³-día, ya que en ésta se encontró el mayor porcentaje de metano en el biogás (84%), no mostró inhibición de las arqueas metanogénicas y presentó un rendimiento de metano de 0.40 m³ CH₄/ Kg DQO_{rem}, con un menor TRH de 7.5 días.

Tabla 3.4. Comparación del tratamiento de vinazas por diferentes autores

Características del sistema	C.O.	TRH	%DQO _{rem}	% CH ₄	R.M.	Referencia
Tratamiento de vinazas concentradas de la producción de whisky, utilizando un RANMAL a escala laboratorio, operado a condiciones mesofílicas.	12.25	3.5	90	nd	nd	[105]
Tratamiento de vinazas de etanol hidratado diluidas por medio de un RANMAL a escala piloto, operado a condiciones termofílicas.	19.00	0.5	40	nd	0.29	[53]
Tratamiento de vinazas diluidas de la producción de cerveza, utilizando un RANMAL a escala laboratorio, operado a condiciones mesofílicas.	1.53	0.75	91	67	0.32	[108]
Tratamiento de vinazas diluidas de la producción de cerveza, utilizando un RANMAL a escala piloto, operado a condiciones mesofílicas.	7.00	3.5	95	85	0.30	[145]
Tratamiento de vinazas de etanol hidratado diluidas por medio de un reactor híbrido (RANMAL-filtro) a escala laboratorio, operado a condiciones mesofílicas.	8.70	5	79	66	0.34	[107]
Tratamiento de vinazas de vino diluidas por medio de un reactor híbrido (RANMAL-filtro) a escala piloto operado a condiciones mesofílicas.	13	7	96	74	0.33	[141]
Tratamiento de vinazas de etanol hidratado concentradas por medio de un reactor RANMAL modificado a escala laboratorio, operado a condiciones mesofílicas.	17.05	7.5	66	84	0.40	Este estudio

nd= dato no disponible

C.O.= Carga orgánica (Kg DQO/m³-día); TRH=Tiempo de retención hidráulico (días); DQO_{rem}=DQO removido; R.M.= Rendimiento de metano (m³ CH₄/Kg DQO_{rem})

Los resultados obtenidos referentes a la carga óptima del RANMAL en este estudio se comparan favorablemente con respecto a los estudios de otros autores de acuerdo a la Tabla 3.4. Debido a que obtuvimos un mayor rendimiento de metano ($0.40 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 / \text{Kg DQO}_{\text{rem}}$) y alto porcentaje de metano en el biogás (84%), el cual solo fue menor al valor proporcionado por Öktem y Tüfekci [145], quienes trabajaron con vinazas diluidas menos complejas de la producción de cerveza. El alto rendimiento de metano en nuestro estudio, se atribuyó a la retención de sólidos presentes por medio del sedimentador de alta tasa, lo que evita un lavado del reactor manteniendo de esta forma los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia.

Harada *et al* [53] utilizaron una carga orgánica de $19 \text{ Kg DQO}/\text{m}^3\text{-día}$ para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado alcanzando solamente una remoción del 40% de DQO, muy por debajo a la obtenida en este estudio, aún cuando éste utilizó condiciones termofílicas, las cuales presenta varios beneficios entre los que se encuentra un incremento en la solubilidad de los compuestos orgánicos y mejora en la velocidad de reacción biológica y química [79]. Como se puede apreciar en la Tabla 3.4, los trabajos que presentaron altos rendimientos de remoción de DQO se encuentran en el tratamiento de vinazas provenientes de la producción de bebidas alcohólicas como el vino, whisky y la cerveza, por lo que podemos asumir que los bajos rendimientos alcanzados en nuestro estudio son debido a la alta complejidad de las vinazas utilizadas.

El TRH de nuestro estudio se encuentra en los valores superiores de los proporcionados por estudios previos, debido a que las vinazas fueron alimentadas al RANMAL sin previa dilución, lo que hace que la carga orgánica sea elevada a bajos gastos introducidos (L/día). Esto nos permite ahorrar recursos hídricos y reducir los volúmenes del efluente del RANMAL descargados al medio ambiente, durante el tratamiento de un volumen específico de vinaza concentrada.

3.3.3. Caracterización del efluente obtenido a la carga óptima

La caracterización físico-química de las vinazas empleadas y el efluente obtenido después del tratamiento anaerobio en la carga óptima se encuentra en la Tabla 3.5, donde se puede observar que la mayoría de los parámetros evaluados presentaron un porcentaje de remoción. La concentración de nitrógeno amoniacal y sulfuro fueron los

parámetros que mostraron un incremento, debido a que éstos provienen de la degradación del nitrógeno orgánico y sulfatos respectivamente [87, 107], por lo tanto el incremento en el efluente era esperado.

Tabla 3.5. Caracterización de vinaza y efluente en la carga orgánica óptima de este estudio

Parámetro	Vinaza ^a	Efluente ^a	Porcentaje de remoción ^b
pH	4.59	7.22	-
DQO	127,892	43,450	66
SO ₄ ²⁻	5,315	0	100
S ⁻	172	275	-
N _T	1,361	1,160	15
N-NH ₃	118	230	-
N _{org} ³⁻	1,243	930	25
PO ₄ ³⁻	142	117	18
K ⁺	6,742	6,838	-
Etanol	20,467	232	99
Ácido acético	2,602	331	87
Ácido propiónico	2,965	2,283	23
Ácido butírico	0	0	-

^a Todos los valores en mg/L a excepción del pH.

^b El símbolo (-) corresponde a los parámetros que no presentan un porcentaje de remoción o no puede ser calculado.

