



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE DIGESTIÓN
ANAEROBIA DE NEJAYOTE EN DOS ETAPAS,
MICROAIREACIÓN Y TRANSFERENCIA DIRECTA DE
ELECTRONES ENTRE ESPECIES MICROBIANAS
UTILIZANDO CARBÓN ACTIVADO GRANULADO COMO
MATERIAL CONDUCTOR

Tesis que presenta

DAVID VALERO MORALES

En opción al título de
DOCTOR EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, octubre 2019

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por otorgarme la beca No. 437101, para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Clúster Biocombustibles Gaseosos perteneciente al Centro Mexicano de Innovación en Bioenergía, proyecto 247006, financiado por el Fondo de Sustentabilidad Energética CONACYT-SENER.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por darme la oportunidad de realizar el proyecto, guiarme en el transcurso del mismo y ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo para mí.

Al Dr. Carlos Rico de la Hera por sus consejos, ayuda, disponibilidad y alta involucración en el desarrollo de la tesis y los artículos.

A la Dra. Blondy Canto Canche y a la Dra. Teresa Vicent Huguet por sus útiles revisiones y consejos a lo largo de la tesis de doctorado.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por su generosidad, ayuda, consejos y apoyo en el desarrollo de la tesis y los artículos.

A la Dra Galdy Hernández Zárate por colaborar en la revisión de tesis y en el examen de grado.

Al Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por su colaboración e implicación tanto en el examen predoctoral como en el examen de grado.

A la Dra. Daisy Pérez Brito por brindarme la posibilidad de utilizar el laboratorio de Gembio.

A la Ingeniera en Energías Renovables Astrid Ebenezer Ek Ricalde y al Ingeniero Ambiental Marco Antonio Villarejo Martínez por el trabajo realizado en el laboratorio y el entusiasmo mostrado por ambos a la hora de llevarlo a cabo.

A los miembros del laboratorio de Gembio en especial a Yazmín Abril Sánchez Rodríguez y a Teresita Valencia Yah por su apoyo técnico en el laboratorio.

A los técnicos, M.C. Jorge Domínguez Maldonado por su dedicación y apoyo en todo el desarrollo de la experimentación, y su capacidad para solucionar cualquier tipo de problema, a la Q.I. Tanit Toledano Thompson por su apoyo técnico y la asistencia otorgada en el uso de los equipos de laboratorio, al I.Q.I. Alberto Cortés Velázquez por

su colaboración y apoyo en el procesamiento de muestras para el análisis de comunidades taxonómicas y al M.C. José Martín Baas López por su apoyo técnico y la asistencia otorgada en el uso de los equipos de laboratorio.

A mi novia, Clare Donnelly, quien supo quererme, comprenderme, ayudarme y motivarme, haciéndolo todo más fácil y posible.

A mis padres por su cariño y ejemplo a lo largo de toda mi vida, sin lo cual este momento nunca hubiera llegado.

A todos mis compañeros de laboratorio en especial a Gerardo Cámara y Rodrigo Moreno por sus ideas que solucionaron muchos problemas y los buenos momentos que pasamos.

A mis amigos Carlos Pacheco y Vladimir Parra por su amistad y ayuda durante toda mi estancia en Mérida.

A mis amigos y compañeros del CICY por su apoyo y por el tiempo que pasamos juntos.

Al CICY y a la Unidad de Energía Renovable por las instalaciones, equipos y materiales prestados durante el proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 GENERACIÓN DE NEJAYOTE Y CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS	3
1.2 TRATAMIENTOS FÍSICOS, FÍSICO-QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL NEJAYOTE	4
1.2.1 TRATAMIENTOS FÍSICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS.....	4
1.2.2 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	5
1.3 DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	7
1.3.1 PROCESOS DE HIDRÓLISIS.....	8
1.3.1.1 OPTIMIZACIÓN DE LA RELACIÓN SUSTRATO-INÓCULO (ISR).....	8
1.3.1.2 MICROAIREACIÓN.....	9
1.3.1.3 ADICIÓN DE HIERRO CERO VALENTE	10
1.3.1.4 HIDRÓLISIS TÉRMICA	12
1.3.2 ENSAYO POTENCIAL DE BIOMETANIZACIÓN (BMP).....	13
1.3.2.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL BMP	13
1.3.2.1.1 PREINCUBACIÓN DEL INÓCULO.....	13
1.3.2.1.2 ISR.....	14
1.3.2.1.3 AGITACIÓN	14
1.3.3 DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DOS ETAPAS Y SUS EFECTOS	15
1.3.3.1 TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO Y VELOCIDAD DE CARGA ORGÁNICA	15
1.3.3.2 RENDIMIENTO DE METANO	16
1.3.4 REACTORES EMPLEADOS	16
1.3.4.1 REACTORES ANAEROBIOS DE COLUMNA EMPACADA (APBR).....	16
1.3.4.1.1 MATERIAL DE EMPACADO	17
1.3.4.1.2 VELOCIDAD DE CARGA ORGÁNICA Y TIEMPO RETENCIÓN HIDRÁULICO.....	19
1.3.4.1.3 TEMPERATURA	19

1.3.4.2 REACTORES ANAEROBIOS DE FLUJOS ASCENDENTE (UASB)	19
1.3.4.2.1 MANTO DE LODOS.....	20
1.3.4.2.2 FACTORES QUE AFECTAN AL FUNCIONAMIENTO	23
1.3.4.2.2.1 VELOCIDAD DE CARGA ORGÁNICA, TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO Y ELIMINACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO).....	24
1.3.4.2.2.2 TEMPERATURA	23
1.3.5 ROL DE MATERIALES CONDUCTORES EN DIGESTIÓN ANAEROBIA	23
1.3.5.1 TRANSFERENCIA DIRECTA DE ELECTRONES ENTRE ESPECIES (DIET).....	23
1.3.5.1.1 TRANSFERENCIA DE ELECTRONES POR PILI MICROBIANOS.....	26
1.3.5.2 SUPERACIÓN DE BARRERAS INHIBITORIAS EN DIGESTIÓN ANAEROBIA	27
1.3.5.2.1 ALTA PRESIÓN PARCIAL DE H ₂ Y CAMBIOS DE PH.....	27
1.3.5.2.2 COMPETENCIA CON BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS.....	29
1.3.5.2.3 ACUMULACIÓN AGV.....	30
1.3.5.3 RENDIMIENTO DE METANO	30
1.3.5.5 BACTERIAS EXOELECTROGÉNICAS Y ARQUEAS ELECTROTRÓFICAS	32
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS.....	34
CAPÍTULO II.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.1 TOMA DE MUESTRAS	35
2.2 CARACTERIZACIÓN NEJAYOTE	35
2.3 INÓCULO.....	35
2.4 CARACTERIZACIÓN CARBÓN ACTIVADO GRANULADO (CAG).....	35
2.5 ENSAYO BMP NEJAYOTE	36
2.6 ENSAYO BMP NEJAYOTE CON CAG.....	39
2.6.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE COMUNIDADES DE BACTERIAS Y ARQUEAS EN ENSAYO BMP CON CAG	40

2.6.1.1 EXTRACCIÓN ADN Y ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS	40
2.6.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	40
2.7 REACTORES EMPLEADOS.....	41
2.7.1 HIDRÓLISIS EN APBR CON Y SIN MICROAIREACIÓN	41
2.7.2 UASB.....	43
2.7.2.1 ARRANQUE DEL UASB CONTROL Y UASB DIET.....	44
2.7.3 ACOPLAMIENTO DE APBR CON MICROAIREACIÓN CON UASB CONTROL Y UASB DIET.	45
2.7.3.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN LOS REACTORES UASB CONTROL Y UASB DIET ACOPLADOS.....	46
2.7.3.1.1 EXTRACCIÓN ADN Y ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS	46
CAPÍTULO III.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
3.1. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL NEJAYOTE E INÓCULO	48
3.2. CARACTERIZACIÓN CARBÓN ACTIVADO GRANULADO.....	50
3.3. ENSAYO BMP NEJAYOTE	52
3.3.1. RENDIMIENTO DE METANO DIARIO	52
3.3.2. RENDIMIENTOS DE METANO ACUMULADOS DE NEJAYOTE, INÓCULO Y NEJAYOTE CORREGIDO	53
3.3.3. PH, ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV) Y ALCALINIDAD	55
3.4. ENSAYO BMP NEJAYOTE CON CAG.....	55
3.4.1. RENDIMIENTO DE METANO DIARIO N, N0 Y N10	55
3.4.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE COMUNIDADES DE BACTERIAS Y ARQUEAS.....	61
3.4.7.1. ANÁLISIS A NIVEL DE FILO Y GÉNERO DE BACTERIAS	61
3.4.7.2 ANÁLISIS A NIVEL GÉNERO ARQUEAS.....	65
3.4.7.3 MAPA DE CALOR PARA COMUNIDADES DE BACTERIAS Y ARQUEAS.....	66
3.4.7.4 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	67
3.5 REACTORES	68

3.5.1 HIDRÓLISIS EN APBR CON Y SIN MICROAIREACIÓN	68
3.5.1.1 AGV Y PH	68
3.5.1.2 POTENCIAL OXIDACIÓN REDUCCIÓN	72
3.5.2 ARRANQUE UASB	72
3.5.2.1 AGV, ALCALINIDAD Y PH	73
3.5.2.2 REMOCIÓN DQO	75
3.5.2.3 NITRÓGENO TOTAL Y FOSFATOS	76
3.5.2.4 RENDIMIENTO DE METANO	77
3.5.2.4.1 CONCENTRACIÓN DE METANO	78
3.5.3 ACOPLAMIENTO DE APBR CON MICROAIREACIÓN CON UASB CONTROL Y UASB DIET .81	
3.5.3.1 RENDIMIENTOS EN APBR CONTROL, APBR DIET, UASB CONTROL Y UASB DIET	81
3.5.3.1.1 AGV Y PH	81
3.5.3.1.2 REMOCIÓN DE DQO	85
3.5.3.1.3 CONCENTRACIÓN DE METANO	86
3.5.3.2 RENDIMIENTOS TOTALES EN PROCESOS CONTROL Y DIET	87
3.5.3.2.1 AGV	87
3.5.3.2.2 REMOCIÓN DQO	89
3.5.3.2.3 RENDIMIENTO DE METANO	90
3.5.3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE COMUNIDADES DE BACTERIAS EN REACTORES UASB CONTROL Y UASB DIET ACOPLADOS	91
3.5.3.3.1 ANÁLISIS A NIVEL FILO Y GÉNERO DE BACTERIAS	91
3.5.3.3.2 MAPA DE CALOR, DENDROGRAMA Y ANÁLISIS COMPONENTES PRINCIPALES DE BACTERIAS	93
3.5.3.3.2.1 MAPA DE CALOR Y DENDROGRAMA	93
3.5.3.3.2.2 ANÁLISIS COMPONENTES PRINCIPALES DE BACTERIAS	95
CAPÍTULO IV	99
CONCLUSIONES	99

ANEXO I ANÁLISIS DE HIDRÓLISIS EN APBR CON Y SIN MICROAIREACIÓN EN LAS PRIMERAS 24 HORAS.....	114
AGV Y PH	114
ANEXO II RECUPERACIÓN UASB CONTROL Y UASB DIET.....	118
AGV, ALCALINIDAD Y PH.....	118
REMOCIÓN DQO	121
NITRÓGENO TOTAL Y FOSFATOS	122
RENDIMIENTO DE METANO	123

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1.1. COMPOSICIÓN NEJAYOTE.....	4
TABLA 1.2. PARÁMETROS BÁSICOS DE OPERACIÓN EN REACTORES APBR.....	18
TABLA 1.3. PARÁMETROS BÁSICOS DE OPERACIÓN EN REACTORES UASB.....	22
TABLA 1.4 ARRANQUE REACTORES DIET.....	31
TABLA 2.1. PARÁMETROS A ANALIZAR Y MÉTODOS EMPLEADOS DEL NEJAYOTE.....	35
TABLA 2.2. PARÁMETROS A ANALIZAR Y MÉTODOS EMPLEADOS EN RC Y RM.....	43
TABLA 2.3. PARÁMETROS A ANALIZAR Y MÉTODOS EMPLEADOS EN UASB CONTROL Y UASB DIET.....	45
TABLA 2.4 PARAMETROS ANALIZADOS, FRECUENCIA Y METODOS EMPLEADOS EN APBR Y UASB ACOPLADOS.....	46
TABLA 3.1 COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DEL NEJAYOTE.....	48
TABLA 3.2 CARACTERÍSTICAS INÓCULO.....	50
TABLA 3.3 CONDUCTIVIDAD DE DIFERENTES MATERIALES Y PILI.....	51
TABLA 3.4 RESULTADOS BMP COMPARATIVA OTROS ESTUDIOS.....	54
TABLA3.5 RELACIÓN AGV ALCALINIDAD DESPUÉS DEL TEST BMP.....	55
TABLA 3.6 PROCESOS DIGESTIÓN ANAEROBIA BATCH CON MATERIAL CONDUCTOR..	59
TABLA 3.7 PARAMETROS APBR CON MICROAIREACION (RM) Y SIN MICROAIREACION (RC)	70
TABLA 3.8 PROCESO DE DIGESTION ANAEROBIA EN UASB CON MATERIAL CONDUCTOR.....	80

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.1. PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN.....	3
FIGURA 1.2. ESQUEMA PROCESO ANAEROBIO.....	7
FIGURA 1.3. REPRESENTACIÓN MULTICAPA GRANULO.....	20
FIGURA 1.4. ESQUEMA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES ENTRE BACTERIAS EXOELECTROGÉNICAS Y ELECTROTRÓFICAS.....	24
FIGURA 1.5. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES ENTRE <i>G. METALLIRREDUCENS</i> Y <i>G. SULFURREDUCTENS</i>	25
FIGURA 1.6. MODELO DE TRANSPORTE DE ELECTRONES ENTRE <i>GEOBACTER</i> Y <i>METHANOSAETA</i>	26
FIGURA 1.7 RENDIMIENTO REACTOR A PRESIÓN PARCIAL DE H ₂ ELEVADA.....	28
FIGURA 1.8 VARIACIÓN PRESIÓN PARCIAL H ₂ EN CAMBIO DE PH.....	29
FIGURA 2.1. TUBOS PVC CON CAG.....	36
FIGURA 2.2 A) MANÓMETRO DIGITAL Y B) REACTORES BMP	37
FIGURA 2.3. REACTORES CON CAG EN INCUBADORA	39
FIGURA 2.4 A) APBR VISTA FRONTAL. B) APBR VISTA LATERAL.....	42
FIGURA 2.5 UASB.....	44
FIGURA 3.1.BMP RENDIMIENTO DE METANO DIARIO.....	52
FIGURA 3.2. BMP RENDIMIENTO DE METANO ACUMULADO.....	53
FIGURA 3.3. RENDIMIENTO DE METANO DIARIO BMP CON CAG.....	56
FIGURA 3.4 RENDIMIENTO DE METANO ACUMULADO BMP CON CAG.....	57
FIGURA 3.5 CONCENTRACION METANO ENSAYO BMP CON CAG.....	58
FIGURA 3.6 ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS FILOS DE BACTERIAS.....	61
FIGURA 3.7 ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS Y ARQUEAS A NIVEL DE GENERO.....	63
FIGURA 3.8 MAPA DE CALOR A NIVEL DE GÉNERO.....	66
FIGURA 3.9 MICROGRAFÍAS DE LA SUPERFICIE DEL CARBÓN ACTIVADO GRANULAR.....	67
FIGURA 3.10 CONCENTRACIÓN DE AGV EN APBR SIN MICROAIREACION (RC) Y CON MICROAIREACION (RM).....	69
FIGURA 3.11 PH, ALCALINIDAD, AGV EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE ARRANQUE.....	74
FIGURA 3.12 DQO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE ARRANQUE	75
FIGURA 3.13 CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL Y FOSFATOS EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE ARRANQUE.....	77
FIGURA 3.14 RENDIMIENTO DE METANO DIARIO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE ARRANQUE.....	78

FIGURA 3.15 PORCENTAJE METANO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE ARRANQUE.....	79
FIGURA 3.16 CONCENTRACIÓN AGV EN APBR CONTROL (MC), APBRE DIET (MD), UASB CONTROL (UC) Y UASB DIET (UD).....	82
FIGURA 3.17 PH EN APBR CONTROL, APBR DIET, UASB CONTROL Y UASB DIET.....	84
FIGURA 3.18 CONCENTRACIÓN DE DQO EN APBR CONTROL, APBRE DIET, UASB CONTROL Y UASB DIET.....	85
FIGURA 3.19 PORCENTAJE DE METANO EN APBR CONTROL, APBR DIET, UASB CONTROL Y UASB DIET.....	86
FIGURA 3.20 CONCENTRACIÓN DE AGV EN PROCESO CONTROL (C) Y PROCESO DIET (D).....	88
FIGURA 3.21 PORCENTAJE REMOCIÓN DQO EN PROCESO CONTROL Y PROCESO DIET.....	89
FIGURA 3.22 RENDIMIENTO DE METANO EN PROCESO CONTROL Y PROCESO DIET.....	90
FIGURA 3.23 ABUNDANCIA RELATIVA DE FILOS DE BACTERIAS.....	92
FIGURA 3.24 MAPA DE CALOR Y DENDROGRAMAS A NIVEL DE GÉNERO.....	94
FIGURA 3.25 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN DOS DIMENSIONES A NIVEL DE GÉNERO.....	96
FIGURA 3.26 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN TRES DIMENSIONES DE LAS CUATRO MUESTRAS.....	97
FIGURA A.1.1 CONCENTRACIÓN DE AGV Y PH EN APBR SIN MICROAIREACIÓN Y CON MICROAIREACIÓN DURANTE 24 HORAS.....	114
FIGURA A.1.2 CONCENTRACIÓN DE LOS DIFERENTES AGV EN APBR SIN MICROAIREACIÓN (C) Y CON MICROAIREACIÓN (M) DURANTE 24 HORAS.....	115
FIGURA A.1.3 PORCENTAJE DE HIDRÓGENO EN LA COMPOSICIÓN DEL BIOGÁS Y POTENCIAL DE OXIDACION REDUCCIÓN (ORP) EN LOS APBR CON Y SIN MICROAIREACIÓN DURANTE EL ENSAYO DE 24 HORAS.....	116
FIGURA A.2.1 A) CONCENTRACIÓN DE AGV Y RELACIÓN AGV/ALCALINIDAD B) PH. EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE RECUPERACIÓN.....	119
FIGURA A.2.2 CONCENTRACIÓN DE DQO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE RECUPERACIÓN.....	121
FIGURA A.2.3 CONCENTRACIÓN DE DQO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE RECUPERACIÓN.....	122
FIGURA A.2.4 RENDIMIENTO DE METANO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE RECUPERACIÓN.....	124
FIGURA A.2.5 CONCENTRACIÓN DE METANO EN UASB CONTROL Y UASB DIET EN LA FASE DE RECUPERACIÓN.....	124

RESUMEN

El maíz es uno de los principales productos alimenticios de México. La elaboración de productos como la harina de nixtamal genera un agua residual con gran carga orgánica (nejayote). En la región de Yucatán (México), la geología kárstica de la zona hace que la problemática de la contaminación por el nejayote se acentúe. La digestión anaerobia en dos etapas es un tratamiento indicado para aguas residuales con elevadas cargas orgánicas. Los resultados de este estudio muestran que la aplicación de la microaireación en el reactor hidrolítico, incrementó el porcentaje de ácidos grasos volátiles (AGV) disponibles en el medio un 51 %. Estos AGV pueden ser degradados para la generación de metano por transferencia directa de electrones entre especies (DIET) o por transferencia de electrones entre especies con hidrógeno (IHT). La adición de un material conductor, como es el carbón activado granulado (CAG), en el reactor UASB DIET aumentó el rendimiento de metano un 55 %. La degradación de AGV y de demanda química de oxígeno (DQO) fue superior en el UASB DIET que en el USAB control. Así mismo, una gran diversidad de bacterias exoelectrogénicas con capacidad de donar electrones vía DIET se desarrollaron en la biopelícula del CAG. Por otro lado, *Methanosaeta* fue detectada como arquea aceptora de electrones para la reducción de dióxido de carbono a metano.