De acuerdo a la información encontrada en la literatura, las vinazas poseen una alta concentración de potasio y ésta no es reducida por procesos de tratamiento típicos como el aerobio y el anaerobio [146]. Como se puede observar en la Tabla 3.5 el potasio (K⁺) no presentó un porcentaje de remoción, lo cual corroboró que durante la digestión anaerobia la remoción de este elemento no es favorecida. Sirianuntapiboon *et al* [54], en un efluente del tratamiento anaerobio de vinaza encontraron una concentración de potasio de 6,000 mg/L el cual es muy cercano a 6,838 mg/L obtenido en nuestro estudio. Información acerca del efecto del potasio presente en vinazas sin y con tratamiento anaerobio sobre suelos es limitada, pero en general, el potasio de estas aguas residuales se ha utilizado como fertilizante encontrándose una mejora en las propiedades físicas del mismo. Sin embargo, la influencia sobre la estructura del suelo al disponer efluentes con un alto contenido de potasio no se entiende con claridad y más investigación sobre este tema es necesario [146]

Una completa remoción de sulfatos (SO₄²⁻) se obtuvo en nuestro reactor. Kumar *et al* [107], mostraron que al alcanzar una remoción de 80% del sulfato presente en vinazas de etanol hidrato, la concentración de sulfuro se elevó a 400 mg/L, lo cual, produjo inhibición de los microorganismos y como resultado una disminución en el rendimiento de

metano. Sin embargo, en este estudio aunque la remoción de sulfatos fue del 100%, la cantidad producida de sulfuro fue 275 mg/L, sin tener un efecto negativo sobre los microorganismos y el rendimiento del metano.

La remoción de etanol y ácido acético fueron mayores a la del ácido propiónico, debido a que estos compuestos poseen una tasa de conversión a metano de 3.56 y 3.92 mmol CH₄ por gramo de sólidos volátiles introducidos al día (mmol CH₄/g SV-día) respectivamente, a diferencia del ácido propiónico cuya tasa de conversión es 0.55 mmol CH₄/g SV-día [147]. Esto indica que el ácido propiónico es uno de los AGVs difíciles de degradar por los microorganismos durante la digestión anaerobia. Harada *et al* [53] en un RANMAL operado a 19 Kg DQO/m³-día, obtuvieron una concentración máxima de 300 mg/L de ácido acético y 1,200 mg/L de ácido propiónico, durante esta etapa se alcanzó un rendimiento de metano de 0.29 m³ CH₄/Kg DQO_{rem} y una remoción de DQO de 40%. Por otro lado, Goodwin y Stuart [105] durante el tratamiento de vinazas de whisky, encontraron que a una carga orgánica de 18 Kg DQO/m³-día los niveles de acético y propiónico excedieron 1,000 mg/L y 2,000 mg/L, respectivamente, y la producción de biogás se redujo en un 20% respecto a lo generado cuando el reactor operó a una carga orgánica de 12 Kg DQO/m³-día. En nuestro estudio durante la carga orgánica óptima (17.05 Kg DQO/m³-día), se obtuvo una concentración de 331 mg/L de ácido acético y 2,283 mg/L de ácido propiónico. Se puede observar que el nivel de acético es similar al obtenido por Harada *et al* [53], sin embargo, nuestro rendimiento de metano fue 0.40 m³ CH₄/Kg DQO_{rem} y alcanzó una mayor remoción de DQO (66%), lo que nos indica, que la mayor cantidad del ácido acético presente fue transformado a metano. De igual forma, es evidente que el nivel de propiónico está por arriba de lo reportado por las dos investigaciones anteriormente mencionadas, sin embargo, esto no causó una disminución en la producción de biogás, por el contrario, un incremento del 12% fue alcanzado al compararse con el volumen producido a 14.74 Kg DQO/m³-día, por lo que podemos afirmar que éste no produjo inhibición sobre las arqueas metanogénicas.

En la Tabla 3.6, se encuentra la caracterización de efluentes de distintos trabajos de investigación. Donde, nuestros valores están dentro de los límites inferiores a excepción del potasio. Sin embargo, éste al igual que el nitrógeno total y fosfato han sido utilizados como fertilizantes de suelos y por lo tanto un posible uso de estos como fertirrigantes podría ser evaluado en futuras investigaciones.

Tabla 3.6. Caracterización de efluentes del tratamiento anaerobio de vinazas por otros autores

Parámetro	Referencias ^a				
	[14]	[54]	[55]	[148]	Este estudio
pH	7.8	7.9	8.2	7.5	7.2
DQO	48,500	39,700	54,000	48,500	43,450
SO ₄ ²⁻	4,000	nd	180	3,875	0
N _T	4,100	1,670	1,250	4,284	1160
PO ₄ ³⁻	1,600	70	46	1,625	117
K ⁺	nd	6,000	4,500	nd	6838

^a Todos los valores en mg/L a excepción del pH
nd= dato no disponible

3.4. Identificación de grupos bacterianos y arqueas metanogénicas

Los grupos bacterianos y metanógenos presentes en el RANMAL fueron identificados al alcanzar la carga óptima. En la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos mediante la amplificación del ADNr 16S de los Dominios *Bacteria* y *Archaea*.

Tabla 3.7. Grupos microbianos evaluados por PCR

Grupo	Tamaño molecular (pb)	Presencia (+) Ausencia (-)
Dominio <i>Archaea</i>		
<i>Archaea</i>	273	+
Metanógenos	500	+
<i>Methanobacteriales</i>	343	+
<i>Methanosarcinales</i>	354	+
Dominio <i>Bacteria</i>		
<i>Proteobacterias alpha</i>	510	+
<i>Proteobacterias beta</i>	600	+
<i>Proteobacterias gamma</i>	800	+
<i>Proteobacterias delta</i>	230	+
Bacterias gram+ altas en GC	700	-
Bacterias gram+ bajas en GC	1270	+
<i>Bacillus</i>	647	+
Bacterias reductoras de sulfato	100	+
<i>Clostridium</i>	1200	+

pb: pares de bases

Los microorganismos encontrados en digestores anaerobios son muy diversos y pueden variar dependiendo del sustrato y las condiciones de operación empleados en estos bioreactores. Sarti *et al.* [119], realizaron la caracterización de arqueas metanogénicas en un reactor anaerobio a condiciones mesofílicas para el tratamiento de

aguas residuales ricas en sulfatos (3,000 mg/L) encontrando que el género *Methanosaeta* (arquea acetocláticas) y *Methanobacterium* (arquea hidrogenotrófica) son los microorganismos que favorecen la producción de metano. De igual forma, Oude *et al.* [73], hallaron que los mismos géneros mencionados anteriormente favorecieron la producción de metano en el tratamiento de un agua residual que presentaba una relación de DQO/SO₄²⁻ de 9.5. En nuestro estudio, como se puede observar en la Figura 3.5, el Dominio *Archaea* estuvo representado por miembros de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales*, a los cuales corresponden las especies *Methanobacterium* y *Methanosaeta* respectivamente, por lo que se sugiere la presencia de éstas. Este resultado se compara con lo obtenido por Sarti *et al* [119] y Oude *et al* [73], por lo que se atribuye a la presencia de sulfato en las vinazas de alcohol hidratado de nuestro estudio, debido a que presentaron una concentración de 6,742 mg/L, lo que las hace un agua residual rica en sulfatos.

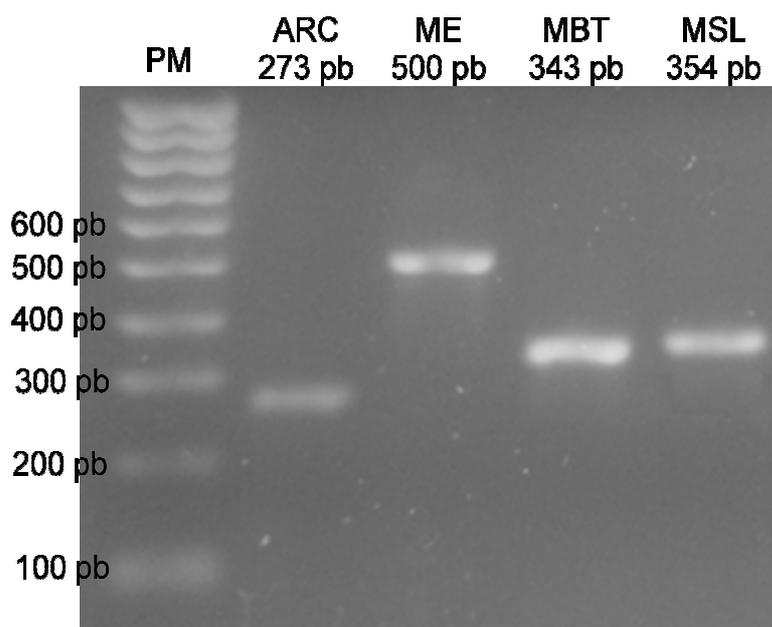


Figura 3.5. Detección del gen ADNr 16S del Dominio *Archaea* en la carga orgánica óptima. La longitud aproximada de los productos de PCR esperados se muestra en la parte superior del gel (en pares de bases). Carriles: P.M, marcador de peso molecular (Bioline, 100–1000 pb); ARC: Dominio *Archaea*; ME: metanógenos; MBT: *Methanobacteriales*; MSL: *Methanosarcinales*.

Delbès *et al* [118], estudiaron la diversidad microbiana de un reactor anaerobio mesofílico durante un período de intoxicación por AGVs y observaron la presencia de las arqueas metanogénicas *Methanobacterium* y *Methanosaeta concilii*, las cuales, pertenecen a los órdenes encontrados en este estudio. Aunque nuestro RANMAL no se encontraba en estado de intoxicación, se puede atribuir que la presencia de estos órdenes de arqueas metanogénicas se debió a la alta carga orgánica a la que fue operado en condiciones óptimas.

Los grupos bacterianos encontrados en este estudio fueron semejantes a los obtenidos en investigaciones previas de identificación microbiana en digestores anaerobios [24, 73, 114, 117, 118, 119, 120, 121]. Donde el grupo de bacterias gram + bajas en GC incluyen al filo *Firmicutes*, el cual, está conformado por un gran número de géneros bacterianos como *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, entre otros. Estos géneros son muy importantes en la digestión anaerobia ya que son los que realizan las etapas de hidrólisis y acidogénesis, por lo tanto en ausencia de los mismos ésta no se podría llevar a cabo [24, 121].

Debido a que las vinazas utilizadas en nuestro estudio eran ricas en sulfatos se pudo observar la presencia de *Proteobacterias delta*, grupo en el cual se incluyen géneros bacterianos capaces de utilizar al sulfato como fuente de sustrato (bacterias reductoras de sulfato) [119, 73]. La presencia de este grupo bacteriano se esperaba, debido a que durante el desempeño del reactor existieron porcentajes de remoción mayores al 95% de los sulfatos presentes en las vinazas, sin embargo, no se mostró un efecto inhibitorio sobre las arqueas metanogénicas ya que se obtuvieron buenos rendimientos de metano y altas concentraciones del mismo en el biogás.

La presencia de *Proteobacterias gamma*, las cuales provienen de fuentes entéricas e incluyen patógenos y patógenos oportunistas [149], se atribuyó al inóculo utilizado, ya que aunque éste provino de un reactor anaerobio para el tratamiento de vinazas, inicialmente fue una mezcla de excretas porcinas, vacunas y suelo profundo.

La ausencia de bacterias gram positivas altas en GC, conocidas por ser principalmente patógenas, dentro del reactor resulta ser benéfico para futuros usos del efluente obtenido de este proceso.