ABSTRACT

Corn is one of the most important food products of Mexico. The creation of corn based product such as nixtamal flour, generates a resultant wastewater with a high organic load (nejayote). Due to the karst geology of the Yucatan region (Mexico) the problem of pollution, caused by Nejayote, is significantly increased. Anaerobic digestion in two stages is an indicated treatment for wastewater with high organic loads. The results of this study show that the application of microaeration in the hydrolytic reactor increased the percentage of volatile fatty acids (VFA) available in the medium by 51%. These VFAs can be degraded for the generation of methane by direct interspecies electrons transfer (DIET) or by interspecies hydrogen transfer (IHT). The addition of a conductive material, such as granulated activated carbon (GAC), in the UASB DIET reactor improved methane production by 55%. The degradation of AGV and Chemical Oxygen Demand (COD) was higher in the UASB DIET than in the USAB control. Likewise, a great diversity of exoelectrogenic bacteria, with the ability to donate electrons via DIET, were detected in the GAC biofilm. On the other hand, *Methanosaeta* was detected as an electron acceptor archaea for the reduction of carbon dioxide to methane.

INTRODUCCIÓN

La producción de tortillas ha incrementado en los últimos tiempos debido principalmente a la internacionalización del producto y a que es un producto vinculado a la cultura mexicana [1].

El proceso por el cual se produce la masa de maíz se denomina nixtamalización, técnica en la que se realiza la cocción del maíz con agua y cal. Esto genera una gran presencia del tejido de los granos de maíz en el agua residual (nejayote) [2].

El nejayote es un residuo líquido que está compuesto en su mayor parte por el tejido pericarpio de los granos de maíz y por el exceso de calcio proveniente de la cal añadida para llevar a cabo la nixtamalización [3]. Sus principales características fisicoquímicas reportadas son un pH elevado de 11.23 ± 0.43 , cuando el nejayote es filtrado se reportan valores de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de $15,426 \pm 7,180$ mg/L, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) de $5,173 \pm 1,403$ mg/L, alcalinidad total de $2,429 \pm 969$ mgCaCO₃/L; en cambio para un nejayote sin filtrar se dan valores de concentración de sólidos en suspensión de $10,398 \pm 5,993$ mg/L, DQO $29,229 \pm 10,829$ mg/L, DBO $10,009 \pm 4,209$ mg/L y alcalinidad $5,768 \pm 43$ mg/L [1,4]. El nejayote presenta un contenido en humedad entre 88.15 y 89.29% en base húmeda [5] que le hace susceptible para el desarrollo de la actividad microbiana.

Actualmente en México, la NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-006-ECOL/1993 [6] establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de fabricación de harinas. Para el tratamiento del nejayote sólo se aplica en las grandes industrias. Para las pequeñas empresas que realizan el proceso de nixtamalización en su producción, la legislación no contempla como deben tratar el nejayote producido [4].

No sólo es necesaria una estrategia de gestión del residuo como tal, sino también de valorización del mismo, con el objeto de intentar aprovechar al máximo su potencial, recuperando los recursos que contiene [1].

La digestión anaerobia es una tecnología ambientalmente sostenible que estabiliza los residuos orgánicos y produce energía renovable en forma de biogás (CH₄ y CO₂). El metano (CH₄) producido en el biogás puede reemplazar a los combustibles fósiles para la generación de calor y/o electricidad o ser depurado para uso como combustible para vehículos [7]. En una futura sociedad ecológicamente sostenible, la digestión anaerobia debería tener un rol importante debido a los beneficios ambientales que proporciona,

como son la producción de energía limpia, la protección del medioambiente y la recuperación de nutrientes [8].

El proceso de digestión anaerobia se divide en cuatro etapas; hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, estas son realizadas por diferentes grupos de microorganismos [9]. Para un desarrollo efectivo del proceso de digestión anaerobia es necesario que las cuatro etapas mencionadas se mantengan cinética y energéticamente en equilibrio, manteniéndose una sintrofia entre las diferentes actividades de los microorganismos participantes en el proceso [10].

La hidrólisis es conocida por ser una etapa limitante en los procesos de digestión anaerobia, una mejora en la etapa hidrolítica supone un incremento en la eficiencia general del proceso [11]. La introducción de pequeñas cantidades de oxígeno en procesos anaerobios es conocida por el término microaireación [12]. En la última década, diferentes estudios han demostrado que la aplicación de la microaireación produce una mejora en las etapas hidrolítica y acidogénica, incrementándose la velocidad en la generación de ácidos grasos volátiles (AGV) [11,13,14].

En un sistema de digestión anaerobia, un incremento en la cinética de la etapa metanogénica reduce la acumulación de los AGV y da mayor estabilidad al proceso [15].

En los últimos años se han investigado vías alternativas en la transferencia de electrones entre bacterias, al ya conocido transporte de electrones a través de hidrógeno y formiato [16-18]. En 2014, Rotaru y colaboradores, demostraron que se producía transporte de electrones entre *Geobacter metallireducens* y *Methanosaeta harundinacea* utilizando etanol como sustrato a través de un canal pili, siendo el CO₂ el agente oxidante y obteniendo como producto final CH₄. Este transporte de electrones es más rápido que el realizado por el hidrógeno o el formiato como moléculas transportadoras. Diferentes estudios, [17,19-22] han demostrado que se puede producir el DIET (transferencia directa de electrones entre especies por sus siglas en inglés) utilizando materiales conductores como medio de transporte de los electrones entre las bacterias exoelectrogénicas y las arqueas electrotróficas metanogénicas. Actualmente, la cantidad de bacterias identificadas como exoelectrogénicas participantes en DIET ha incrementado significativamente [23]. Estas bacterias exoelectrogénicas adquieren la capacidad para enviar electrones extracelularmente cuando se desarrollan adjuntas a un material conductor [24]. La incorporación de estos materiales conductores tales como CAG, biochar, tela de carbono o magnetita en los biorreactores durante el proceso de digestión anaerobia, puede acelerar y mejorar la estabilidad del mismo.

Tabla 1.1. Composición nejayote.

Característica	Valor	Referencia
Densidad (kg/m ³)	1,031-1,047	[5]
Humedad (%) en base húmeda	88.15-89.29	[5]
pH	11.23±0.43	[1,4]
Calcio (mg/L)	1,526	[4]
Fósforo total (mg/L)	1,321	[26]
Nitrógeno total (mg/L)	418	[26]
Grasa (%)	0.74-5.76	[5]
Lignina (%)	0.36-0.67	[5]
*Alcalinidad total (mg/L)	2,429±969	[1,4]
Alcalinidad total (mg/L)	5,768±43	[4]
*DQO (mg/L)	15,426±7,180	[1,4]
DQO (mg/L)	29,229±10,829	[4,27]
*DBO (mg/L)	5,173±1,403	[1,4]
DBO (mg/L)	10,009±4,209	[4,27]
Sólidos en suspensión totales (mg/L)	10,398±5,993	[1,4]
Ácido ferúlico (mg/L)	3,300	[28]

*Nejayote filtrado.

1.2 Tratamientos físicos, físico-químicos y biológicos del nejayote

1.2.1 Tratamientos físicos y físico-químicos

El tratamiento más usual y sencillo para el nejayote es la filtración. En un estudio de 2012 se evaluaron las mejores condiciones de filtración para el nejayote [4]. Se realizaron filtraciones con diferentes medios filtrantes (tela de poliéster y algodón, nylon con hilo metalizado y papel), evaluando la velocidad de filtrado y la calidad del filtrado. Se desarrollaron filtraciones a diferentes presiones (0.65 kgf/cm², 1 kgf/cm², 1.35 kgf/cm² y relaciones de dosificación (1:0.25, 1:0.50, 1:0.75) para buscar las condiciones ideales. Por último, se evaluó la calidad del líquido filtrado para correlacionarlo con las condiciones de filtración del nejayote. Los resultados mostraron que el medio filtrante más apto es la tela poliéster con un tamaño de poro de 10-12 micras, presentando este medio la mayor velocidad de filtrado 48.641 mL/s. El siguiente medio que obtuvo una mayor velocidad (34.808 mL/s) fue el papel, con un tamaño de poro de 8-11 micras. El tercer mejor resultado fue del nylon con hilo metalizado (27.017mL/s), con un tamaño de poro de 10-12 micras. En cuanto a la calidad del filtrado, los mejores resultados se

obtuvieron con el papel. Dentro de las diferentes dosificaciones aplicadas la más favorable fue 1:0.25 a una presión de 1 kgf/cm².

En un estudio posterior, Valderrama-Bravo y colaboradores [29], corroboraron que la dosificación adecuada para la filtración del nejayote es 1:0.25. En este estudio se demostró que el papel se satura más rápidamente que la tela de poliéster y el nylon. Por otro lado, los mejores rendimientos, en cuanto a la calidad del filtrado del nejayote, se obtuvieron con nylon como medio filtrante, alcanzándose una eliminación de sólidos en suspensión, sólidos totales, DQO y calcio de 98 %, 50 %, 45 % y 55 % respectivamente. Suárez y colaboradores [26] proponen un tratamiento para el nejayote con quitosano (Biopolímero), sustancia que mejora la coagulación y floculación y carece de toxicidad alguna. El principal objetivo era separar los sólidos y recuperar agua y subproductos con valor nutricional y sin propiedades tóxicas. Utilizaron dos tipos de quitosanos, uno con elevado peso molecular y una viscosidad de 2.35 Pa/s y otro de bajo peso molecular y una viscosidad de 0.39 Pa/s. Se añadieron 10, 15, 20, 25, 30 y 50 mg para cada tipo de quitosano en 20 mL de nejayote centrifugado respectivamente. La dosis óptima se alcanzó a los 47 mg con una eliminación de 80 % de la turbidez para ambos quitosanos. García-Zamora y colaboradores [28] emplearon una dosificación de quitosano de 20 g/L, previamente se realizó un proceso de oxidación enzimática con la aplicación de 0.3 nmoles de enzima lacasa, la eliminación de DQO obtenida tras este tratamiento fue de un 70 %. Este estudio pretendía una recuperación del ácido ferúlico debido a sus propiedades fisiológicas tales como anticancerígeno y antioxidante, también se puede emplear como materia prima para producir vanillina y conservantes [30]. De una concentración de 3.3 g/L se recuperó el 78 % en el biopolímero formado.

1.2.2 Tratamientos biológicos

El tratamiento aeróbico para el nejayote no ha sido muy estudiado a lo largo del tiempo. En 1987 Brenes y colaboradores [31] realizaron una investigación sobre la degradación de la materia orgánica del nejayote utilizando un reactor biológico de contacto rotatorio. Las dimensiones del reactor fueron 1.3 m de largo por 0.36 m de ancho formado por 5 discos sumergidos un 35 %. El tiempo de adaptación, hasta que la biopelícula tuvo un espesor de 1 mm, fue de 40 días, y el tiempo de experimentación de 20 días. La eficiencia, en la degradación de DQO, fue de un 50 % con este tratamiento.

Debido a la alta DQO del nejayote 26,500-28,000 mg/L, Salmerón y colaboradores [32] emplearon un tratamiento aerobio con tres reactores biológicos en cascada con

burbujeo en lugar del tratamiento aerobio de lodos activos con agitación. Los reactores tenían un volumen de 1.13 L cada uno haciendo un total de 3.39 L. La tasa de aireación fue de 5.2-5.6 L/min, el proceso fue llevado a cabo durante 36 días. El tiempo de retención hidráulico fue de 8.3 días y la velocidad de carga orgánica de 3.36 kg DQO/(m³·día). En este estudio la remoción de DQO, en comparación al estudio anterior mencionado, aumentó hasta el 57 %. En este mismo estudio se comprobó que para obtener una remoción de DQO más elevada, fue necesario adicionar sales ((NH₄)₂SO₄ y KH₂PO₄).

Los tratamientos aeróbicos sin y con inyección de aire no alcanzaron una remoción del 60 % de la DQO. Solamente con la adición de sales se llega a una eliminación de la DQO del 87.6 %.

El primer estudio de digestión anaerobia del nejayote data del año 1984, en el que E. Civit y colaboradores [33] desarrollaron un tratamiento de digestión anaerobia en cascada con cinco reactores empacados. La experimentación fue realizada en reactores cilíndricos de 28.5 L empacados con anillos de plástico a una temperatura de 33±0.5 °C. La experimentación se llevó a cabo durante 123 días, la cual se dividió en tres etapas con diferentes tiempos de retención hidráulicos y velocidad de carga orgánica. En la primera etapa de la experimentación, de 31 días de duración, el tiempo de retención hidráulico fue 15 días y la velocidad de carga orgánica de 0.68 kg DQO/(m³·día), obteniendo una eliminación de DQO entre 92.6 y 94.8 %, con una producción de biogás de 1.97 L/(L_{REACTOR}·día). La segunda etapa tuvo una duración de 48 días. En esta etapa se operó con un tiempo de retención hidráulico de 23 días y una velocidad de carga orgánica de 0.5 kg DQO/(m³·día). El porcentaje de eliminación de DQO fue entre 93.5 y 96.1 % con una producción de biogás de 0.87 L/(L_{REACTOR}·día). La tercera parte se realizó durante 42 días, con un tiempo de retención hidráulico de 1 día y una velocidad de carga orgánica de 1.73 kg DQO/(m³·día). En este caso la eliminación de DQO fue de 87.8 y 94 % y la producción de biogás de 2.56 L/(L_{REACTOR}·día). En la tercera etapa se produjo una acidificación del medio con una caída por debajo del 70 % en eliminación de DQO a partir de la mitad del periodo de experimentación bajo estas condiciones. Se observa que las condiciones más óptimas son las de la primera etapa, los porcentajes de eliminación de DQO fueron similares para la primera y la segunda etapa, siendo la degradación de DQO 1.3 % superior en la segunda etapa. En cambio, la generación de metano fue un 128 % superior en la primera etapa que en la segunda.

1.3 Digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia se da en cuatro etapas fundamentales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, la figura 1.2 resume este proceso.

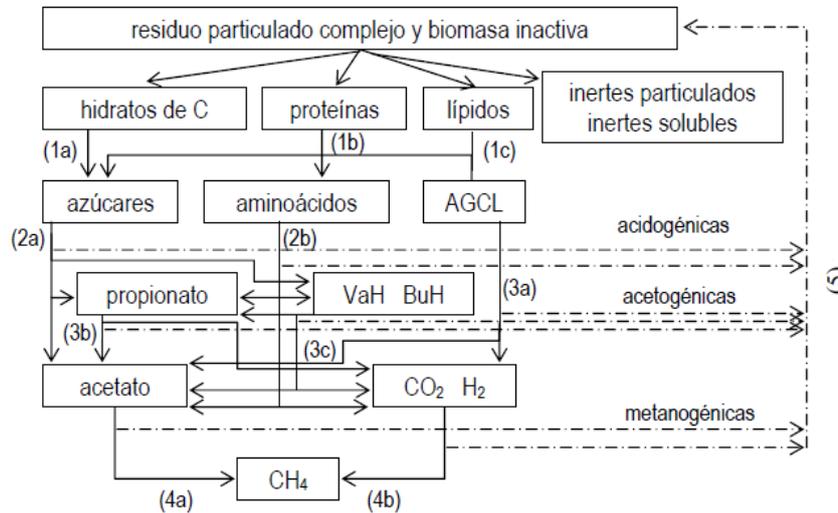


Figura 1.2. Esquema proceso anaerobio [34].

La hidrólisis incluye las siguientes reacciones:

(1a) Hidrólisis de hidratos de carbono en azúcares.

(1b) Hidrólisis de proteínas en aminoácidos.

(1c) Hidrólisis de lípidos en aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga (AGCL).

Las bacterias acidificantes transforman la materia orgánica disuelta formada en la hidrólisis:

(2a) Acidogénesis de azúcares en AGV (propionato, butirato, valerato y acetato) y mezclas de H₂ y CO₂.

(2b) Acidogénesis de aminoácidos en AGV (propionato, butirato, valerato y acetato) y mezclas de H₂ y CO₂.

La acetogénesis se produce por bacterias acetogénicas anaerobias facultativas. Los ácidos grasos son transformados en acetato y mezcla de H₂ y CO₂.

(3a) Acetogénesis de AGCL.

(3b) Acetogénesis de propionato.

(3c) Acetogénesis de butirato y valerato.

En la metanogénesis se produce CH₄ a partir de acetato o de la mezcla de H₂ y CO₂.