Conclusiones

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo se pudo apreciar los siguientes puntos:

1. El prototipo RANMAL empleado en este estudio, puede ser exitosamente empleado para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado. Alcanzando una carga óptima de 17.05 Kg DQO/m³-día.
2. La carga óptima obtenida en este estudio, demostró que el porcentaje de remoción de DQO fue 66%, produciendo un biogás con 84% en metano y alcanzando un rendimiento de metano de 0.40 m³ CH₄/ Kg DQO_{rem}. El cuál es superior a los rendimientos proporcionados por investigaciones previas.
3. El tipo de flujo dentro del prototipo RANMAL de este estudio fue de mezcla completa, lo que favoreció al contacto entre microorganismos y sustrato.
4. Las vinazas de etanol hidratado obtenidas, presentaron una caracterización físico-química más compleja al compararlas con los datos de caracterización de vinazas obtenidas del proceso de bebidas alcohólicas.
5. El RANMAL modificado presentó un tiempo de arranque de 9 días, el cual se considera corto al ser comparado con otros estudios, debido a las características y procedencia del lodo de inoculación.
6. El efluente obtenido del tratamiento anaerobio, presentó una reducción en la DQO, sulfato, nitrógeno total, nitrógeno orgánico, fosfato, etanol, ácido acético y ácido propiónico en comparación con la vinaza utilizada como sustrato. Por lo tanto, este efluente presenta mejores características para su posible utilización como fertirrigante en un futuro.
7. Se sugiere que la producción de metano en el RANMAL fue favorecida por la presencia de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales* detectados mediante PCR.

8. El grupo de las bacterias gram positivas altas en GC no fue detectado en este trabajo, lo que favorecería a futuro el uso de dicho efluente en actividades de fertirrigación.

Perspectivas

Aunque los resultados obtenidos en este estudio fueron buenos, se proponen los siguientes puntos para mejorar en futuras investigaciones:

1. Identificar, cuantificar y determinar la actividad metabólica del consorcio microbiano presente en el RANMAL a condiciones óptimas de operación a partir de vinazas de etanol hidratado, con el propósito de disminuir los tiempos de arranque y mejorar el desempeño de operación.
2. Evaluar la posible aplicación del efluente del RANMAL en fertirrigación de cultivos para la producción de etanol y de esta forma generar un proceso integral en el ciclo de producción del mismo.
3. Realizar un escalamiento a escala real, utilizando una alimentación en continuo.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Renewable Fuels Association. *Ethanol Industry Outlook*. Obtenido de: www.ethanolrfa.org/industry/outlook/RFAoutlook2010_fin.pdf, 2010.
2. PEMEX. *Uso de etanol como oxigenante en gasolinas*. Obtenido de: www.pemex.com/files/content/etanol.pdf, 2008.
3. SENER. *Programa de Introducción de Bioenergéticos*. Obtenido de: <http://www.energia.gob.mx/webSener/res/0/Prog%20Introd%20Bioen.pdf>, 2009.
4. Y. Satyawali; M. Balakrishnan, Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review, *Journal of Environmental Management*. 86, 481-497, 2008.
5. J. Beltran; J. Dominguez; E. Partido, Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasses), *Water Science and Technology*. 51, 159-166, 2005.
6. A. Jiménez; R. Borja; A. Martín; F. Raposob, Kinetic analysis of the anerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*, *Journal of Environmental Management*. 80, 303-310, 2006.
7. D. Pant; A. Adholeya, Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review, *Bioresource Technology*. 98, 2321-2334, 2007.
8. M. Bustamante; C. Paredes; R. Moral; J. Moreno; A. Pérez; M. Pérez, Uses of winery and distillery effluents in agriculture: characterization of nutrient and hazardous components, *Water Science and Technology*. 51, 145-151, 2005.
9. F. Espinoza; C. Pelayo; J. Corona; Y. González; A. Bories; H. Gutiérrez, Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane, *Biomass and Bioenergy*. 33, 14-20, 2008.
10. V. Parnaudeau; N. Condom; R. Oliver; P. Cazevielle; S. Recous, Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes, *Bioresource Technology*. 99, 1553-1562, 2008.

11. F. Benitez; F. Real; J. Acero; J. Garcia; M. Sanchez, Kinetics of ozonation and aerobic biodegradation of wine vinasses in discontinuous and continuous processes, *Journal of Hazardous Materials. B101*, 203-218, 2003.
12. R. Sowmeyan; G. Swaminathan, Effluent treatment process in molasses-based distillery industries: A review, *Journal of Hazardous Materials. 152*, 453-462, 2008.
13. J. Shayegan; M. Pazouki; A. Afshari, Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater, *Process Biochemistry. 40*, 1323-1329, 2005.
14. S. Mohana; B. Acharya; D. Madamwar, Review: Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications, *Journal of Hazardous Materials. 163*, 12-25, 2009.
15. R. K. Prasad; S. N. Srivastava, Electrochemical degradation of distillery spent wash using catalytic anode: Factorial design of experiments, *Chemical Engineering Journal. 146*, 22-29, 2009.
16. C. H. Thakur; V. C. Srivastava; I. D. Mall, Electrochemical treatment of a distillery wastewater: Parametric and residue disposal study, *Chemical Engineering Journal. 148*, 496-505, 2009.
17. P. Chairattanamanokorn; T. Imai; R. Kondo; M. Sekine; T. Higuchi; M. Ukita, Decolorization of alcohol distillery wastewater by thermotolerant white rot fungi, *Applied Biochemistry and Microbiology. 41*, 583-588, 2005.
18. P. Piya-areetham; K. Shenchunthichai; M. Hunsom, Application of electrooxidation process for treating concentrated wastewater from distillery industry with a voluminous electrode, *Water Research. 40*, 2857-2864, 2006.
19. T. Sreethawong; S. Chavadej, Color removal of distillery wastewater by ozonation in the absence and presence of immobilized iron oxide catalyst, *Journal of Hazardous Materials. 155*, 486-493, 2008.
20. A. Wilkie; K. Riedesel; J. Owens, Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, *Biomass and Bioenergy. 19*, 63-102, 2000.
21. S., Pipatmanomai; S., Kaewluan; T. Vitidsant, Economic assessment of biogas-to-electricity system with H₂S removal by activated carbon in small farm, *Applied Energy. 86*, 669-674, 2009.
22. D. Chynoweth; J. Owens; R. Legrand, Renewable methane from anaerobic digestion of biomass, *Renewable Energy. 22*, 1-8, 2001.

23. P. Claassen; J. van Lier; A. Lopez; E. van Niel; L. Sijtsma; A. Stams; S. de Vries, Utilisation of biomass for the supply of energy carriers, *Microbiology Biotechnology*. 52, 741-755, 1999.
24. M. Kröber; T. Bekel; N. Diaz; A. Goesmann; S. Jaenicke; L. Krause; D. Miller; K. Runte; P. Viohöver; A. Pühler; A. Schlüter, Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing, *Journal of Biotechnology*. 142, 38-49, 2009.
25. M. Song; S. Shin; S. Hwang, Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater, *Bioresource Technology*. 101, S23-S28, 2010.
26. T. Janhom; S. Wattanachira; P. Pavasant, Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis, *Journal of Environmental Management*. 90, 1184-1190, 2009.
27. N. Nishio; Y. Nakashimada, Review recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes, *Journal of bioscience and bioengineering*. 103, 105-112, 2007.
28. C. Cardona; O. Sánchez, Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities, *Bioresource Technology*. 98, 2415-2457, 2007.
29. K. Stemme; B. Gerdes; A. Harms; J. Kamphues, Beet-vinasses (condensed molasses solubles) as an ingredient in diets for cattle and pigs-nutritive value and limitations, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89, 179-183, 2005.
30. B. Reddy; S. Ramesh; P. Reddy; B. Ramaiah; P. Salimath; R. Kachapur, Sweet sorghum- a potential alternate raw material for bio-ethanol and bioenergy, *International Sorghum and Millets Newsletter*. 46, 79-86, 2005.
31. M. Perez; R. Rodriguez; L. Romero; D. Sales, Anaerobic thermophilic digestion of cutting oil wastewater: Effect of co-substrate, *Biochemical Engineering Journal*. 29, 250-257, 2006.
32. A. Vlyssides; E. Barampouti; S. Mai, Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries, *Water Science and Technology*. 51, 53-60, 2005.
33. X. Melamane; P. Strong; J. Burgess, Treatment of wine distillery wastewater: A review with emphasis on anaerobic membrane reactors, *South African Journal for Enology and Viticulture*. 28, 25-36, 2007.

34. C. Baez-Smith, Anaerobic Digestion of Vinasses for the Production of Methane in the Sugar Cane Distillery, *SPRI Conference on Sugar Processing*. 268-287, 2006.
35. H. Pathak; C. Joshi; A. Chaudrary; R. Chaudrary; N. Kalra; M. Dwiwedi, Soil amendment with distillery effluent for wheat and rice cultivation, *Water, Air and Soil Pollution*. 113, 133-140, 1999.
36. M. Hutnan; M. Hornak; I. Bodík; V. Hlavacka, Anaerobic treatment of wheat stillage, *Chemical and Biochemical Engineering*. 17, 233-241, 2003.
37. M. Decloux; A. Bories; R. Lewandowski; C. Fargues; A. Mersad; M. Lameloise; F. Bonnet; B. Dherbecourt; L. Nieto, Interest of electro dialysis to reduce potassium level in vinasses. Preliminary experiments. *Desalination*. 146, 393-398, 2002.
38. CIATEJ A.C, Ciencia y tecnología del tequila; avances y perspectivas, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Mexico, 2004, 250.
39. H. Orendain, Process for the treatment of stillage generated by distillation in the tequila industry, European Patent Application, EP1690926. 2006.
40. K. Ilangoan; J. Linerio; R. Briones; A. Noyola, Anaerobic treatment of tequila vinasse. In: E.J. Olguin, G. Sanchez, E. Hernandez (Eds.), *Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses*, Taylor & Francis Publishers, London 2000, pp. 101-106, 2000.
41. R. Bothast; M. Schlicher, Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67, 19-25, 2005.
42. K. Rausch; R. Belyea, The future of coproducts from corn processing, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 128, 47-86, 2006.
43. C. Liu; B. Hu; S. Chen; R. Glass, Utilization of condensed distillers solubles as nutrients supplement for production of Nisin and Lactic Acid from whey, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 137, 875-884, 2007.
44. R. Belyea; T. Clevenger; V. Singh; M. Tumbleson; K. Rausch, Element concentrations of dry-grind corn-processing streams, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 134, 113-128, 2006.
45. M. Tucker; N. Nagle; E. Jennings; K. Ibsen; A. Aden; Q. Nguyen; K. Kim; S. Noll, Conversion of distiller's grain into fuel alcohol and higher-value animal feed by dilute-acid pretreatment, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 113, 1139-1159, 2004.