(4a) Metanogénesis acetotrófica con transformación de acetato en metano.

(4b) Metanogénesis hidrogenotrófica con transformación de H₂ y CO₂ en metano.

(5) Muerte de bacterias transformándose en parte de la biomasa inactiva.

1.3.1 Procesos de hidrólisis

La hidrólisis es una etapa limitante en muchos tratamientos de digestión anaerobia, una mejora en esta etapa ocasiona un incremento en la producción de metano. En un residuo como el nejayote, mejorar esta etapa hidrolítica puede revertir en altos beneficios al proceso global de digestión anaerobia.

1.3.1.1 Optimización de la relación sustrato-inóculo

Una relación óptima entre sólido volátil inóculo (SVi) y sólido volátil sustrato (SVs) mejora el rendimiento del proceso de digestión anaerobia. Kong y colaboradores [35] estudiaron el efecto de la relación inóculo sustrato (ISR inoculum substrate ratio por sus siglas en inglés) empleando tres inóculos diferentes para tratar residuos de comida. Establecieron una ISR de 2, 1, 0.5, 0.33 y 0.25. Entre los inóculos empleados había uno aclimatado y otro sin aclimatar. El mejor rendimiento en producción de metano fue ISR 0.33 y ISR de 0.5 para el inóculo aclimatado y sin aclimatar respectivamente. Wilson y colaboradores [36] realizaron un estudio sobre la mejora en la fase hidrolítica introduciendo diferentes porcentajes de inóculo (60 %, 40 %, 20 % y 0 %). En el estudio el mejor rendimiento se obtiene con el 60 % de inoculación alcanzando una reducción de 69.7 % de SV en la fase de arranque del reactor 16 primeros días. También se observó que cuando el reactor hidrolítico trabajó durante un largo periodo después de 112 días, una recirculación del lixiviado unido a una inoculación de 10 %, mejoró el rendimiento en producción de metano un 8.5%, además aumentaron las poblaciones de *Bacteriodes* y *Clostridia*. Kawai y colaboradores [37] evaluaron diferentes ISR (0.25, 0.5, 1, 2 y 3). Con una ISR de 3 y 2 no hubo problemas de acidificación en el reactor a ISR menores si se observaron esos problemas. Los tiempos de latencia fueron menores, al igual que en el estudio de Kong y colaboradores [35], a medida que se aumenta la cantidad de inóculo en relación al sustrato. En este estudio al contrario que el presentado por Kong y colaboradores, la producción de metano fue mayor cuando los valores de ISR fueron más elevados. Lü y colaboradores [38] estudiaron la influencia de la recirculación en un reactor hidrolítico, el proceso de digestión anaerobia se realizó en dos etapas utilizando como reactor hidrolítico de columna empacada (APBR anaerobic packed bed reactor por sus siglas en inglés) y como reactor metanogénico un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB upflow anaerobic sludge blanket por sus siglas en

inglés). La recirculación del efluente al reactor hidrolítico puede acelerar la desintegración de partículas, debido a un incremento en el contenido de humedad, una redistribución de las enzimas y microorganismos y la dilución de posibles toxinas. Por otro lado, la recirculación puede conllevar una acidificación del reactor y la inhibición del proceso. En este estudio se plantearon diferentes proporciones de recirculación entre los efluentes del APBR y el UASB al APBR. Se obtuvo la mejor eficiencia en remoción de SV, ST y celulosa así como una mayor proporción de acetato en los AGV con una relación 1:3 de caudal recirculado del APBR y UASB al UASB. Cuando se mantuvo la relación 1:3 en la recirculación del APBR y UASB al UASB, disminuyó la concentración de DQO un 21.9 % con respecto a cualquier otra relación aplicada en este estudio.

1.3.1.2 Microaireación

Lim y Wang [11] investigaron el efecto de la microaireación en la degradación de aguas fecales y residuos de comida. Emplearon reactores tipo batch de 0.2 L de volumen. La microaireación fue aplicada desde el inicio y los cuatro siguientes días, aplicando 37.5 mL O₂/d, el periodo de experimentación total fue de 40 días. Los resultados fueron comparados con otros resultados obtenidos en reactores tipo batch que realizaban la digestión anaerobia en las mismas condiciones, pero sin microaireación. En el análisis de AGV se observó cómo aumentó la concentración en 2 %, 76 %, 35 % y 330 % para los días 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Por otra parte, la concentración de acetato fue un 10% mayor con microaireación que sin ella, en cambio el propionato disminuyó un 12 %, esto quiere decir que la microaireación mejora la oxidación de propionato a acetato. Una alta concentración de propionato puede llevar a procesos de inhibición. El rendimiento de producción de metano fue 256 L/kg SV para la digestión anaerobia con microaireación y de 233 L/kg SV para el tratamiento sin microaireación, un 10 % más cuando se realiza la microaireación.

Shanti y colaboradores [39] realizaron una digestión anaerobia en un reactor de lecho empacado de 1 L de volumen, utilizando forraje como sustrato. El objetivo del estudio era la comparación de la digestión anaerobia en un reactor de lecho empacado aplicando microaireación y sin aplicarla. La microaireación se produjo el día 11 introduciendo 1 L/min para un total de 2.5 L de aire y el día 22 con 4 L/min para un total de 24 L de aire. En este estudio la mejora debida a la microaireación no fue muy notable, en el caso de la digestión anaerobia sin microaireación la tasa de degradación de materia orgánica fue 0.27 g SV/d y para el tratamiento con microaireación fue 0.37 g SV/d. En la producción de AGV los resultados mostraron que cuando la microaireación

fue 1 L/min se alcanzó un valor de 9.3 g/L, mientras que una tasa de microaireación de 4 L/min fue 7 g/L y sin ella 6.3 g/L. El porcentaje de DQO solubilizada fue 32 % para el tratamiento sin microaireación y 35 % para el tratamiento con microaireación. El incremento en la tasa de aire introducido en el reactor redujo la concentración de AGV 24.7 %.

Díaz y colaboradores [40] estudiaron el efecto de la microaireación en la degradación de la celulosa. Los reactores empleados fueron tipo batch de un volumen de 2.1 L. Se alimentaron con 10 mL de oxígeno al día durante toda la experimentación. El resultado no mostró diferencias significantes en cuanto a la producción de metano. Si se observó una mejoría en la fase de latencia en los reactores con microaireación con respecto a los reactores sin microaireación. La fase de latencia fue de 1.6 días con microaireación y 2.12 días sin microaireación. El beneficio de la microaireación se observó en la etapa de hidrólisis degradándose más lignina.

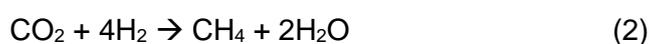
En conclusión, la microaireación produce un efecto positivo en la primera etapa de la digestión anaerobia, esto se debe a que la presencia de oxígeno hace que varíen las poblaciones de bacterias presentes en el digestor sustancialmente. Lim y colaboradores [41] realizaron una comparación de las comunidades que se desarrollaron en una digestión anaerobia con microaireación y sin ella, los resultados mostraron un cambio bastante significativo, en los reactores alimentados con oxígeno las bacterias tuvieron una distribución de la población de 72 % *Firmicutes*, 2 % *Proteobacteria*, 24 % *Bacteroidetes* y 2 % *Actinobacteria* en el reactor en condiciones anaerobia la distribución fue un 58 % *Firmicutes* y un 42 % *Proteobacteria*. *Firmicutes* producen enzimas extracelulares las cuales realizan la hidrólisis, por lo tanto, una mayor presencia de estas bacterias en el medio lleva a un rendimiento superior en la etapa hidrolítica. Fu y colaboradores [42], registraron un incremento del 15.7 % en el orden *Clostridiales* perteneciente al filo *Firmicutes*, estas bacterias rompen las moléculas de polisacáridos mejorando así la etapa hidrolítica. Yin y colaboradores [13], reportaron en su estudio un aumento de *Firmicutes* en el reactor con microaireación del 128 % con respecto al reactor sin microaireación, mostrando el beneficio de la microaireación al desarrollo de comunidades bacterias implicadas en la fase hidrolítica.

1.3.1.3 Adición de hierro cero valente

Con el objetivo de analizar el efecto de la adición de hierro cero valente en tratamientos de digestión anaerobia Feng y colaboradores, realizaron un estudio [43] en el que

desarrollaron un proceso de digestión anaerobia de lodos activos con hierro cero valente. Se desarrollaron dos experimentos el primero duro 3 días y el objetivo era ver el efecto de la adición de hierro cero valente en la etapa de hidrólisis y acidificación, el segundo experimento fue realizado durante 20 días para ver el proceso completo desde la hidrólisis hasta la metanogénesis. En la primera experimentación con el incremento desde 0 g/L a 4 g/L de hierro cero valente añadido, decreció la concentración de las proteínas desde 878.2 a 341.3 mg/L, los polisacáridos se redujeron de 144.7 a 124.9 mg/L. Por otro lado, los AGV aumentaron su concentración de 2,055.8 a 2,822.1 mg/L, el incremento fue de un 37 %. Las diferencias entre añadir 4 g/L y 20 g/L de hierro cero valente no fueron significativas. La composición de los AGV formados era principalmente acetato, propionato, butirato y valerato. En lo relativo a la concentración de acetato dependiendo de la dosis de hierro cero valente 0, 1, 4 y 20 g/L fueron de 759.2, 971.2, 1,373.2 y 1,303.1 mg/L y su porcentaje del total de AGV fueron 36.9 %, 41.3 %, 48.7 % y 47.5 %, respectivamente. El aumento de acetato fue de un 80.9 % de no añadir hierro cero valente a añadir 4 g/L, en lo que respecta a la concentración de propionato el cual puede provocar episodios de inhibición se redujo su concentración de 20.6 % a 11.7 %. La formación de propionato ocurre a un potencial de oxidorreducción mayor que la formación de acetato y butirato, el valor del potencial redox al que se producen estas reacciones depende del valor de pH del medio [44,45]. Hierro cero valente es un material reductor que puede crear una atmósfera más reductora, fomentando la formación de acetato en detrimento del propionato [43].

En la segunda experimentación que llevaron a cabo, después de los 20 días de digestión anaerobia se analizaron los resultados. La producción de metano acumulada fue 192.6, 211.1, 233.8 y 276.4 mL/SSV para una adición de hierro cero valente de 0, 1, 4 y 20 g/L respectivamente. La producción de metano incremento un 43 % comparando el proceso sin hierro zero valente y con 20 g/L añadidos de este. La mejora en la producción de metano se puede deber a dos aspectos. La mayor generación de acetato debida al hierro cero valente, al generarse un ambiente más reductor para la metanogénesis. Adicionalmente, el Fe⁰ puede servir como dador de electrones para reducir CO₂ a CH₄ basada en las siguientes reacciones:



El H₂ de la reacción 2 puede provenir de la corrosión química producida en el Fe⁰ y/o de la hidrólisis-acidificación. En el sobrenadante se encontraron concentraciones de Fe⁺² de 79.9 mg/L y 43.1 mg/L cuando se añadieron 20 g/L y 4 g/L de hierro cero valente, respectivamente. Los autores del estudio plantean la posibilidad de utilizar pedazos de residuos de hierro de las industrias para este tratamiento. Esto podría suponer una mejora en la digestión anaerobia a bajo coste [43].

1.3.1.4 Hidrólisis térmica

Durante la hidrólisis la descomposición de polímeros orgánicos a monómeros ocurre lentamente, haciendo de ella una etapa limitante, un pretratamiento térmico acelera este proceso favoreciéndose así la producción de metano también [46]. Ge y colaboradores [47] evaluaron los efectos de un pretratamiento térmico a temperaturas desde 50 a 70 °C empleando como sustrato residuos de lodos activados. La degradación de SV aumentó de 34 % a 48 % al pasar de 50 a 65 °C. Compararon la solubilización entre el pretratamiento termofílico y mesofílico, la cual fue mejorada hasta en un 27 % alcanzado a 60 °C. Xue y colaboradores [46] analizaron el efecto de un pretratamiento térmico a temperaturas de 60 °C hasta 180 °C utilizando como sustrato lodos sólidos deshidratados. En este estudio también evaluaron el efecto del tiempo en el pretratamiento. Al igual que en el estudio anterior se produjo un aumento de la solubilización de la materia orgánica con el incremento de la temperatura en los diferentes pretratamientos, los valores de DQO soluble para el residuo sin tratar y con pretratamientos a 60 °C y 180 °C fueron 1,920, 2,060 y 6,124 mg/L, respectivamente. Los tratamientos a mayor temperatura (140-180 °C) y con un tiempo de 180 minutos incrementaron la solubilidad de carbohidratos y proteínas. La posterior producción de biogás más elevada en la etapa metanogénica, fue con los pretratamientos realizados a temperaturas de 140 °C y 160 °C con producciones de biogás acumuladas de 1,735 y 1,624 ml respectivamente. Cano y colaboradores [48] realizaron un ensayo de potencial de biometanización (BMP biochemical methane potential por sus siglas en inglés) en su estudio con y sin pretratamiento térmico previo. Emplearon diferentes sustratos tales como lodo biológico, residuos de grasas, estiércol de vaca, grano, residuos sólidos municipales y fracción orgánica de residuos sólidos municipales. La temperatura aplicada en el pretratamiento térmico fue 150 °C. Para los residuos sólidos urbanos que presentaban un 7.2 % de fibras la producción de biogás aumento un 30 % y la cinética fue un 70 % más rápida. La fracción orgánica de residuos sólidos municipales no

presentó ningún incremento en la producción de biogás solo fue mejorada la velocidad cinética, debido a que su DQO soluble era más del 60 % y presentaba gran cantidad de carbohidratos fácilmente degradables. Para el grano y el estiércol de vaca la producción de biogás aumento un 40 % y 30 % respectivamente, en el caso de los residuos de grasas no hubo un incremento reseñable en la producción de biogás pero si fue más rápida su cinética como en todos los residuos.

1.3.2 Ensayo BMP

Con la realización del BMP se pueden obtener dos resultados principales la biodegradabilidad basada en el rendimiento de metano (BD_{CH_4}) y el potencial de biometanización del material orgánico. El BMP es un valor experimental de la máxima cantidad de metano producida por SV del sustrato en cuestión [49]. Los resultados obtenidos de un ensayo BMP se pueden emplear en el escalamiento de procesos de digestión anaerobia [50]. Puede ser de utilidad para identificar futuros posibles problemas de inhibición microbiana, sobrecarga y adaptación [51].

La relación entre el BMP y BD_{CH_4} esta expresada por la siguiente ecuación [49]:

$$BD_{CH_4} = \frac{BMP \text{ (ml } CH_4 / g \text{ SV)}}{350 \cdot DQO_{sustrato} \text{ (gDQO / g SV)}}$$

Se admite que un g/L DQO produce alrededor de 350 ml de CH_4 [52]. Para un desarrollo óptimo del test se debe mantener a temperatura constante entre 37 °C y 52 °C y una agitación continua para minimizar los efectos de las limitaciones por transferencia de masas [53].

1.3.2.1 Factores que influyen en el BMP

1.3.2.1.1 Preincubación del inóculo

Uno de los factores que puede afectar al buen desempeño del BMP es la fuente del inóculo. Inóculos de distinta procedencia pueden tener comunidades microbianas diferentes, afectando la adaptación al sustrato, la biodegradación del residuo y por ende al rendimiento en generación de metano del BMP [54]. Las procedencias más frecuentes de los inóculos empleados en el BMP son; lodo digerido de planta de tratamiento, lodo

granulado de reactor anaerobio y estiércol de animales [55]. Realizar una preincubación del inóculo es altamente recomendado en la literatura [56] en ensayos BMP. La realización de la preincubación es para eliminar el posible biogás producido por el propio inóculo mediante la desgasificación del mismo, incrementándose la precisión en la producción neta de biogás [57]. Normalmente el periodo de preincubación va de 1 a 18 días [55], aunque un periodo óptimo es entre 2 y 7 días [57].

1.3.2.1.2 ISR

La concentración de sustrato es un factor que tiene gran influencia en los procesos de digestión anaerobia [58]. En los ensayos BMP, cuando la ISR es inferior a 2 aumenta la concentración de AGV provocando efectos de inhibición en el proceso de digestión anaerobia [59]. Maya-Altamira y colaboradores [60] realizaron un ensayo BMP con 5 aguas residuales diferentes diluidas desde 0 % al 80 %. La producción de metano por gramo de DQO incrementó entre 52 % y 766 % en los diferentes sustratos cuando la dilución del agua residual fue del 80 %. Rodriguez-Chiang y Dahl [61] manejaron valores de ISR desde 0.5 a 2 teniendo la mayor producción de metano con un valor ISR 2. Adicionalmente corroboraron, que al incrementar la concentración de sustrato (ISR 0.5) el pH se acidificó, dando un valor de 5.6, en comparación con ISR 2 donde los valores de pH fueron en torno a 7.5. En la última década, se emplea una relación inóculo sustrato de 2 en la gran mayoría de estudios, lo cual ayuda a comparar y valorar los resultados entre diferentes trabajos [55].

1.3.2.1.3 Agitación

La agitación afecta a la distribución de los microorganismos, nutrientes y sustrato, así como a la homogenización del contenido del digestor, alcalinidad, liberación de las burbujas de gas y prevención de la sedimentación de la materia particulada [62]. En los ensayos BMP se emplea tanto agitación diaria manual como agitación mecánica. Wang y colaboradores [63] evaluaron diferentes estrategias de agitación; no agitación, agitación manual diaria y agitación mecánica a diferentes revoluciones. Emplearon diferentes sustratos con distintos valores de viscosidad. Los resultados mostraron, que con el lodo deshidratado se obtuvieron los mayores rendimientos de metano 19.7 L/g SV · día con la agitación más intensa 160 rpm. En cambio, cuando la agitación fue de

10 rpm o manual el rendimiento decreció hasta valores inferiores a 8 L/g SV · día. El mismo sustrato se diluyó 4 y 8 veces disminuyendo su viscosidad, en este caso las diferencias no fueron significativas. La agitación mecánica solo es necesaria cuando el ensayo BMP se realiza a sustratos sólidos o muy viscosos [63].

1.3.3 Digestión anaerobia en dos etapas y sus efectos

1.3.3.1 Tiempo de retención hidráulico y velocidad de carga orgánica

Con el objetivo de comparar como afecta la digestión anaerobia en una y dos fases al tiempo de retención hidráulico y a la velocidad de carga orgánica Aslanzadeh y colaboradores [64] realizaron un estudio comparativo entre estos dos sistemas de digestión anaerobia. Los sustratos utilizados fueron residuos orgánicos municipales y residuos orgánicos de industria de comida procesada. Para la digestión anaerobia en una sola fase se empleó un reactor continuo de tanque agitado (CSTR *continuous stirred-tank reactor* por sus siglas en inglés) y para la digestión anaerobia en dos fases se utilizó un reactor CSTR conectado a un tanque de sedimentación y el tanque de sedimentación conectado a un reactor UASB, se recirculaba el efluente del UASB al CSTR. El reactor CSTR tenía un volumen de 3 L tanto para la digestión anaerobia en una como en dos etapas y se mantuvo a 55 °C, el reactor UASB tenía un volumen de 2.25 L y una temperatura 34 °C. La velocidad de carga orgánica fue de 2.84 kg DQO/(m³·día) a 19.88 kg DQO/(m³·día), el tiempo de retención hidráulico fue de 10 días a 3 días. La digestión anaerobia en una etapa fue estable hasta una velocidad de carga orgánica de 4.26 kg DQO/(m³·día) en cambio la digestión anaerobia en dos etapas llegó hasta los 11.36 kg DQO/(m³·día) para los residuos orgánicos de la industria de comida procesada, esto significó un tiempo de retención hidráulico menor en el caso de la digestión anaerobia de dos etapas de un 57 %. Esto a su vez implica que el volumen del reactor puede ser un 26 % menor en la digestión en dos etapas. En el caso de los residuos orgánicos municipales las diferencias fueron mayores, un 333 % más de velocidad de carga orgánica soportó la digestión anaerobia en dos etapas que la realizada en una, el tiempo de retención hidráulico y el volumen del reactor disminuyeron 70 % y 65 % respectivamente [64].

Rincón y colaboradores [65] evaluaron la fase metanogénica de un residuo tratado previamente en un reactor hidrolítico. Utilizaron velocidades de cargas orgánicas de 0.8

kg DQO/(m³·día) a 22 kg DQO/(m³·día) obteniendo resultados para eliminación de DQO de 94 % y 61 % conforme se iba aumentando la velocidad de carga orgánica.

Bo y Pin-jing publicaron un estudio [66] sobre la digestión anaerobia en dos etapas de residuos de cocina, en el manejan velocidades de cargas orgánicas entre 2.3 kg DQO/(m³·día) y 13.1 kg DQO/(m³·día) con remociones de DQO superiores al 75 % para las velocidades de cargas orgánicas más elevadas.

1.3.3.2 Rendimiento de metano

Nasr y colaboradores [67] evaluaron el rendimiento de metano en digestión anaerobia en una y dos etapas, empleando como sustrato vinazas provenientes de la producción de etanol. La experimentación se realizó en reactores de 250 mL. La carga orgánica fue de 13.2, 19.8 y 26.4 kg DQO/m³ en los diferentes frascos, para la segunda etapa de la digestión anaerobia se agregaron 6.6 kg DQO/m³ del primer frasco. El rendimiento de metano fue 0.26 L CH₄/g DQO_{añadida} y 0.33 L CH₄/g DQO_{añadida} para la digestión anaerobia en una y dos etapas respectivamente.

En el estudio de Rincón y colaboradores [65] emplearon un residuo con una concentración de fenoles de 14.5 g/L, esta se redujo un 40 % en el reactor hidrolítico reduciéndose los problemas de inhibición que pueden ser causados por los fenoles en el reactor metanogénico. El rendimiento de metano fue 0.27 L CH₄/g DQO_{eliminada}. Bo y Pin-jing [66] obtuvieron un rendimiento de metano en su estudio de 0.33 L CH₄/g DQO y 0.38 L CH₄/g DQO conforme se fue aumentando la velocidad de carga orgánica de 2.3 kg DQO/(m³·día) a 13.1 kg DQO/(m³·día).

Maspolim y colaboradores [68] compararon el rendimiento de metano de un proceso de digestión anaerobia en una etapa, empleando un reactor de tanque agitado, o en dos etapas con dos reactores de tanque agitado. El rendimiento de metano que obtuvieron en la generación de metano fue entre 0.1 y 0.13 L CH₄/g DQO_{añadida} para una etapa y entre 0.14 y 0.16 L CH₄/g DQO_{añadida} en dos etapas.

1.3.4 Reactores empleados

1.3.4.1 Reactores APBR

El reactor APBR se caracteriza por tener un soporte en el cual crecen los microorganismos. Este soporte retiene los microorganismos en el reactor mejorando el rendimiento y la estabilidad del mismo [69].

1.3.4.1.1 Material de empacado

El material de empacado del APBR sirve como filtro, previendo el lavado de los microorganismos y ofreciendo una gran superficie para un crecimiento más rápido y eficaz de la biopelícula [70]. Se han investigado muchos materiales para realizar el empacado del APBR (tabla 1.2), analizando su viabilidad de soporte para el crecimiento de la biopelícula, destacando también algunos por su bajo coste y fácil disponibilidad como por ejemplo, arena, arcilla, cristal y plásticos [71-73]. Amorim y colaboradores [74], utilizaron como material para el empacado cubos de espuma de poliuretano los cuales pueden llegar a alcanzar una superficie específica de $2,400 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y una porosidad del 97 % siendo una perfecta matriz para la colonización por parte de los microorganismos, obtuvieron una eliminación de DQO del 96 % con velocidades de carga orgánica comprendidas entre 2.61 y 6.52 kg DQO/(m^3 -día). Lim y colaboradores [75] utilizaron diferentes tamaños de cubos de espuma de poliuretano para ver su capacidad de eliminación de nitrógeno total logrando una remoción del 84 %. Fia y colaboradores [76] compararon espuma de poliuretano, piedras machacadas y cenizas, cada material presentaba una porosidad de 0.95, 0.48 y 0.53 m^3/m^3 respectivamente, la experimentación se realizó a temperatura ambiente que osciló entre 6 °C y 32 °C. La velocidad de carga orgánica fue desde 0.84 hasta 4.41 kg DQO/(m^3 -día) y el tiempo de retención hidráulico fue 1.3 días. Bajo estas condiciones el material que presentó mejor rendimiento fue la espuma de poliuretano alcanzando una remoción de DQO de 80 % comparado con el 72 % y el 64 % que lograron las piedras machacadas y las cenizas respectivamente. Bertin y colaboradores [77] compararon la eficiencia en la producción de AGV en la etapa acidogénica entre dos materiales carbón activo granulado y filtros de cerámica. Se emplearon temperaturas de 55 °C, 35 °C y 25 °C a diferentes velocidades de carga orgánica desde 8.17 kg DQO/(m^3 -día) a 22 kg DQO/(m^3 -día). Una mayor actividad acidogénica en las bacterias de los reactores empacados con cubos de cerámica, provocó una mayor generación de AGV que en los reactores empacados con carbón activo granulado, en los que prevaleció la metanogénesis. La mayor concentración de AGV en el efluente fue 13.73 kg DQO/ m^3 a 25 °C con una velocidad de carga orgánica de 13.3 kg DQO/(m^3 -día) para el reactor empacado con cubos de cerámica, bajo esas mismas condiciones de velocidad de carga orgánica y temperatura para el reactor empacado con carbón activo granulado la concentración en AGV a la salida del efluente fue 1.5 kg/ m^3 . En cambio, a velocidades de carga orgánica entre 8.17 y 12.5 kg DQO/(m^3 -día) y 35 °C de temperatura la concentración en AGV fue entre 6.12 y 6.23 g/L en el reactor con filtros de cerámica y entre 0.19 y 0.84 g/L en el reactor con

Tabla 1.2. Parámetros básicos de operación en reactores APBR

Volumen (L)	Sustrato	Inóculo	DQO (g/L)	Velocidad carga orgánica (kgDQO/m ³ día)	Tiempo retención hidráulico (día)	Eliminación DQO %	Rendimiento eliminación DQO (kgDQO eliminado/m ³ día)	CH ₄ %	Rendimiento producción metano (L/L _{REACTOR} día)	Temperatura (°C)	Material empacado	Referencia
5	Agua residual sintética	Reactor anaerobio termofílico	44	2.9-12.2	15-3.6	82-74	2.4-9.1	77-67	0.82-2.4	55	Fibras de carbón cilíndricas 90x125 mm	[78]
0.7	Lixiviado de patata	Inóculo mixto planta aguas residuales	20	1.5-6.1	13.2-3.3	93	1.4-5.7	68-59	0.1-1.4	37	Anillos de plástico	[72]
1	Lixiviado de patata	Fango de digestor anaerobio de planta aguas residuales	20	4-12	5-1.7	96-91	3.8-11	65-60	0.63-0.79	37	Anillos de cristal	[73]
5	Agua residual sintética	Reactor anaerobio termofílico	44	12.2	3.6	71	8.6	62	2.3	55	Fibras de carbón cilíndricas 125x90x2 mm	[79]
10	Agua residual de melaza	Planta de tratamiento Coca Cola	5	2.5	2	52-25	1.3-0.6	65-77	0.22	18-5	Fibra de carbono activo	[80]
1.04	Agua residual aceite oliva	Fango reactor batch	15	33	0.45	45-55	14.8	N.D	3.8	35	Carbón activo granulado	[81]
0.25	Vinaza	Sedimentos de río aguas abajo de fábrica de azúcar	10	9-30	1.11-0.33	73-55	6.6-16.5	72	1.4-4.3	40	Anillos de cristal	[82]
22.5	Agua residual industria cervecera	Fango de digestor anaerobio de planta aguas residuales	5	1.5	3	92	1.4	81	0.35	37	Trozos de poliuretano	[83]
2	Agua residual anilina	N.D	24	6	4	85	5.1	N.D	N.D	35	Tubos pequeños de poliuretano	[84]

N.D Dato no disponible

carbón activo granulado, al favorecerse la degradación de los AGV. La temperatura de 25 °C favorece la acidogénesis por encima de la metanogénesis, aumentándose así la concentración de AGV. El material de empacado afecta al desarrollo y tipo de comunidades de microorganismos que se forman en torno a ellos. En los cubos de cerámica se reportó un desarrollo de comunidades bacterianas del filo *Firmicutes* pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Pasteuria* los cuales son conocidos por su actividad acidogénica [85].

1.3.4.1.2 Velocidad de carga orgánica y tiempo retención hidráulico

En la tabla 1.2 se constata que se alcanzan velocidades de carga orgánica de más de 30 kg DQO/(m³·día) como son los casos de los estudios realizados por Bertin y colaboradores y Sánchez Riera y colaboradores [81,82], pero al utilizar estas cargas orgánicas tan elevadas el porcentaje de eliminación de DQO fue bajo de 45 y 55 % respectivamente. Cuando las velocidades de cargas orgánicas están alrededor de 12 kg DQO/(m³·día) [73,78,79] se mantienen rendimientos superiores al 70 % de remoción de DQO, Mshandete y colaboradores [73] reportaron una eliminación de 91 % de DQO para la velocidad de carga orgánica de 12 kg DQO/(m³·día). A velocidades de carga orgánica entre 2 y 6 kg DQO/(m³·día) se obtuvieron unos porcentajes de eliminación de DQO entre 85 y 96 %, utilizando poliuretano como material para el empacado [74,83,84].

1.3.4.1.3 Temperatura

Como se ha mostrado antes, la digestión anaerobia termófila incrementa la producción de biogás [86]. Zhang y colaboradores [80] experimentaron el funcionamiento de un reactor empacado con fibra de carbono a bajas temperaturas. La temperatura fue descendiendo progresivamente desde 18 °C hasta 5 °C. Los resultados mostraron un bajo rendimiento en la eliminación de DQO desde el principio, 52 % a 18 °C, empleando una velocidad de carga orgánica de 2.5 kg DQO/(m³·día) durante todo el proceso. La remoción de DQO descendió a 42 % a 17 °C y a 30 % a 15 °C. Desde los 13 °C hasta los 5 °C el rendimiento en la eliminación de DQO se mantuvo constante con un valor de 25 %.

1.3.4.2 Reactores UASB

Los reactores UASB son el tipo de tecnología más aplicada para realizar la digestión anaerobia de aguas residuales con alta velocidad de carga orgánica, bajos tiempos de

retención hidráulica y baja demanda de energía [87]. El UASB es una columna que contiene un manto de lodos, a través del cual fluye de forma ascendente el agua residual a tratar. El fango anaeróbico el cual provee el anclaje a la microbiota es el principal elemento de un reactor UASB [88].

1.3.4.2.1 Manto de lodos

Los gránulos que forman el manto de lodos están formados por diferentes capas, en cada una de ellas se desarrollan diferentes microorganismos entre los cuales se dan relaciones simbióticas. Cada gránulo es una unidad funcional en sí misma, comprendiendo todos los microorganismos necesarios para realizar la degradación metanogénica de la materia orgánica [89]. Las capas que forman los diferentes gránulos están compuestas por un núcleo central de bacterias metanogénicas acetoclásticas, estas estarían rodeadas a su vez por una capa de acetogénicas productoras de hidrógeno y formiato y metanogénicas consumidoras de hidrógeno y formiato, por último una capa externa de bacterias que realizan la hidrólisis de la materia orgánica compleja [90].

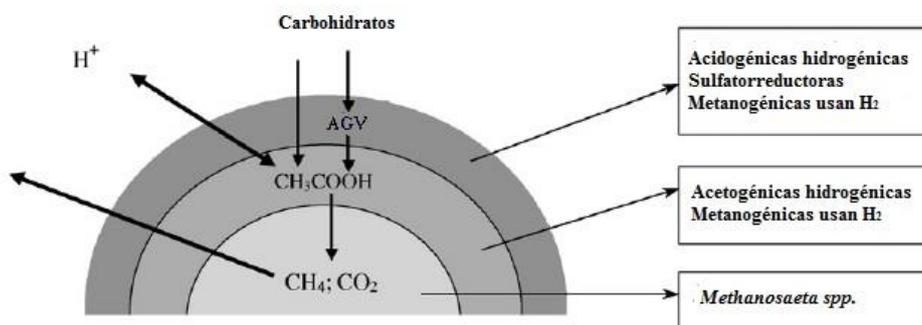


Figura 1.3. Representación multicapa gránulo [91].

El rango de tamaño de los gránulos es de 0.1 mm a 5 mm [92,93]. Los principales factores que afectan a los gránulos son los siguientes:

- El pH y la alcalinidad: un pH cercano a la neutralidad es requerido para la formación adecuada de los gránulos, las arqueas metanogénicas que se encuentran en el núcleo de los gránulos requieren un pH entre 6.3 y 7.8 para un desarrollo correcto. Cuando el pH es inferior las bacterias acidogénicas prevalecen sobre las metanogénicas provocando una acumulación de AGV en el reactor, este aumento de concentración puede llevar a un cambio del pH sobrepasando la capacidad de amortiguación del reactor. Al haber mayor actividad a pH ácido de las bacterias acidogénicas que las metanogénicas el pH

sigue bajando dando lugar a la desintegración de estas últimas [89,94]. Para evitar estas fluctuaciones en el pH es recomendada una relación AGV/alcalinidad entre 0.1 y 0.4 [95].

- La velocidad de carga orgánica: una elevada carga produce un incremento en la concentración de AGV provocando como se ha visto antes la disminución del pH y la correspondiente desintegración de la microbiota metanogénica [88]. Por otro lado velocidades de carga orgánica muy bajas podrían causar limitaciones en la transferencia de masa llevando a la desintegración de los gránulos [96]. Ghangrekar y colaboradores [97] recomiendan para un buen desarrollo del manto de lodos una velocidad de carga orgánica entre 2 y 4.5 kg DQO/(m³·día).
- Velocidad ascensional: velocidades superiores a 1 m/h podrían romper el granulado produciéndose un lavado del manto en el reactor [98].
- Características del sustrato: en el caso de que el sustrato tenga un bajo contenido en AGV, los microorganismos acetogénicos y acidogénicos no son requeridos y solo los metanogénicos son necesarios para realizar la degradación anaerobia, en estos reactores los gránulos están formados principalmente por metanogénicas [99]. Sustratos más complejos pero hidrolizables como por ejemplo glucosa, sacarosa y proteínas dan lugar a una multicapa en los gránulos [90]. Una baja concentración de sustrato en la alimentación puede causar una limitación de sustrato en el núcleo de gránulos grandes produciéndose un vaciado del núcleo dando lugar a la flotación de los gránulos [100].

1.3.4.2.2 Factores que afectan al funcionamiento

1.3.4.2.2.1 Velocidad de carga orgánica, tiempo de retención hidráulico y eliminación de DQO

La velocidad de carga orgánica está relacionada con el tiempo de retención hidráulico, un buen balance entre estos dos parámetros permite desarrollar un buen proceso de digestión anaerobia. Un diámetro muy ancho en comparación con la altura del reactor puede provocar la formación de un canal líquido en el reactor, produciéndose así un menor contacto entre los microorganismos y el residuo a tratar y por tanto una menor eliminación de DQO [87]. Diferentes estudios prueban que el aumento de la velocidad de carga orgánica de valores entre 1 y 4 kg DQO/(m³·día) hasta velocidades de carga orgánica entre 11 y 41 kg DQO/(m³·día) provoca una disminución en la eliminación de DQO de hasta un 48 % como se observa en la tabla 1.3 [101-106]. Al incrementar la

Tabla 1.3. Parámetros básicos de operación en reactores UASB

Volumen (L)	Relación altura/diámetro	Sustrato	Velocidad ascensional (m/h)	Velocidad carga orgánica (kgDQO/m ³ día)	Tiempo retención hidráulico (día)	Eliminación DQO %	Rendimiento eliminación DQO (kgDQO eliminado/m ³ día)	Rendimiento producción metano (m ³ CH ₄ /kg DQOañadida)	Temperatura (°C)	Referencia
2.06	18	Agua residual industria de yuca	0.008-0.042	3.7-18.8	1-5	91-43	3.3-8.1	0.02-0.08	35	[101]
15	2.6	Vinaza caña de azúcar	0.01	23	2	71	16.3	0.21	40	[107]
0.8	N.D	Paja de trigo diluida hidrolizada	N.D	1.2-10.4	7.5-2.7	96-94	1.1-9.7	0.30-0.26	37	[102]
15	15	Aceite de palma	0.02	2.5-10.6	4	98	2.4-10.4	0.32-0.26	35	[108]
0.8	N.D	Lixiviado de algas marinas	N.D	2.9-20.6	3.7-0.5	84-80	2.2-14.7	0.23-0.16	37	[103]
0.25	N.D	Vinaza trigo	N.D	12-41	2	77-31	8.5-13	0.13-0.03	55	[104]
1.2	4.4	Jugo de patata	N.D	3.2-6.4	8-4	N.D	N.D	0.22-0.16	37	[105]
16	15	Agua residual industria cerveza	0.09	1.5	0.75	91	1.4	0.21	22	[109]
1.2	N.D	Aceite de palma	N.D	2-5.8	10-5	95-92	1.9-5.3	0.36-0.45	55	[106]

N.D Dato no disponible

trabajan lo suficientemente rápido para transformar el ácido acético en metano [87], disminuyendo el rendimiento en producción de metano por DQO añadida desde valores superiores a 0.22 L CH₄/g DQO_{añadida} a inferiores a 0.16 L CH₄/g DQO_{añadida} [102,103,105,108] como muestra la tabla 1.3.