46. A. Mustafa; J. McKinnon; M. Ingledew; D. Christensen, The nutritive value for ruminants of thin stillage and distiller's grains derived from wheat, rye, triticale and barley, *Journal of the science of food and agriculture*. 80, 607-613, 2000.
47. K. Sosulski; S. Wang; W. Ingledew; F. Sosulski; J. Tang, Preprocessed barley, rye and triticale as a feedstock for an integrated fuel ethanol-feedlot plant, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 63, 59-70, 1997.
48. W. Lee; F. Sosulski; S. Sokhansanj, Yield and composition of soluble and insoluble fraction from corn and wheat stillages. *Cereal Chemistry*. 68, 559-562, 1991.
49. M. Rabinovich, Ethanol production from materials containing cellulose: The potential of russian research and development, *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42, 1-26, 2006.
50. M. Taherzadeh; K. Karimi, Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A Review, *Bioresources*. 2, 472-499, 2007.
51. K. Bhavik; S. Mohana; D. Madamwar, Anaerobic treatment of distillery spent wash - A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor, *Bioresource Technology*. 99, 4621-4626, 2008.
52. A. Bories; J. Raynal, Anaerobic digestion of high-strength distillery wastewater (cane molasses stillage) in a fixed-film reactor, *Biological Wastes*. 67, 251-267, 1988.
53. H. Harada; S. Uemura; A. Chen; J. Jayadevan, Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor, *Bioresource Technology*. 55, 215-221, 1996.
54. S. Sirianuntapiboon; P. Phothilangka; S. Ohmomo, Decolorization of molasses wastewater by a strain No. BP103 of acetogenic bacteria, *Bioresource Technology*. 92, 31-39, 2004.
55. T. Tondee; S. Sirianuntapiboon, Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861, *Bioresource Technology*. 99, 6258-6265, 2008.
56. T. Tondee; S. Sirianuntapiboon; S. Ohmomo, Decolorization of molasses wastewater by yeast strain *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246, *Bioresource Technology*. 99, 5511-5519, 2008.
57. D. Pant; A. Adholeya, Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under state fermentation, *Biodegradation*. 18, 647-659, 2007.

58. S. Sirianuntapiboon; P. Zohsalam; S. Ohmomo, Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6, *Process Biochemistry*. 39, 917-924, 2004.
59. D. F. Kalavathi; L. Uma; G. Subramanian, Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181, *Enzyme and Microbial Technology*. 29, 246–251, 2001.
60. L. Valderrama; C. Del Campo; C. Rodríguez; L. de Bashan; Y. Bashan, Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemma minuscula*, *Water Research*. 36, 4185-4192, 2002.
61. Y. Satyawali; M. Balakrishnan, Removal of color from biomethanated distillery spentwash by treatment with activated carbons, *Bioresource Technology*. 98, 2629-2635, 2007.
62. V. Migo; M. Matsumara; E. Rosario; H. Kataoka, Decolorization of molasses wastewater using an inorganic flocculant, *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75, 438-442, 1993.
63. P. C. Sangave; P. R. Gogate; A. B. Pandit, Combination of ozonation with conventional aerobic oxidation for distillery wastewater treatment, *Chemosphere*. 68, 32-41, 2007.
64. P. Manisankar; S. Viswanathan; C. Rani, Electrochemical treatment of distillery effluent using catalytic anodes, *Green Chemistry*. 5, 270-274, 2003.
65. N. Kannan; G. Karthikeyan; N. Tamilselvan, Comparison of treatment potential of electrocoagulation of distillery effluent with and without activated Areca catechu nut carbon, *Journal of Hazardous Materials*. 137, 1803-1809, 2006.
66. A. Ward; P. Hobbs; P. Holliman; D. Jones, Optimisation of the anaerobic digestion of agriculture resource, *Bioresource Technology*. 99, 7928-7940, 2008.
67. B. Demirel; P. Scherer, The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 7, 173-190, 2008.
68. B. Zhang; P.J. He; F. Lü; L.M. Shao; P. Wang, Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes, *Water Research*. 41, 4468-4478, 2007.

69. D. Y. Cheong; C. L. Hansen, Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen, *Process Biochemistry*. 41, 1736-1745, 2006.
70. E. Salminen; J. Rintala, Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste- a review, *Bioresource Technology*. 83, 13-26, 2002.
71. Y. Q. Nie; H. Liu, G. C. Du; J. Chen, Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system, *Bioresource Technology*. 99, 2989-2995, 2008.
72. Y. Q. Nie; H. Liu, G. C. Du; J. Chen, Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process, *Process Biochemistry*. 42, 599-605, 2007.
73. S. Oude; W. Vorstman; A. Sopjes; A. Stams, Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater, *FEMS Microbiology Ecology*. 27, 185-194, 1998.
74. C. Y. Lin; K. Sato; T. Noike; J. Matsumoto, Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids, *Water Research*. 20, 385-394, 1986.
75. P. L. McCarty; D. P. Smith, Anaerobic wastewater treatment, *Environmental Science and Technology*. 20, 1200-1206, 1986.
76. J. L. Garcia; B. Patel; B. Ollivier, Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*, *Anaerobe*. 6, 205-226, 2000.
77. W. Whitman; T. Bowen; D. Boone, The methanogenic bacteria, *Prokaryotes*. 3, 165-207, 2006.
78. B. Montero; J.L. Garcia; D. Sales; R. Solera, Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion, *Bioresource Technology*. 99, 3233-3243, 2008.
79. L. Appels; J. Baeyens; J. Degève; R. Dewil, Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge, *Progress in Energy and Combustion Science*. 34, 755-781, 2008.
80. G. Lettinga; S. Rebac; G. Zeeman, Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment, *TRENDS in Biotechnology*. 19, 363-370, 2001.
81. S. Connaughton; G. Collins; V. O'Flaherty, Psychrophilic and mesophilic anaerobic digestion of brewery effluent: A comparative study, *Water Research*. 20, 2503-2510, 2006.