1.3.4.2.2 Temperatura

La digestión anaerobia termófila mejora la biodegradabilidad de la materia orgánica [86]. Diferentes estudios han reportado que se genera un mayor volumen de biogás en los reactores termófilos que en los mesófilos, como por ejemplo Yilmaz y colaboradores [110] reportaron una producción de biogás de 2.67 L/(L_{REACTOR}·día) y 2.83 L/(L_{REACTOR}·día) para reactores mesófilos y termófilos respectivamente. Kim y colaboradores [111] reportaron que los reactores termófilos a bajos tiempos de retención hidráulicos generan mayor volumen de biogás que los mesófilos, compararon reactores a 40 °C, 45 °C y 50 °C con un tiempo de retención hidráulico de 10 horas obteniéndose 145, 177 y 216 L CH₄/kg DQO_{degradada} respectivamente

En cambio Patel y Madamwar [112], reportaron un descenso en la eliminación de DQO de 95 % a 38 % al incrementar la temperatura de 37 °C a 45 °C y 55 °C respectivamente. Uemura y colaboradores [113] realizaron un estudio con reactores a baja temperatura de 25 °C a 13 °C y velocidades de carga orgánica inferiores a 3 kg DQO/(m³ · día), constatando un descenso en la eliminación de DQO conforme se va descendiendo la temperatura, sin alcanzar valores superiores al 72 % de eliminación de DQO en ninguno de los reactores. En la tabla 1.3, se observa que todos los estudios mostrados en la misma superaron el 80 % de eliminación de DQO, a esa velocidad de carga orgánica, cuando la temperatura fue igual o superior a 35°C [101-103,106,108,109].

1.3.5 Rol de materiales conductores en digestión anaerobia

1.3.5.1 Transferencia directa de electrones entre especies (DIET)

Es la relación sintrófica entre dos microorganismos por la que se produce una transferencia de electrones entre los mismos. En los últimos ocho años se han publicado diversos estudios sobre cómo funciona el DIET, que bacterias y arqueas participan en la transferencia de electrones, que fuentes de carbono pueden ser objeto del DIET, a través de que vías se produce el transporte de electrones y que beneficios se obtienen en la digestión anaerobia al darse este fenómeno. En la actualidad el estudio de estas sintrofia entre bacterias y arqueas, y su perspectiva de futuro aún está en sus

comienzos, ya que se siguen encontrando nuevas relaciones entre bacterias exoelectrogénicas y arqueas electrotróficas que se desconocían, con un interés especial en metanogénicas capaces de actuar comoceptoras de electrones; así como las fuentes de carbono empleadas para realizar estos procesos de oxidación-reducción. En DIET los electrones libres fluyen de una célula a otra sin ser transportados por moléculas reducidas tales como hidrógeno molecular o formiato [114]. DIET no requiere de un servicio de transporte de electrones, en lugar de ello emplea citocromos de la membrana externa, un conductor de electrones (pilus), o la formación de agregados de múltiples especies [16]. Para que se produzca este transporte de electrones es necesaria la participación de una bacteria exoelectrogénica y una bacteria o arquea electrotrófica [114]. La bacteria exoelectrógena actúa como donadora de electrones mientras que la electrotrófica realiza el papel de aceptora de electrones. En la figura 1.4 se observan los tres mecanismos biológicos de transporte de electrones sin material conductor añadido, el de la izquierda utiliza hidrógeno y formiato como transportadores, en medio el transporte se realiza a través de citocromos y en el de la derecha la transferencia de electrones se lleva a cabo a través de los pili.

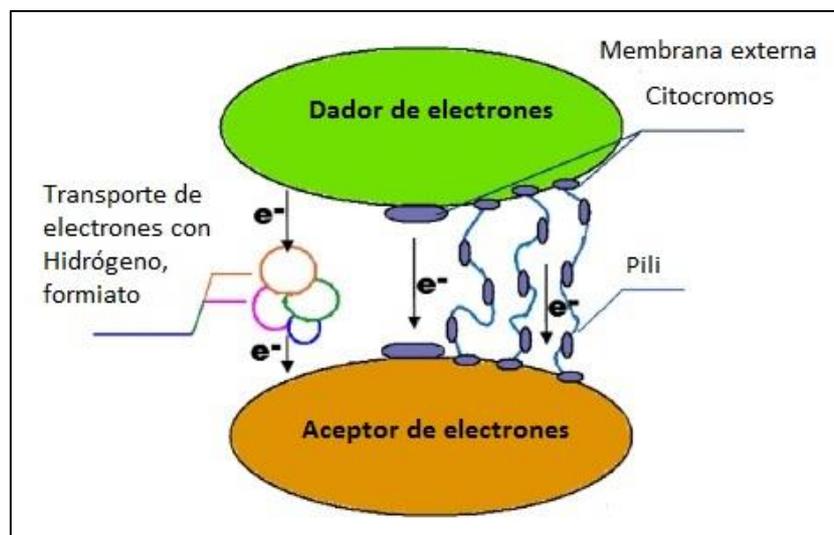


Figura 1.4. Esquema transferencia de electrones entre bacterias exoelectrogénicas y electrotróficas [114].

El primer estudio que hace referencia a DIET es el realizado en 2010 por Summers y colaboradores [115]. Estudiaron el comportamiento de las especies *Geobacter sulfurreducens* y *Geobacter metallireducens*, observaron que en este cocultivo de bacterias se daba una relación sintrófica entre ellas, desarrollando citocromos tipo C como vía para el transporte de electrones. Utilizando etanol como dador de electrones

y fumarato como aceptor. *Geobacter sulfurreducens* consume el acetato generado por *Geobacter metallireducens* con la reducción de fumarato a succinato (figura 1.5).

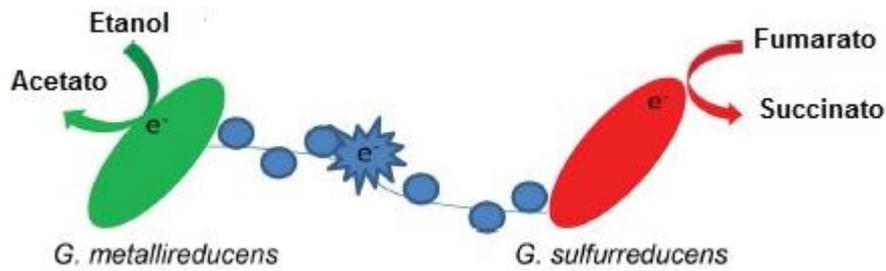


Figura 1.5. Transferencia de electrones entre *G. metallireducens* y *G. sulfurreducens* [115].

En 2011, el estudio de Morita y colaboradores [116] mostró la capacidad de arqueas metanogénicas de ser receptoras de electrones vía DIET. La fuente de carbono al igual que en el anterior fue etanol, pero en este caso se metaboliza a metano. En 2012, Liu y colaboradores [19] constataron DIET con materiales conductores como transportadores de electrones entre bacterias y bacterias (*Geobacter sulfurreducens* con *Geobacter metallireducens*), y entre bacterias y arqueas (*Geobacter metallireducens* con *Methanosarcina barkeri*). El soporte conductor mejora la velocidad de transferencia de electrones, a la vez que sustituye a las vías biológicas en el caso de que estas estén ausentes.

En 2014, Rotaru y colaboradores [117] demostraron que DIET se produce de forma espontánea en los consorcios microbianos desarrollados en reactores anaerobios. Para corroborar este hecho, aislaron de un reactor anaerobio *Geobacter metallireducens* y *Methanosaeta harundinacea* e introdujeron como fuente de carbono etanol. *Geobacter metallireducens* oxida el etanol formando acetato y a la vez envía electrones a través del pilus a *Methanosaeta harundinacea*. Estos electrones son aceptados por la arquea metanogénica la cual los emplea para reducir CO_2 a CH_4 . El acetato es también degradado dando lugar a metano. En la figura 1.6, se muestra que la relación sintrófica entre las especies mencionadas, provoca que por cada dos moléculas de etanol se formen tres de metano, dos por la degradación del acetato y una más por la reducción de dióxido de carbono a metano vía DIET.

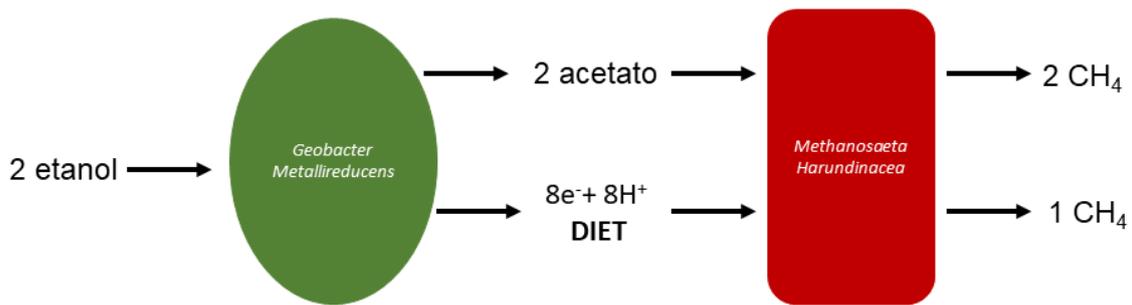


Figura 1.6 Modelo de transporte de electrones entre *Geobacter* y *Methanosaeta* [117]

Rotaru y colaboradores [118] demostraron que *Methanosarcina Barkeri*, sin material conductor, es capaz de realizar DIET al igual que *Methanosaeta Harundinacea* siendo esta la segunda metanogénica encontrada con capacidad para reducir dióxido de carbono a metano vía DIET. Chen y colaboradores [119] y Liu y colaboradores [120] empleando tela de carbono y magnetita como materiales conductores respectivamente, demostraron que cepas mutadas de *Geobacter Metallireducens*, a las que se les habían eliminado la capacidad de producir pili o citocromos para realizar DIET, llevaron a cabo este transporte de electrones a través de los materiales conductores agregados. Corroborando así, que al añadir un material conductor no es necesaria la presencia de pili o citocromos en las bacterias para que se realice DIET.

Otros estudios mostraron diferentes sustratos que pueden ser oxidados en un proceso DIET. Wang y colaboradores [121] emplearon butanol y propanol en su estudio demostrando que ambos sustratos pueden ser oxidados y reducidos a metano por arqueas electrotróficas. Por otro lado, Cruz Viggli y colaboradores [21], mostraron que el propionato es participe en reacciones de oxidación-reducción como agente reductor gracias al transporte de electrones que se produce a través de la magnetita.

1.3.5.1.1 Transferencia de electrones por pili microbianos

Diferentes evidencias sugieren que la conductividad que se genera en el pilus es similar a la que se produce en polímeros orgánicos sintéticos lo cual puede ser atribuido a la cercanía entre los aminoácidos aromáticos que se desarrollan a lo largo del pilus facilitándose este transporte de electrones [122]. La conductividad del pilus ha sido medida en diferentes estudios, para Adhikari y colaboradores [123] la conductividad del pilus de *Geobacter sulfurreducens* fue de 188 mS/cm, 51 mS/cm y 0.04 mS/cm para pH 2, 7 y 10.5, Tan y colaboradores [124] también evaluaron la conductividad del pilus a pH 2, 7 y 10.5 al igual que en el estudio anterior, pero en esta investigación emplearon un pilus sintético en *Geobacter sulfurreducens*, los resultados para la conductividad fueron significativamente superiores 393,000 mS/cm, 10,000 mS/cm y 300 mS/cm para pH 2,

7 y 10.5 respectivamente. Este crecimiento a medida que se disminuye el pH se debe a un cambio en la estructura de los aminoácidos aromáticos, los cuales quedan más próximos entre ellos, produciéndose un solapamiento en los orbitales π - π de los aminoácidos aromáticos con el consecuente incremento de la conductividad [125]. Lampa-Pastirk y colaboradores [126] obtuvieron una conductividad de 1,400-4,300 mS/cm en *Geobacter sulfurreducens*. Se han realizado estudios en otras especies del género *Geobacter*, Tan y colaboradores [127] estudiaron la conductividad del pilus en *Geobacter uraniireducens* a pH 7 presentando unos valores de 0.3 mS/cm, Tan y colaboradores [128] midieron la conductividad en *Geobacter metallireducens* a pH 7 con un resultado de 277,000 mS/cm, se observa que no todas las especies de *Geobacter* generan pili con la misma conductividad, las diferencias entre las tres especies de *Geobacter* son muy notables al mismo pH 7 277,000 mS/cm, 10,000 mS/cm, 51 mS/cm y 0.3 mS/cm para *metallireducens*, *sulfurreducens* con pilus sintético, *sulfurreducens* y *uraniireducens* respectivamente. Estas diferencias tan grandes entre unas especies y otras se debe a la densidad de aminoácidos aromáticos presentes en los diferentes pili, siendo esta densidad superior en los que presentan mayor conductividad [128,129]. Venkidusamy y colaboradores [130] mostraron unos resultados con una conductividad de 35 a 72 μ S/cm para *Rhodopseudomonas palustris* inferior a los reportado sobre *Geobacter*. Las diferencias en la conductividad se deben a dos principales motivos, la densidad de aminoácidos aromáticos presentes y el grado de apilamiento de los enlaces π - π [123-125,129].

1.3.5.2 Superación de barreras inhibitorias en digestión anaerobia

1.3.5.2.1 Alta presión parcial de H₂ y cambios de pH

En las últimas décadas, se ha descrito ampliamente el metabolismo sintrófico entre especies con transferencia de H₂ en la metanogénesis, el transporte de electrones se da empleando el H₂ como transportador de electrones [131]. Este metabolismo sintrófico funciona mientras las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas mantengan una concentración baja de H₂ que favorezca termodinámicamente la producción de metano [131]. La presión parcial de hidrógeno es el factor clave que limita el metabolismo sintrófico para la degradación de butirato y propionato mediante el transporte de electrones a través de hidrógeno [21,132]. Zhao y colaboradores realizaron un estudio para comprobar el efecto del DIET a altas presiones parciales de H₂. En la figura 1.7 se observa que la producción de metano y la degradación de AGV fue superior en los reactores con material conductor. A partir del día 4 el reactor control no produjo metano

ni degradó AGV, por otro lado, la producción de metano en los reactores con material conductor continuó hasta alcanzar un valor 2.4 veces superior al reactor control (71.9 ml de metano) prácticamente igual a la producción de metano estequiométricamente estimada (73.2 ml).

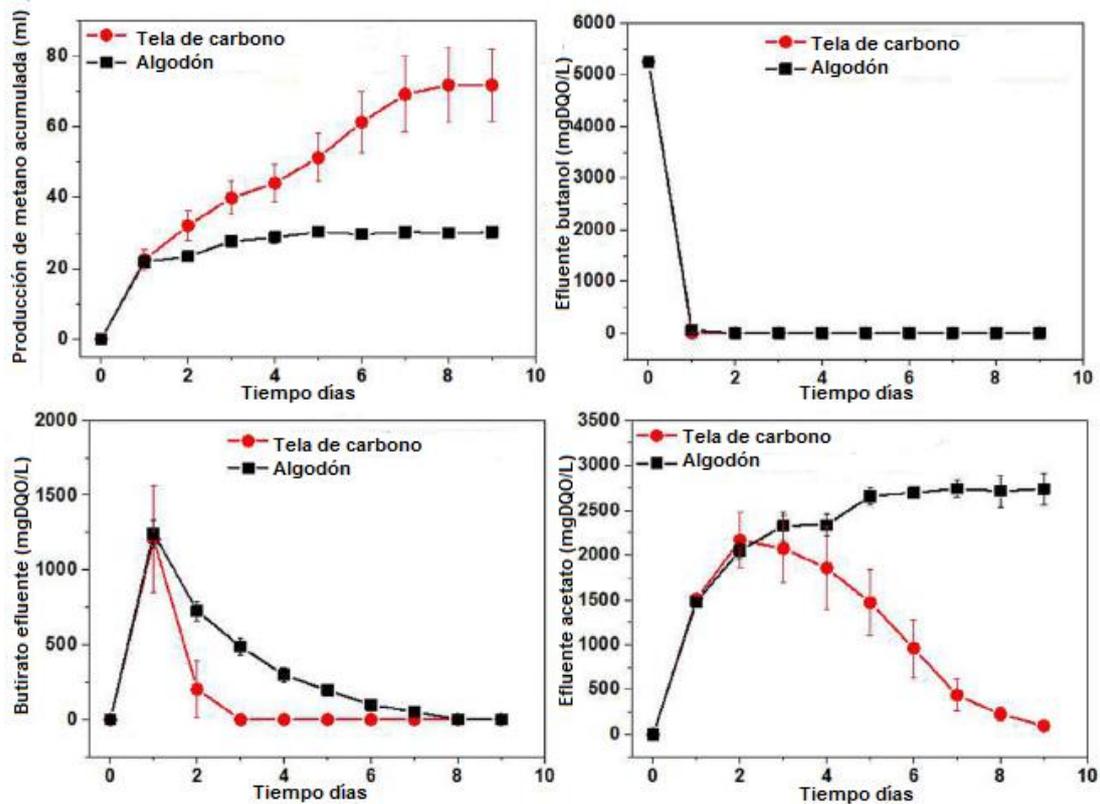


Figura 1.7 Rendimiento reactor a presión parcial de H₂ elevada (17.23 kPa) [133].