82. S. Sung; T. Liu, Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion, *Chemosphere*. 53, 43-52, 2003.
83. R. Disdale; F. Hawkes; D. Hawkes, Comparison of mesophilic and thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors treating instant coffee production wastewater, *Water Research*. 31, 163-169, 1997.
84. A. Trzcinski; D. Stuckey, Treatment of municipal solid waste leachate using a submerged anaerobic membrane bioreactor at mesophilic and psychrophilic temperatures: Analysis of recalcitrants in the permeate using GC-MS, *Water Research*. 44, 671-680, 2010.
85. J. P. Kotzé; P. G. Thiel; W.H.J. Hattingh, Anaerobic digestion II. The characterization and control of anaerobic digestion, *Water Research*. 3, 459-494, 1969.
86. R. E. Moosbrugger; M. C. Wentzel; G. A. Ekama; Gv. R. Marais, Weak acid/bases and pH control in anaerobic systems- A review, *Water SA*. 19, 1-10, 1993.
87. Y. Chen; J.J. Cheng; K.S. Creamer, Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresource Technology*. 99, 4044-4064, 2008.
88. R. Leitao; A. van Haandel; G. Zeeman; G. Lettinga, The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review, *Bioresource Technology*. 97, 1105-1118, 2006.
89. M.C. Sterling; R.E. Lacey; C.R. Engler; S.C. Ricke, Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure, *Bioresource Technology*. 77, 9-18, 2001.
90. P. P. Karhadkar; J. Audic; G. M. Faup; P. Khanna, Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis, *Water Resource*. 21, 1061-1066, 1987.
91. L. Nevatalo; A. Mäkinen; A. Kaksonen; J. Puhakka, Biological hydrogen sulfide production in an ethanol-lactate fed fluidized-bed bioreactor, *Bioresource Technology*. 101, 276-284, 2010.
92. D. Cirne; F. van der Zew; M. Fernández; F. Fernández, Control of sulphide during anaerobic treatment of S-containing wastewaters by adding limited amounts of oxygen or nitrate, *Review in Environmental Science and Biotechnology*. 7, 93-105, 2008.

93. L. Seghezzi; G. Zeeman; J. van Lier; H.V. Hamelers; G. Lettinga, A review: The anaerobic treatments of sewage in UASB and EGSB reactors, *Bioresource Technology*. 65, 175-190, 1998.
94. S. P. Singh; P. Prerna, Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13, 1569–1575, 2009.
95. M. Switzenbaum, Anaerobic fixed film wastewater treatment, *Enzyme and Microbial Technology*. 5, 242-250, 1983.
96. K.V. Rajeshwari; M. Balakrishnan; A. Kansal; K. Lata; V.V.N. Kishore, State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 4, 135-156, 2000.
97. J. K. Cho; S. K. Beom; C. P. Soon; S. C. Yong, N. C. Ho, Effect of stepwise seeding on the performance of four anaerobic biofilters treating a synthetic stillage waste, *Biomass and Bioenergy*. 10, 25-35, 1996.
98. J.K. Jhung; E. Choi, A comparative study of uasb and anaerobic fixed film reactors with development of sludge granulation, *Water Resource*. 29, 271-277, 1995.
99. N. Fernández; S. Montalvo; R. Borja; L. Guerrero; E. Sánchez; I. Cortés; M.F. Colmenarejo; L. Travieso; F. Raposo, Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater, *Renewable Energy*. 33, 2458-2466, 2008.
100. M. Pérez; L. Romero; R. Rodríguez; D. Sales, High rate anaerobic thermophilic Technologies for distillery wastewater treatment. *Water Science and Technology*. 51, 191-198, 2005.
101. M. Gao; Z. She; C. Jin, Performance evaluation of a mesophilic (37°C) upflow anaerobic sludge blanket reactor in treating distiller's grains wastewater, *Journal of Hazardous Materials*. 141, 808-813, 2007.
102. F. Feroso; J. Bartacek; S. Jansen; P. Lens, Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application, *Science of the Total Environment*. 407, 3652-3667, 2009.
103. L. Hulshoff; S. de Castro; G. Lettinga; P. Lens, Anaerobic sludge granulation, *Water Research*. 38, 1376-1389, 2004.
104. J. Steyer; P. Buffière; D. Rolland; R. Moletta, Advanced control of anaerobic digestion processes through disturbances monitoring, *Water Resource*. 33, 2059-2068, 1999.

105. J. Goodwin; J.B. Stuart, Anaerobic digestion of malt whisky distillery pot ale using upflow anaerobic sludge blanket reactors, *Bioresource Technology*. 49, 75-81, 1994.
106. N. Uzal; C. Gokacay; G. Demirer, Sequential anaerobic/aerobic biological treatment of malt whisky wastewater, *Process Biochemistry*. 39, 279-286, 2003.
107. G. Kumar; S. Gupta; G. Singh, Biodegradation of distillery spent wash in anaerobic hybrid reactor, *Water Research*. 41, 721-730, 2007.
108. C. Cronin; K. V. Lo, Anaerobic treatment of brewery wastewater using UASB reactors seeded with activated sludge, *Bioresource Technology*. 64, 33-38, 1998.
109. O. Levenspiel, Chemical Reaction Engineering, Third Edition, Londres: Wiley. 257-272, 1999.
110. R. Moreira; A. Pinto; R. Mesnier; J. Leclerc, Influence of inlet positions on the flow behavior inside a photoreactor using radiotracers and colores tracer investigations, *Applied Radiation and Isotopes*. 65, 419-427, 2007.
111. G. Talbot; E. Topp; M. F. Palin; D. I. Massé, Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors, *Water Research*. 42, 513-537, 2008.
112. J. L. Sanz; T. Köchling, Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview, *Process Biochemistry*. 42, 119-133, 2007.
113. T. Narihiro; Y. Sekiguchi, Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update, *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 273-278, 2007.
114. G. Collins; A. Woods; S. McHugh; M.W. Carton; V. O'Flaherty, Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters, *FEMS Microbiology Ecology*. 46, 159-170, 2003.
115. M. Rodicio; M. Mendoza, Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Química*. 22, 238-245, 2004.
116. M. T. Madigan; J. M. Martinko; J. Parker, Brock. Biología de los Microorganismos. España. 8va Edición. Ed. Prentice Hall. 986 pp. 1998.
117. A. M. Enright; G. Collins; V. O'Flaherty, Temporal microbial diversity changes in solvent-degrading anaerobic granular sludge from low-temperature (15°C)

- wastewater treatment bioreactors, *Systematic and Applied Microbiology*. 30, 471-482, 2007.
118. C. Delbès; R. Moletta; J. J. Godon, Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem, *FEMS Microbiology Ecology*. 35, 19-26, 2001.
119. A. Sartí; E. Pozzi; F.A. Chinalia; A. Ono; E. Foresti, Microbial processes and bacterial populations associated to anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater, *Process Biochemistry*. 45, 164-170, 2010.
120. H. D. Ariesyady; T. Ito; S. Okabe, Functional bacterial and archeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester, *Water Research*. 41, 1554-1568, 2007.
121. M. Chachkhiani; P. Dabert; T. Abzianidze; G. Partskhaladze; L. Tsiklauri; T. Dudauri; J. J. Godon, 16S rDNA characterisation of bacterial and archeal communities during star-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure, *Bioresource Technology*. 93, 227-232, 2004.
122. M. Klocke; E. Nettmann; I. Bergmann; K. Mundt; K. Souidi; J. Mumme; B. Linke. Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass, *Systematic and Applied Microbiology*. 31, 190-205, 2008.
123. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA. 2005.
124. L. M. Alzate; P. J. Sebastian; A. Pérez; D. Eapen, Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater, *International Journal of Hydrogen Energy*. 32, 3141-3146, 2007.
125. H. M. Poggi; R. Rodríguez; G. Fernández; F. Esparza, Inhibition of mesophilic solid substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47, 284-291, 1997.
126. H.M. Poggi; J.A. Oleszkiewicz, Anaerobic co-composting of municipal solid waste sludge at high total solid levels, *Environmental Technology*. 13, 409-421, 1992.

127. F. M. Ausubel; R. Brent; R.E Kingston; D. D. Moore; J. G. Seidman; J. A. Smith; K. Struhl, Short Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates, *John Wiley & Sons*, 1992.
128. Y. Yu; C. Lee; J. Kim; S. Hwang, Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*. 89, 670–679, 2005.
129. N. Bauer, S.A. Microbial Diversity Course. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA. 1996.
130. G. Hernández-Zárate; J. Olmos-Soto, Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 100, 664–672, 2006.
131. M. R. Peña; D. D. Mara; G. P. Avella, Dispersion and treatment performance analysis of an UASB reactor under different hydraulic loading rates, *Water Research*. 40, 445-452, 2006.
132. J. M. Ottino, Mixing, chaotic advection, and turbulence, *Annual Review of Fluid Mechanics*. 22, 207-253, 1990.
133. P. M. Heertjes; L. J. Kuijvenhoven, Fluid flow pattern in upflow reactors for anaerobic treatment of beet sugar factory wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*. 24, 443–459, 1982.
134. S. J. Lou; B. Tartakovsky; Y. Zeng; P. Wu; S. R. Guiot, Fluorescence-based monitoring of tracer and substrate distribution in an UASB reactor, *Chemosphere*. 65, 1212-1220, 2006.
135. G. K. Anderson; C. M. Campos; C. A. Chernicharo; L. C. Smith, Evaluation of the inhibitory effects of lithium when used as a tracer for anaerobic digesters, *Water Research*. 25, 755-760, 1991.
136. W. Bialas; D. Szymanowska; W. Grajek, Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling, *Bioresource Technology*. 101, 3126-3131, 2010.
137. S. Nitayavardhana; S.K. Khanal, Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient, *Bioresource Technology*, 101. 9078-9085, 2010.
138. A. Robertiello, Upgrading of agricultural and agro-industrial wastes: The treatment of distillery effluents (vinasses) in Italy, *Agricultural Wastes*. 4, 387-395, 1982.

139. W. Parawira; J. S. Read; B. Mattiasson; L. Björnsson, Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion, *Biomass and Bioenergy*. 32, 44-50, 2008.
140. R. P. Singh; S. Kumar; C. S. Ojha, A critique on operational strategies for start-up of UASB reactors: effects of sludge loading rate and seed/biomass concentration, *Biochemical Engineering Journal*. 1, 107-119, 1998
141. F. Molina; G. Ruiz; C. García; E. Roca; J. M. Lema, Winery effluent treatment at an anaerobic hybrid USBF pilot plant under normal and abnormal operation, *Water Science and Technology*. 56, 25-31, 2007.
142. B. Wolmarans; G. de Villiers, Start-up a UASB effluent treatment plant on distillery wastewater, *Water SA*. 28, 63-68, 2002.
143. S. M. Stronach; T. Rudd; J. N. Lester, Start-up of anaerobic bioreactors on high strength industrial wastes, *Biomass*. 13, 173-197, 1987.
144. P.V. Vadlani; K.B. Ramachandran, Evaluation of UASB reactor performance during start-up operation using synthetic mixed-acid waste, *Bioresource Technology*. 99, 8231-8236, 2008.
145. Y. Öktem; N. Tüfekci, Treatment of brewery wastewater by pilot scale upflow anaerobic sludge blanket reactor in mesophilic temperature, *Journal of Scientific & Industrial Research*. 65, 248-251, 2006.
146. M. Arienzo; E.W. Christen; W. Quayle; A. Kumar, A review of the fate of potassium in the soil-plant system after land application of wastewaters, *Journal of Hazardous Materials*. 164, 415-422, 2009.
147. P. Lens; V. O'flaherty; C. Dijkema; E. Colleran; A. Stams, Propionate degradation by mesophilic anaerobic sludge: Degradation pathways and effects of other volatile fatty acids, *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82, 387-391, 1996.
148. S. Mohana; C. Desai; D. Madamwar, Biodegradation and decolourization of anaerobically treated distillery spent wash by a novel bacterial consortium, *Bioresource Technology*. 98, 333-339, 2007.
149. L. Mathieu; C. Bouteleux; S. Fass; E. Angel, J. C. Block, Reversible shift in the α -, β - and γ -proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination, *Water Research*. 43, 3375-3386, 2009.