Xu y colaboradores [134] y Zhao y colaboradores [135] corroboraron el efecto que produce DIET en condiciones de alta presión parcial de hidrógeno, mostrando en sus resultados una degradación de AGV en los reactores con materiales conductores 3 y 1.5 veces superior a los reactores controles respectivamente.

Al producirse el transporte de electrones vía DIET en lugar de IHT se evita la inhibición del proceso por alta presión parcial de hidrógeno, superándose la barrera inhibitoria que supone este fenómeno en los procesos de digestión anaerobia. Bajo estas condiciones, DIET es la principal vía en la transferencia de electrones entre especies.

Zhao y colaboradores [133] analizaron el efecto de pasar de un pH neutro 7 a un pH ácido 5 y la recuperación de los reactores cuando se vuelve a pH 7. Es de destacar la capacidad de recuperación de los reactores en los que se promueve el DIET. Una vez que el pH es 5 en ambos reactores decrece la producción de metano siendo un 59 % superior en el reactor con DIET. Cuando se vuelve a estabilizar el pH a 7, el reactor

DIET recupera el 85 % de su rendimiento inicial a los 15 días, mientras que el reactor control solo llega al 33 % de su rendimiento inicial.

En la figura 1.8 se observa como la acidificación ocasionó un aumentó en la presión parcial de H_2 en el reactor control inhibiéndose así la metanogénesis al no contar con un soporte conductor para realizar el DIET. La capacidad para poder utilizar los 2 modos de metabolismo sintrófico DIET y IHT es el motivo por el cual el reactor DIET pudo resistir los impactos ácidos [133].

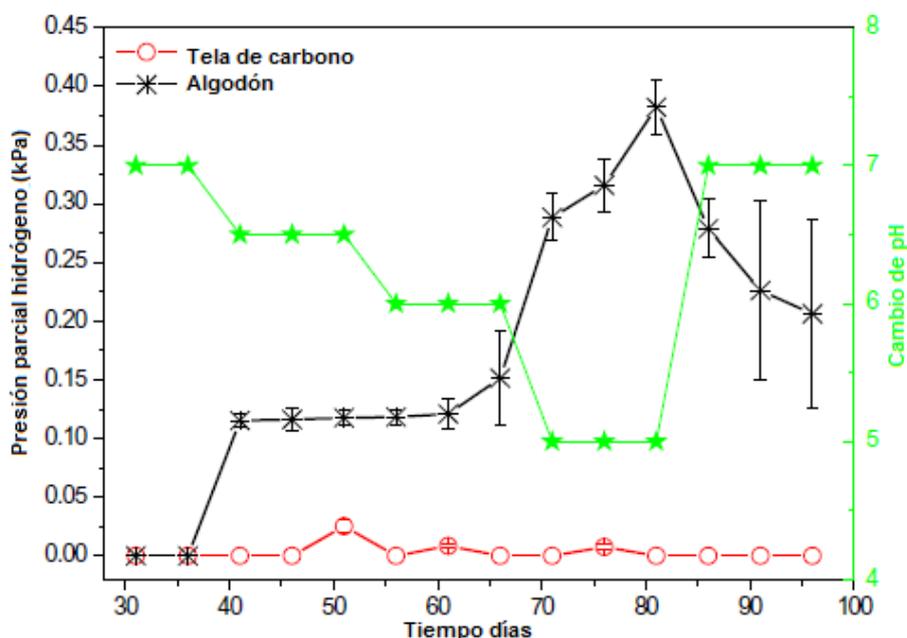


Figura 1.8 Variación presión parcial H_2 en cambio de pH [133]

1.3.5.2.2 Competencia con bacterias sulfatorreductoras

La presencia de sulfatos en un agua residual genera el desarrollo de bacterias sulfatorreductoras que compiten con las metanogénicas por los electrones [136]. Con una relación DQO/ SO_4 de 10, las metanogénicas aceptan el 94 % de los electrones, cuando esta relación baja de 2 las sulfatorreductoras toman la mitad de los electrones, a proporciones de 0.5 las sulfatorreductoras aceptan el 88 % de los electrones ganando la competencia a las metanogénicas [137]. Li y colaboradores [138], realizaron un estudio con un agua residual sintética con una proporción DQO/ SO_4 de 1.2, al reactor UASB le añadieron 25.7 g/L de acero inoxidable como material conductor. Los resultados mostraron una mayor remoción de DQO en el reactor con acero inoxidable 73 % en comparación con el reactor control 64 %. La eliminación de sulfato fue mayor en el reactor control 83 %, en cambio en el reactor con acero inoxidable fue 80 %. Al

introducir el material conductor se favorece a las metanogénicas en la competencia por los electrones entre sulfatorreductoras y metanogénicas, de ahí la mayor degradación de DQO por tanto mayor generación de metano, y la menor reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno en el mismo. Cuando calcularon el máximo flujo de electrones para el acero inoxidable y para el transporte de electrones entre especies con hidrógeno como molécula transportadora de electrones, los resultados mostraron un valor de $8.2 \cdot 10^{-5}$ A para el DIET a través del acero inoxidable y $2.1 \cdot 10^{-13}$ para el transporte de electrones entre especies con hidrógeno en la sulfato reducción, siendo una ventaja cinética de 10^8 superior entre metanogénicas y sulfatorreductoras.

1.3.5.2.3 Acumulación AGV

El incremento de la concentración de AGV en el efluente de un reactor es una señal de mal funcionamiento [139]. El aumento de los AGV en el medio puede provocar una acidificación del mismo, en este medio acidificado gran parte de las arqueas metanogénicas no son viables inhibiéndose consecuentemente la generación de metano [140]. Cuando la transferencia de electrones es vía DIET se produce la oxidación de los AGV y la posterior reducción de dióxido de carbono a metano [141,142]. DIET reemplaza a IHT como la vía dominante en el IET, dándole al sistema anaerobio una mayor robustez y capacidad para soportar condiciones desfavorables, y así tener un desempeño adecuado [21]. El ácido propiónico es el AGV que provoca más problemas de inhibición en reactores anaerobios, debido a que la reacción para su degradación no es espontánea y que las bacterias participantes en ella pueden ser inhibidas si la presión parcial de hidrógeno aumenta, cuando se realiza a través de IHT [143]. El valor de energía libre de Gibbs para la conversión de propionato en acetato a 37 °C y pH 7 es 76 kJ/mol vía IHT. En cambio, cuando el transporte es mediante DIET este valor es negativo (-26.4 kJ/mol) siendo la reacción espontánea [143]. Diferentes estudios realizados hasta la fecha muestran un incremento en la degradación de AGV entre el 31 y 1,100 % en reactores DIET [144-147], evitando estos reactores problemas de inhibición, debido a la acumulación de AGV y la correspondiente acidificación del reactor.

1.3.5.3 Rendimiento de metano

La velocidad en el flujo de electrones se ve modificada en los reactores con materiales conductores, debido a un incremento en la velocidad del transporte de electrones entre bacterias y arqueas por vía DIET. Cruz Viggi y colaboradores [21] reportan en sus

cálculos teóricos, que el flujo de electrones máximo a través de magnetita es 10^6 veces superior al que se produce en la transferencia de electrones con hidrógeno como transportador de electrones (IHT). Este efecto tiene como consecuencia un incremento en la concentración de metano en el biogás generado aumentando el rendimiento de metano de los reactores DIET. El incremento en la concentración de metano del biogás se debe a una eficiente recuperación de los electrones cuando el transporte de los mismos se realiza a través de materiales conductores como CAG. Lin y colaboradores [148] demostraron en su estudio una eficiencia en la recuperación de electrones del 95 % cuando el transporte fue por DIET, mientras esta alcanzó el 76 % a través de moléculas transportadoras de electrones. Este aumento provoca una mayor reducción de dióxido de carbono a metano aumentando la concentración del mismo en el biogás. Diferentes estudios han reportado incrementos en el rendimiento de metano entre el 20 y 300 % en reactores metanogénicos con materiales conductores añadidos [15,23,141,143-145,149-151]. En estos estudios los sustratos empleados en su gran mayoría fueron AGV directamente o sustratos de fácil biometanización como glucosa o agua residual sintética.

En la tabla 1.4 se observa que al añadir el material conductor a los 10 días del arranque el rendimiento en la producción de metano es superior a $3 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{REACTOR}} \cdot \text{día})$ [15,145], en los reactores que se introdujo el material conductor desde el inicio o antes de los 10 días no se alcanzaron producciones superiores a $1.34 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{REACTOR}} \cdot \text{día})$ [133,138,150,152,153].

Tabla 1.4 Arranque reactores DIET

Volumen reactor (L)	Masa de soporte (g)	Área soporte (cm ²)	Tiempo adición soporte al reactor (días)	Material soporte	Rendimiento metano (L/L _{REACTOR} ·día)	Referencia
2	100	900	0	Carbón activo granulado	1,34	[150]
1	2,5	200	10	Tela de carbono	0.72-3.6	[15]
1	5	1045	10	Biochar	3,44	[145]
0,8	N.D	400	8	Tela de carbono	0,93	[133]
1,2	N.D	1000	0	Tela de carbono	0,6	[152]
0,7	18	N.D	0	Acero inoxidable	0,43	[138]
2	100	900	0	Carbón activo granulado	0,2	[153]

N.D Dato no disponible

1.3.5.5 Bacterias exoelectrogénicas y arqueas electrotróficas

Técnicas de biología molecular han sido empleadas para identificar microorganismos participantes en DIET. Entre estas técnicas destacan la secuenciación de genes 16S ARNr y reacción en cadena de polimerasa PCR (por sus siglas en inglés) [23].

La primera evidencia de DIET entre bacterias y arqueas metanogénicas fue encontrada en un reactor UASB con agua residual de cervecería como sustrato [116]. Como bacteria donadora de electrones fue identificada *Geobacter* y como metanogénica electrotrófica *Methanosaeta*. En 2014 Rotaru y colaboradores [117] aislaron de un reactor UASB *Geobacter metallireducens* y *Methanosaeta harundinacea*, en su estudio demostraron la transferencia de electrones entre bacterias y arqueas metanogénicas. A partir del año 2015 se han realizado multitud de estudios en los que se han identificado diferentes bacterias y arqueas participantes en DIET. La bacteria que ha sido reportada en mayor número de estudios como donadora de electrones en un proceso DIET es *Geobacter* [23]. En los múltiples estudios realizados, en reactores con materiales conductores, se han empleado diferentes tipos de inóculos mixtos con diversas procedencias. Los estudios de biología molecular realizados a las comunidades bacterianas desarrolladas en los materiales conductores, han mostrado una gran diversidad de bacterias con la capacidad de participar en DIET como donadoras de electrones. Además de *Geobacter*, las bacterias reportadas como exoelectrogénicas participantes en DIET han sido *Syntrophomonas*, *Bacillus*, *Sedimentibacter*, *Thauera*, *Trichococcus*, *Clostridium*, *Tepidoanaerobacter*, *Coprothermobacter*, *Sporanaerobacter*, *Pseudomonas*, *Kosmotoga*, *Coloramator* y *Proteiniclasticum* [147,148,150,154-161]. Diferentes arqueas electrotróficas han sido reportadas en procesos DIET. Las principales metanogénicasceptoras de electrones identificadas han sido *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanolinea* y *Methanospirillum* [119,121,144,148,149].

La adición de materiales porosos como CAG tiene efectos beneficiosos en el desarrollo de las comunidades bacterianas. Las biopelículas formadas en los materiales conductores mantienen la biomasa microbiana más estable que la establecida en suspensión en el reactor [143]. Debido a la porosidad de CAG y al desarrollo de las comunidades en el interior de los poros, se reduce la pérdida de biomasa microbiana por lavado [162]. Además se reduce la distancia entre las bacterias exoelectrogénicas y las arqueas electrotróficas acelerándose la producción de biogás [15]. Ren y colaboradores [163] registraron una concentración de biomasa en un reactor con soporte de 15.5 g SSV/ L mientras que en el reactor sin soporte la concentración alcanzada fue 6.48 g SSV/ L.

HIPÓTESIS

Con base a los descrito en este trabajo se propuso que la digestión anaerobia del nejayote en dos etapas, con un reactor hidrolítico de columna empacada con microaireación y un reactor anaerobio de flujo ascendente con transferencia directa de electrones entre especies microbianas, incrementará el rendimiento de metano, degradación de ácidos grasos volátiles y reducirá el tiempo de tratamiento, con respecto a una digestión anaerobia en dos etapas, sin microaireación ni transferencia directa de electrones entre especies microbianas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Mejorar el proceso de digestión anaerobia en dos etapas (hidrolítica y metanogénica), mediante el empleo de microaireación en la etapa hidrolítica y transferencia directa de electrones entre especies microbianas en la etapa metanogénica, en el tratamiento de nejayote.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar físico-químicamente el nejayote.
- Caracterizar el carbón activado granulado.
- Determinar el potencial de biometanización del nejayote.
- Determinar el potencial de biometanización del nejayote con carbón activado granulado.
- Identificar las comunidades de bacterias y arqueas en el ensayo de potencial de biometanización con carbón activado granulado.
- Diseñar, construir y ensamblar los reactores.
- Estimar los parámetros operacionales; eliminación de demanda química de oxígeno y concentración de ácidos grasos volátiles para el posterior acoplamiento de reactores.
- Comparar hidrólisis con y sin microaireación en reactores de columna empacada.
- Comparar la capacidad de soportar altas cargas orgánicas entre reactores anaerobios de flujo ascendente con y sin transferencia de electrones directa entre especies microbianas.
- Comparar los rendimientos de metano y eliminación de demanda química de oxígeno y ácidos grasos volátiles en los reactores anaerobios de flujo ascendente con y sin transferencia de electrones directa entre especies microbianas.
- Identificar las comunidades de bacterias y arqueas en los reactores anaerobios de flujo ascendente con y sin transferencia de electrones directa entre especies microbianas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Toma de muestras

Las muestras de nejayote se obtuvieron de la empresa Harinera Yucatán S.A de C.V Grupo Maseca (GRUMA). Se transportaron en bidones de 25 L de policarbonato de alta densidad y fueron conservados en un ultracongelador a -80°C.

2.2 Caracterización nejayote

Se realizó una caracterización del nejayote de los parámetros fundamentales.

Tabla 2.1. Parámetros a analizar y métodos empleados en el análisis del laboratorio.

Parámetro	Método
Temperatura	Método Hach sension 156/54650-18
pH	Método Hach sension 156/54650-Sección 3
Sólidos suspendidos totales (SST)	Método 2540, Standard Methods 2005
Sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV)	[164]
Alcalinidad	[164]
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Colorímetro Hach DRB-890/8000
NT	Colorímetro Hach DRB-890/10072
N-NH ₃	Colorímetro Hach DRB-890/10023
PO ₄ ³⁻	Colorímetro Hach DRB-890/8190
SO ₄ ²⁻	Colorímetro Hach DRB-890/8051
AGV	Cromatografía de gases

2.3 Inóculo

Se empleó un consorcio microbiano mixto nativo no anaerobio conformado por suelo profundo 30 g/L, excreta vacuna 300 g/L, excreta porcina 150 g/L, Na₂CO₃ comercial 1.5 g/L, y agua de la llave 1,000 mL el cual ya fue probado con éxito para la digestión de nejayote [27].

2.4 Caracterización carbón activado granulado

Se realizó una caracterización del CAG para conocer su conductividad y su área específica.

Para la medición de la conductividad del CAG se utilizó un equipo Keithley 2400, el CAG se introdujo en tres tubos de PVC de 50.41 mm, 53.08 mm y 50.78 mm de longitud y 18.00 mm de diámetro.



Figura 2.1. Tubos PVC con CAG

Con el equipo mencionado anteriormente se realizaron las medidas de resistencia del CAG. Aplicando las siguientes formulas se obtuvo el valor de conductividad para el material. Donde R es la resistencia medida por el equipo, A el área de la base del tubo, L la longitud del tubo, ρ la resistividad y K la conductividad.

$$R = \rho \frac{L}{A}$$

$$K = \frac{1}{\rho}$$

2.5 Ensayo BMP nejayote

Este ensayo se llevó a cabo como el que se realizó en un estudio previo [165] con alguna modificación. El test se realizó por triplicado en reactores de cristal de 115 mL. En cada reactor se añadieron 60 g entre inóculo (i) y sustrato (s), nejayote, con una relación de sólidos volátiles inóculo (SVi)/ sólidos volátiles sustrato (SVs) = 2 denominados reactores nejayote. Adicionalmente se analizó el potencial de biometanización del inóculo en tres reactores con 60 g de inóculo y sin sustrato denominados reactores inóculo. La producción de los reactores inóculo se restó a los generados por los reactores nejayote (nejayote corregido). El ensayo se desarrolló a una temperatura de 38 °C, agitación de 100 rpm y pH entre 6.8 y 7.5.

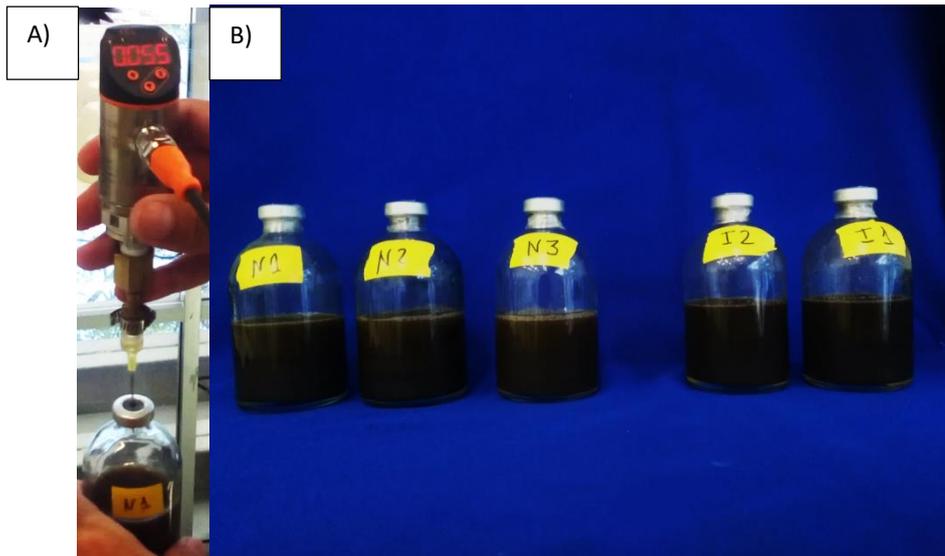


Figura 2.2. A) Manómetro digital y B) Reactores BMP.

Previamente el oxígeno fue desplazado del interior de los reactores con nitrógeno en una cámara de anaerobiosis para eliminar la presencia de aire, inmediatamente fueron tapados con septum de goma y sellados con anillos metálicos. Los reactores fueron introducidos en una incubadora con agitador. La producción de biogás se midió de forma manométrica, se utilizó un manómetro digital ifm modelo PN 2596 con una jeringa acoplada, la cual atraviesa el septum de goma e indica la sobrepresión generada por el biogás producido como se observa en la figura 2.2. Cada vez que se midió la presión se realizó un venteo para vaciar la presión acumulada en el reactor. La composición del biogás se analizó por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Perkin Elmer modelo Clarus 500, la columna fue Perkin Elmer modelo Elite GCGS Molesieve, 30 m, 0.53 mm de diámetro, detector TCD a 200 °C y horno a 50 °C con un tiempo de corrida de 6 minutos. El inóculo se mantuvo durante 10 días a 38 °C para su desgasificación, y así disminuir su influencia en la producción de biogás durante el BMP, como se reporta en la literatura [59,63,165].

Para calcular el volumen de biogás y de metano producidos se utilizaron las siguientes ecuaciones reportadas previamente en la literatura [165].

En la ecuación 1 se calcula el volumen de biogás producido a 0 °C y 1 atm de presión, donde V_{biogas_STP} es el volumen de biogás producido, $V_{headspace}$ es el volumen vacío que queda en el reactor, $P_{headspace}$ es la presión medida con el manómetro, P_{STP} es la presión en condiciones estándar 1013.25 mbar y T_{STP} es la temperatura en condiciones estándar 273.15 °K y T es la temperatura de la experimentación en este caso 311.15 °K.

$$(1) \quad V_{biogas_STP} = V_{headspace} \cdot \frac{P_{headspace}}{P_{STP}} \cdot \frac{T_{STP}}{T}$$

Con el objetivo de tener una mayor precisión en el contenido de metano del biogás es necesario corregir el efecto del contenido de vapor de agua en el biogás el cual es asumido que está saturado en agua. En la ecuación 2 se pasa el valor de CH₄ en condición húmeda a CH₄ en condición seca.

$$(2) \quad \%CH_{4_dry} = \%CH_{4_wet} \cdot \left(1 - \frac{P_{vap}}{P_{amb} + P_{headspace}} \right)$$

%CH_{4_dry} es el porcentaje de metano en condiciones secas, %CH_{4_wet} es el porcentaje de metano en condiciones húmedas el cual se obtiene de la medición en el cromatógrafo de gases. P_{vap} es la presión del vapor de agua a la temperatura de 38 °C, este valor se calcula utilizando la ecuación de Antoine dando 65.50 mbar. P_{amb} es la presión ambiental que en este caso es 1013.25 mbar debido a que la experimentación se llevará a cabo a nivel del mar.

En la ecuación 3 se calcula el volumen de metano producido entre intervalos de venteo el cual se denomina ΔV_{CH₄}. %CH_{4_dry_current} es el volumen de metano en condiciones secas al comienzo de un ciclo de venteo, %CH_{4_dry_previous} es el volumen de metano en condiciones secas al fin del ciclo de venteo.

$$(3) \quad \Delta V_{CH_4} = \left(V_{headspace} \cdot \frac{T_{STP}}{T} + V_{biogas_STP} \right) \cdot \%CH_{4_dry_current} - \left(V_{headspace} \cdot \frac{T_{STP}}{T} \right) \cdot \%CH_{4_dry_previous}$$

En la ecuación 4 se calcula la tasa de rendimiento de metano (R_{CH₄}) donde Δt es el tiempo que transcurre entre venteos. La ecuación 5 nos da el valor del volumen acumulado de metano.

$$(4) \quad R_{CH_4} = \frac{\Delta V_{CH_4}}{\Delta t}$$

$$(5) \quad V_{CH_4_cumulated} = \sum_{i=1}^n \Delta V_{CH_4_i}$$

Al finalizar la experimentación se midió el pH, el potencial redox y los AGV por cromatografía, el cromatógrafo empleado fue Perkin Elmer modelo Clarus 500, la columna Agilent J&W con 30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro, el método utilizado comienza un 1 minuto con el horno a 100 °C, con una rampa de 10 °C/min hasta 150 °C durante 4 minutos, a continuación se incrementa la temperatura 10 °C/min hasta 180 °C manteniéndose a esa temperatura 5 minutos y por último se aumenta la temperatura hasta 230 °C a razón de 10 °C/min durante 5 minutos.

Al finalizar el ensayo se calculó el metano que quedó sin formarse en forma de DQO. Es admitido que un 1 g/L de DQO produce alrededor de 350 mL de CH₄ [52]. Aplicando la siguiente ecuación se puede obtener el volumen de metano que no se generó y quedó en forma de DQO [49].

$$(6) V_{CH_4} \text{ (ml)} = \text{g DQO}_{VFA}/L \cdot \text{Volumen del medio (L)} \cdot 350 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}$$

2.6 Ensayo BMP nejayote con CAG

Este ensayo se realizó empleando la misma metodología que en el ensayo anterior. En esta experimentación además se añadieron 3 g de CAG a tres reactores con inóculo y se dejó incubar durante 10 días. Pasados los 10 días se añadió nejayote a estos reactores y se prepararon el resto de reactores; tres solo con inóculo, tres con inóculo y nejayote, tres con inóculo, nejayote y 3 g de CAG. Esto se realizó en condiciones anaeróbicas en todo momento.

La nomenclatura asignada para los diferentes ensayos BMP fue la siguiente:

- N para los reactores con lodo y nejayote.
- N0 para los reactores con lodo, nejayote y CAG.
- N10 para los reactores con lodo, nejayote y el inóculo incubado con el CAG 10 días antes de añadir el nejayote.

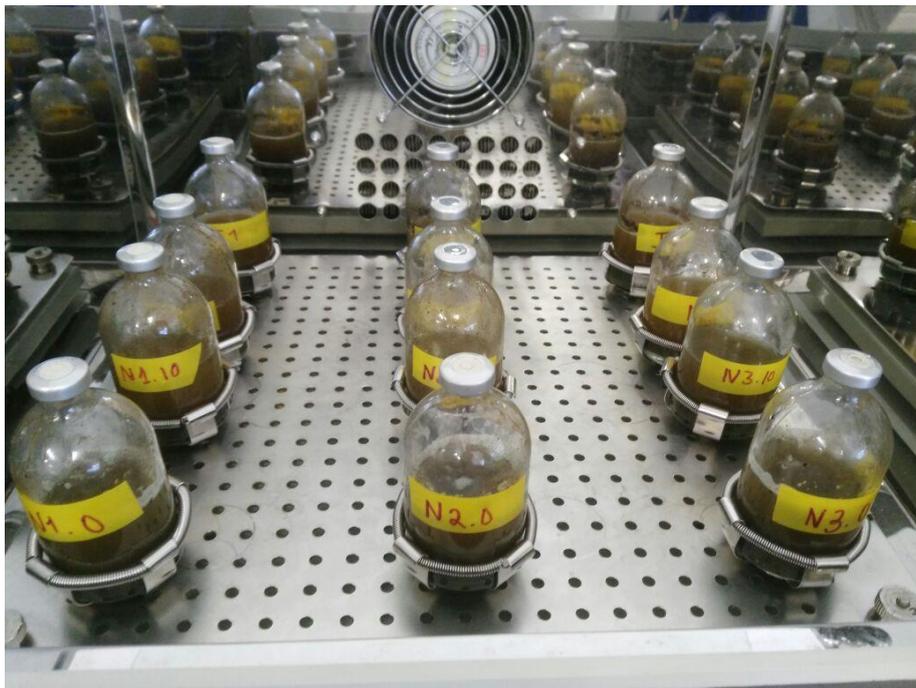


Figura 2.3. Reactores BMP con CAG en incubadora

2.6.1 Identificación molecular de comunidades de bacterias y arqueas en ensayo BMP con CAG

2.6.1.1 Extracción ADN y análisis de las comunidades microbianas

Una vez terminado el ensayo BMP, en condiciones de anaerobiosis se extrajo el lodo y el CAG de todos los reactores y se conservaron a -80°C [150]. El ADN metagenómico fue extraído de cinco muestras. La nomenclatura empleada para la identificación de las muestras fue la siguiente:

- L para el lodo del reactor N.
- L0 para el lodo del reactor N0.
- L10 para el lodo del reactor N10.
- C0 para la biopelícula formada en el CAG del reactor N0.
- C10 para la biopelícula formada en el CAG del reactor N10.

Se realizaron tres extracciones de cada muestra, las cuales se mezclaron antes de llevar a cabo la secuenciación. La extracción de ADN se realizó con el kit ZymoBIOMICSTM (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo el protocolo del productor. La pastilla de ADN fue resuspendida en 50 µL de buffer TE (10mM Tris-HCl (pH 8) y 1mM EDTA (pH 8)). La concentración y pureza de ADN fue determinada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Seattle, WA, USA). La relación A260/280 fue siempre superior a 1.6 en todas las muestras, y la concentración de ADN entre 50-100 ng/L. Los iniciadores empleados para la amplificación de la región génica 16S ADNr (bacteria y arquea) fue el 341F y el 805R. El ADN fue enviado a Macrogen Inc. (Seúl, Korea) quien realizó la secuenciación empleando la plataforma Illumina Miseq. MG RAST fue el software empleado para el análisis de las comunidades de bacterias y arqueas a través de las bases de datos GREENGENES y RDP II [166].

2.6.1.2 Microscopía electrónica de barrido

Se realizó microscopía electrónica de barrido para la observación de las comunidades microbianas adjuntas al CAG con el equipo SEM modelo JSM-6360LV, JEOL. Previamente se fijaron las bacterias y arqueas a la superficie del CAG con una solución de glutaraldehído al 2.5 % en buffer de fosfatos, se dejaron durante 24 horas antes de comenzar a lavar la muestra. Se realizaron 6 lavados con buffer de fosfatos y se incubaron entre lavado y lavado durante 30 minutos en vacío a 4 °C. Se deshidrataron las muestras con etanol al 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %, al igual que con los lavados de fosfatos se incubaron las muestras a 4 °C y en vacío. Se realizó

un secado crítico de las muestras 1,060 mbar y 33 °C. Antes de la visualización de las muestras en el microscopio electrónico se aplicó una capa de oro micrométrica durante 45 segundos.

2.7 Reactores empleados

La digestión anaerobia se realizó en dos etapas, una primera etapa hidrolítica-acidogénica empleando un APBR con y sin microaireación y una segunda etapa acetogénica-metanogénica en un UASB con y sin CAG.

2.7.1 Hidrólisis en APBR con y sin microaireación

La nomenclatura asignada para los APBR hidrolíticos con y sin microaireación fue la siguiente:

- RC para el APBR sin microaireación.
- RM para el APBR con microaireación.

Los reactores empleados (RC y RM) fueron de acrílico, cilíndricos y con un volumen total de 6.18 L, una altura de 21.6 cm y un diámetro de 19.1 cm (figura 2.4). El volumen de trabajo de ambos fue 4.1 L. Como material para el empacado se utilizaron anillos de PVC con un diámetro de 7.5 cm. Se colocó un plato de acrílico a 4.8 cm de altura con agujeros unido a una malla de acero inoxidable 18x18 calibre 26 para que sirva de soporte al material de empacado y para permitir la distribución y retención de sólidos. Para la aspersion sobre el material empacado se colocó un rociador de bruma de una sola cabeza con caudal ajustable. Se introdujo un sensor de potencial de oxidación-reducción Hach Lange modelo MTC101 por la parte superior RC y RM. La temperatura en ambos reactores fue controlada mediante un baño termostático LAUDA ALPHA RA 8. RC y RM fueron encamisados con fibra de poliéster y polietileno espumado para evitar la pérdida de calor.

Para la inyección de aire en RM, se introdujo un tubo de plástico en forma de espiral con agujeros desde la parte superior hasta el plato de acrílico. El tubo se conectó a un flujómetro Hydra de acrílico con material de flota SS 304, material de guía SS 304 y rango de flujo 0 a 3 L/min. Para controlar el volumen de aire inyectado en RM, se empleó una bomba de aire Resun AC-9602 con un flujo máximo de aire de 3.5 L/min, la cual estaba conectada al flujómetro mediante un tubo de plástico. La bomba se conectó a un temporizador para regular la periodicidad de la microaireación.

Se realizaron pruebas de estanqueidad en RC y RM para comprobar que los reactores no tuvieran ningún tipo de fuga antes de empezar la experimentación. Los reactores se llenaron de agua durante 3 días para comprobar que no tuvieran fugas de líquido y se inyectó aire con una bomba para comprobar que no hubiera fugas de gas en la parte superior del reactor.

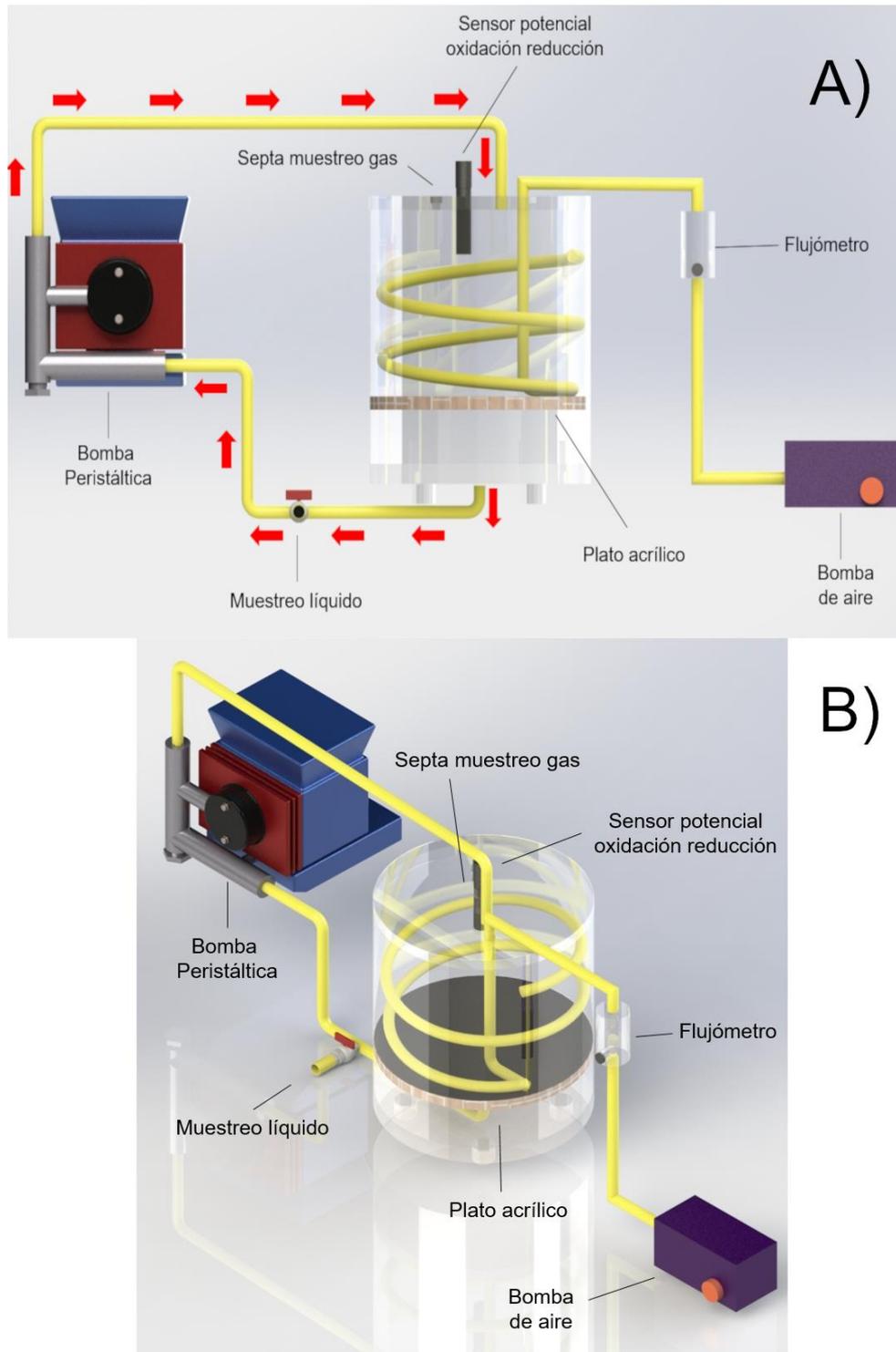


Figura 2.4. A) APBR vista frontal. B) APBR vista lateral

Tanto en RC como en RM se introdujeron al inicio de la experimentación 3.6 L de nejayote y 0.5 L de inóculo. El ensayo se realizó por cuadruplicado para cada tratamiento. RC y RM trabajaron a 34 ± 1 °C de temperatura como se recomienda en la literatura para tener un buen rendimiento en la etapa hidrolítica sin un exceso de gasto energético [167]. EL volumen de aire inyectado en RM fue 274 L aire /(kg ST-día), acorde a la literatura [13]. Se introdujo aire cada 2 horas y 40 minutos durante un tiempo entre 6 y 9 minutos dependiendo de la cantidad de sólidos totales presentes en el nejayote a tratar. Los parámetros monitoreados y su frecuencia se observan en la tabla 2.2. La experimentación se realizó durante cuatro días, tiempo en el que se alcanzó la máxima concentración de AGV en la fase líquida y la mayor concentración de hidrógeno en la fase gaseosa tanto en RC como en RM. El descenso de estos parámetros es el indicador del fin de la etapa hidrolítica.

Tabla 2.2. Parámetros analizados y métodos empleados en RC y RM

Fase	Análisis	Frecuencia	Método
Líquida	pH	Diaria	Método Hach sension 156/54650-18
	AGV	Diaria	Cromatografía de gases
	Potencial oxidación reducción	Diaria	Hach Lange modelo MTC101
	Temperatura	Diaria	
Gas	Caracterización del biogás	Diaria	Cromatografía de gases

2.7.2 UASB

La nomenclatura asignada para los UASB con y sin CAG añadido fue la siguiente:

- UASB control para el UASB sin CAG añadido.
- UASB DIET para el UASB con CAG añadido.

Los 2 reactores UASB (UASB control y UASB DIET) fueron construidos en PVC con un volumen de trabajo de 6.2 L, una altura de 72.5 cm y un diámetro de 10.14 cm en el cilindro central, manteniéndose una buena relación altura diámetro como se indica en la literatura [87]. Ambos reactores presentan dos reductores para favorecer la sedimentación y granulación del inóculo. Al UASB DIET, se le introdujeron 40 g/L de CAG como soporte conductor como indica la literatura [151]. El CAG se introdujo en una bolsa de tela de malla de acero inoxidable 316 calibre 400x400 con un volumen de 487 cm³ para evitar que el CAG pueda llegar a la bomba peristáltica. En el interior del UASB DIET se colocó una base para asentar la bolsa de tela de malla de acero con el CAG.

Para controlar la temperatura de los reactores se empleó un baño termostático LAUDA ALPHA RA 8. Los reactores fueron encamisados con una fibra poliéster y polietileno espumado para evitar la pérdida de calor. Previamente al arranque de los UASB se realizaron pruebas de estanqueidad. Para ello se llenaron de agua durante 3 días y así comprobar que no hubiera ninguna fuga de líquido. A continuación, se introdujo aire en el reactor para comprobar que no hubiera ninguna fuga de gas por la parte superior del reactor.

2.7.2.1 Arranque del UASB control y UASB DIET

Las condiciones de temperatura y pH durante la puesta en marcha del reactor UASB fueron 37°C y pH entre 6.3-7.8 con base a la literatura [88,168,169]. Se monitoreo la alcalinidad y la relación AGV/alcalinidad como recomienda López y colaboradores [95]. La velocidad ascensional no fue superior a 1 m/h [88,98]. Se inició la recirculación del inóculo con agua residual sintética en proporciones 50/50. El porcentaje de SV del inóculo fue 0.97%, lo que resulta en una biomasa inicial de 4.77 kg SSV/m³. Posteriormente se fueron alimentando los reactores con agua residual sintética a velocidades de carga orgánica de 1 a 5.5 kg DQO/(m³·d) [97]. La carga másica inicial fue 0.21 kg DQO/(kg SSV/día).

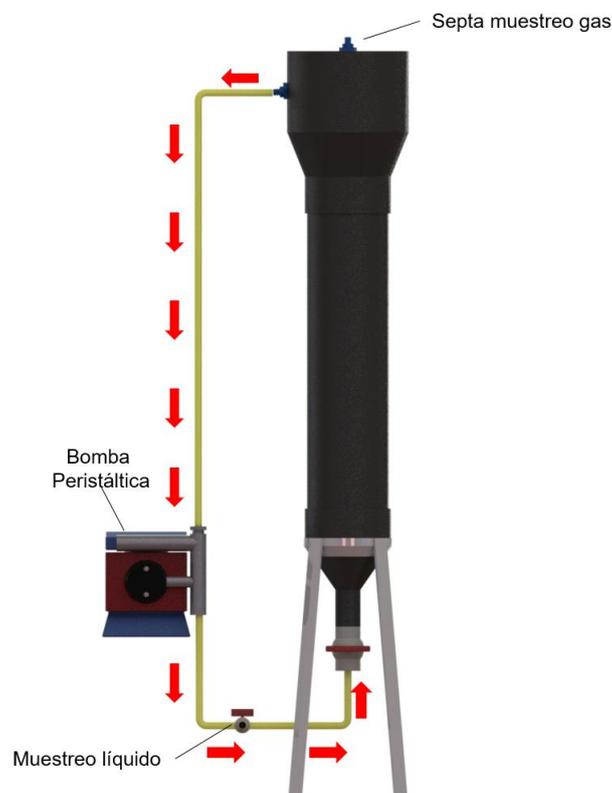


Figura 2.5. UASB

La composición del agua residual sintética inicial fue 15 g azúcar, 1 g Na₂CO₃, 1 g NaHCO₃, 0.2 g KH₂PO₄, 1 g ácido acético glacial, 1 g NH₄Cl en 3100 ml de agua del grifo [170]. Se considera que se ha alcanzado la estabilidad en el reactor cuando se alcancen los valores establecidos por Alzate y colaboradores [171], concentración de AGV menor a 1.5 g/L, eliminación de DQO superior al 50 % y contenido en metano del biogás por encima del 50 %. Este procedimiento de aclimatación se realizó tanto en el UASB control como en el UASB DIET.

En la tabla 2.3 se muestra la los parámetros analizados y la frecuencia de los análisis en los reactores UASB control y UASB DIET durante la fase de arranque.

Tabla 2.3. Parámetros a analizar y métodos empleados en UASB control y UASB DIET

Fase	Análisis	Frecuencia	Método
	pH	Cada 2 días	Método Hach sension 156/54650-18
	Temperatura	Diario	
	DQO	Cada 4 días	Colorímetro Hach DRB-890/8000
Líquida	AGV	Cada 2 días	Cromatografía de gases
	NT	Semanal	Colorímetro Hach DRB-890/10072
	PO ₄ ³⁻	Semanal	Colorímetro Hach DRB-890/8151
	Alcalinidad	Cada 2 días	[164]
Gas	Flujo biogás	Cada 2 días	Gasómetro
	Caracterización del biogás	Cada 2 días	Cromatografía de gases

2.7.3 Acoplamiento de APBR con microaireación con UASB control y UASB DIET

En base a los resultados mostrados en el epígrafe 3.6 se empleó en el acoplamiento reactores APBR con microaireación. La nomenclatura para definir los reactores empleados en la digestión anaerobia en dos etapas es la siguiente:

- APBR control es el APBR con microaireación conectado al UASB control.
- APBR DIET es el APBR con microaireación conectado al UASB DIET.
- UASB control es el UASB sin CAG conectado al APBR control.
- UASB DIET es el UASB con CAG conectado al APBR DIET.

Cuando se haga referencia al proceso global del conjunto de dos reactores, se denominarán de la siguiente manera:

- Proceso control es la unión de APBR control+UASB control.
- Proceso DIET es la unión de APBR DIET+UASB DIET.

La conexión de los reactores APBR con los reactores UASB se realizó a las 24 horas de iniciar la hidrólisis del nejayote en el APBR cuando se alcanzó la concentración máxima de AGV en los resultados presentados en el epígrafe 3.6. La velocidad de carga orgánica empleada en la experimentación fue 4.2 kg DQO/(m³·día) acorde a los resultados obtenidos en el epígrafe 3.7.

Se realizó el monitoreo de diferentes parámetros para los reactores APBR y UASB. En la tabla 2.4 se pueden observar los parámetros y la frecuencia.

Tabla 2.4. Parámetros analizados, frecuencia y métodos empleados en los reactores APBR y UASB acoplados

Fase	Análisis	Frecuencia	Método	Reactor
	pH	Diaria	Método Hach sension 156/54650-18	APBR y UASB
	Temperatura	Diaria		APBR y UASB
Líquida	DQO	Diaria	Colorímetro Hach DRB- 890/8000	APBR y UASB
	AGV	Diaria	Cromatografía de gases	APBR y UASB
	Flujo de biogás	Diaria	Gasómetro	UASB
Gas	Caracterización biogás	Diaria	Cromatografía de gases	UASB y APBR

2.7.3.1 Identificación molecular de comunidades bacterianas en los reactores UASB control y UASB DIET acoplados

2.7.3.1.1 Extracción ADN y análisis de las comunidades microbianas

Al finalizar el ensayo de digestión anaerobia en dos etapas se realizó extracción de ADN de diferentes muestras. La nomenclatura utilizada para identificar las muestras fue la siguiente:

- L UASB control para el lodo del UASB control.
- L UASB DIET para el lodo del UASB DIET.
- B acero para la biopelícula formada en la bolsa de tela de malla acero.
- B CAG para la biopelícula formada en el CAG.

De cada muestra se realizaron tres extracciones para garantizar la representatividad del análisis. Las extracciones se realizaron mediante la metodología anteriormente descrita en el epígrafe 2.7.1. El ADN fue enviado para su secuenciación a RTL genomics (Texas, Estados Unidos), esta fue realizada empleando la plataforma Illumina Miseq. El software

empleado para el análisis de los datos obtenidos fue Galaxy y la base de datos consultada fue del centro nacional de información biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). Se realizó un análisis de componentes principales con el software NTSYS [172].

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización fisicoquímica del nejayote e inóculo

En la tabla 3.1 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica del nejayote, comparados con los resultados obtenidos en otros estudios. Al tratarse de un agua residual que puede provenir de un proceso industrial o bien de un proceso más artesanal, los cuáles no se realizan siempre del mismo modo, el nejayote presenta una elevada heterogeneidad en los resultados de su composición, como se ve en la gran mayoría de los parámetros. En el estudio de Ibarra-Mendivil y colaboradores [173] se emplearon diferentes concentraciones de cal de 0 %, 0.5 % y 1 % para la nixtamalización y se obtuvieron valores de pH de 4.75, 7.72 y 11.01 respectivamente. Pequeñas modificaciones en proporciones de cal, tiempos de cocción y reposo, diferentes variedades de maíz pueden dar lugar a variaciones notables en la composición del nejayote.

Tabla 3.1. Composición fisicoquímica del nejayote

Parámetro	Resultados este estudio	Resultados otros estudios	Referencia
pH	9.2±0.1	6.3-12	[1,4,5,26,27,174,175]
DQO (mg/L)	15,433±826	3,430-40,058	[4,26,27,174,175]
N-NH ₃ (mg/L)	4.65±0.05	2	[27]
NT (mg/L)	95.33±3.7	209-440	[26,27,32,175]
SO ₄ (mg/L)	22.5±2.5	13-229	[27,175]
PO ₄ (mg/L)	58.75±1.25	6.4-1,321	[26,27,32,175]
Alcalinidad (mgCaCO ₃ /L)	1,799±116	1,020-5,768	[4,32,175,176]
SST (mg/L)	2,676±512	1,810-8,340	[1,4,176]
ST%	1.22±0.005	0.34-3	[4,27,32,174]
SV%	0.84±0.005	0.24-1.55	[27,174]

El pH del nejayote medido en la industria harinera fue de 9.2±0.1, pero una vez transportado y almacenado en recipientes de 20 L, el pH se acidificó a valores de 5.83. En la caracterización del nejayote de Rosentrater y colaboradores [5] el valor de pH fue 6.3, las razones que dan para este valor bajo de pH son una posible pérdida de la cal durante el proceso de lavado y la actividad microbiana, lo cual concuerda con el valor

de alcalinidad $1,799 \pm 116$ mg CaCO_3/L reportado en este estudio, comparado con los valores reportados en otros estudios entre 1,020 y 5,768 mg CaCO_3/L [4,32,175,176]. López y colaboradores [95] demuestran en su estudio que la alcalinidad aporta estabilidad en el proceso de digestión anaerobia al neutralizar los ácidos que se forman. Debido a la continua producción de AGV en un proceso de digestión anaerobia es necesaria la presencia de alcalinidad en el reactor para mantener el pH en valores adecuados para el desarrollo correcto del proceso de digestión anaerobia [177]. Souza y colaboradores [178] reportaron que una relación alcalinidad/DQO inferior a 0.5 produce un descenso del pH a valores inferiores a 6.5, produciéndose la inhibición de la metanogénesis en el reactor anaerobio.

El valor de DQO de este estudio fue $15,433 \pm 826$ mg/L, el cual está dentro de los valores observados en los diferentes estudios [1,4,5,26,27,174]. La DQO proviene fundamentalmente del tejido de pericarpio del maíz desprendido en el proceso de nixtamalización [179]. El contenido en nitrógeno total (NT) fue 95.3 ± 3.7 mg/L menor que en la composición analizada en otros estudios [26,27], los valores bajos de NT se explican por el bajo contenido en proteínas en el nejayote [1,5]. Concentraciones de NT entre 1,700 y 14,000 mg/L causan una reducción del 50 % de la producción de metano [180]. Además, valores superiores de NT a 1,000 mg/L dan lugar a un mal desarrollo de los gránulos en reactores UASB [181]. Por otro lado, el nitrógeno total es un nutriente necesario para el buen rendimiento de un reactor anaerobio, concentraciones inferiores a 300 mg/L reducen el crecimiento de las bacterias [181]. La concentración de NT del nejayote empleado fue 95.33 ± 3.7 mg/L pudiendo tener efectos negativos en el desarrollo de la comunidad bacteriana.

El contenido en sulfatos puede dar lugar a la competencia entre arqueas metanogénicas y bacterias sulfatorreductoras. Una relación DQO/SO_4 de 0.67 favorece la sulfatorreducción e inhibe completamente la metanogénesis [182]. Cuando la relación DQO/SO_4 es 2 las bacterias sulfatorreductoras y arqueas metanogénicas aceptan la mitad de los electrones cada una. En cambio, cuando la relación DQO/SO_4 alcanza un valor de 10 la metanogénesis se ve favorecida aceptando las arqueas metanogénicas el 94% de los electrones [137]. La relación DQO/SO_4 en este estudio fue 686, por lo que la presencia de sulfatorreductoras y posibles efectos de inhibición en el proceso de digestión anaerobia debido a los subproductos generados por las mismas fueron inexistentes. Li y colaboradores [138] realizaron un estudio con una relación DQO/SO_4 1.2, reportaron que la cinética en el transporte de electrones entre bacterias exoelectrogénicas y metanogénicas en un reactor DIET, empleando como soporte conductor acero inoxidable, es 10^8 veces superior a la transferencia de electrones entre especies a través de hidrógeno en las sulfatorreductoras. La presencia de un material

conductor da ventaja cinética a la relación sintrófica entre bacterias exoelectrogénicas y arqueas metanogénicas frente a las bacterias sulfatorreductoras en su competencia por los electrones, prevaleciendo la metanogénesis a través de DIET sobre la sulfatorreducción [138].

Los porcentajes tanto en SV y ST se encuentran dentro de lo referenciado en la tabla 3.1., con valores de 0.84 ± 0.005 % SV y 1.22 ± 0.005 % ST. El contenido en SV describe el contenido de materia orgánica presente en el residuo [52]. Por lo tanto, valores bajos en el porcentaje de SV, dan lugar a menores volúmenes en la producción de metano por volumen de nejayote empleado. La relación SV/ST representa la parte aprovechable de los ST por las bacterias para la generación de metano. Un valor lo más cercano a 1 en la relación SV/ST, es deseable para la producción de metano [183].

Tabla 3.2 Características inóculo.

Parámetro	Resultado
Alcalinidad mgCaCO ₃ /L	1,652±147
ST%	4.62±0.1
SF%	2.1±0.1
SV%	2.52±0.1
SV/ST	0.55±0.1

En la tabla 3.2 se pueden observar los parámetros del inóculo. El inóculo presenta una alcalinidad de $1,652 \pm 147$ mg CaCO₃/L, este aporte de alcalinidad al medio amortiguará procesos de acidificación que se producen durante la digestión anaerobia debido a la formación de AGV [184]. El aporte de alcalinidad del inóculo reduce el valor en la relación AGV/alcalinidad, recomendándose valores inferiores a 0.5 para el buen desempeño del proceso de digestión anaerobia [95]. El porcentaje en SV del inóculo es 2.52 ± 0.1 , con este porcentaje se alcanzará una concentración entre 10 y 20 kg SSV/m³ en los reactores UASB como propone Lettinga y colaboradores [185].

3.2. Caracterización carbón activado granulado

Los resultados de la caracterización del CAG de coco mostraron una conductividad de $3,689 \pm 145$ μS/cm. Esta conductividad es un poco más elevada que lo reportado por Liu y colaboradores [19] $3,000 \pm 327$ μS/cm para CAG de turbera. En la tabla 3.3 se puede observar como la conductividad de diferentes materiales de carbono es muy variable, el mismo biochar es reportado con conductividades muy bajas de 4.33 μS/cm y elevadas

10,300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Cabe destacar la conductividad presentada por la tela de carbono de 4'350,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a la vez que el pilus de *Geobacter metallirreducens* tiene dos órdenes de magnitud superior a la propia tela de carbono la cual presenta una alta conductividad.

Tabla 3.3 Conductividad de diferentes materiales y pili

Material	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Referencia
CAG	3,689	Estudio
CAG	3,000	[19]
Magnetita	160	[186]
Acero inoxidable	667	[138]
Biochar	4.33	[20]
Nanotubo de carbono	>100	[147]
Biochar	10,300	[187]
Tela de carbono	4'350,000	[152]
Pilus <i>Geobacter sulfurreducens</i>	51,000	[123]
Pilus <i>Geobacter metallirreducens</i>	277'000,000	[128]
Pilus <i>Geobacter uraniirreducens</i>	300	[127]

Sin embargo, a pesar de la baja conductividad del biochar, este ha demostrado ser casi tan efectivo como el CAG en el incremento de la cinética del DIET en cocultivos de *Methanosarcina barkeri* y *Geobacter Metallireducens* [20].

Por otro lado, los materiales conductores tienen un efecto positivo en el lodo en suspensión de los reactores. Li y colaboradores [138] registraron una conductividad de 5.3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para el lodo de un reactor UASB, en cambio el mismo lodo en un reactor UASB con acero inoxidable como material conductor, el valor de conductividad ascendió a 17.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Este mismo efecto en el lodo en suspensión en un reactor UASB fue encontrado en el estudio de Lei y colaboradores [152], la conductividad del lodo en el reactor con material conductor (tela de carbono) fue 9.77 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y en el lodo del reactor UASB sin material conductor fue 5.47 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.3. Ensayo BMP nejayote

3.3.1. Rendimiento de metano diario

La figura 3.1 muestra el rendimiento de metano diario. Se puede observar que el rendimiento de metano fue inferior a 10 L CH₄/ (kg SV·día) durante los 4 primeros días. Este menor rendimiento inicial de metano en los 4 primeros días concuerda con otros ensayos de BMP (tabla 3.5) [165,188,189], en los cuales esta fase de latencia (menor rendimiento de metano) tuvo una duración entre 2 y 4 días para diferentes tipos de sustratos, aguas residuales de industrias alimentarias, diferentes tipos de estiércol de animal, hasta residuos con elevado porcentaje ST (89.9 %) como la cáscara de cacao.

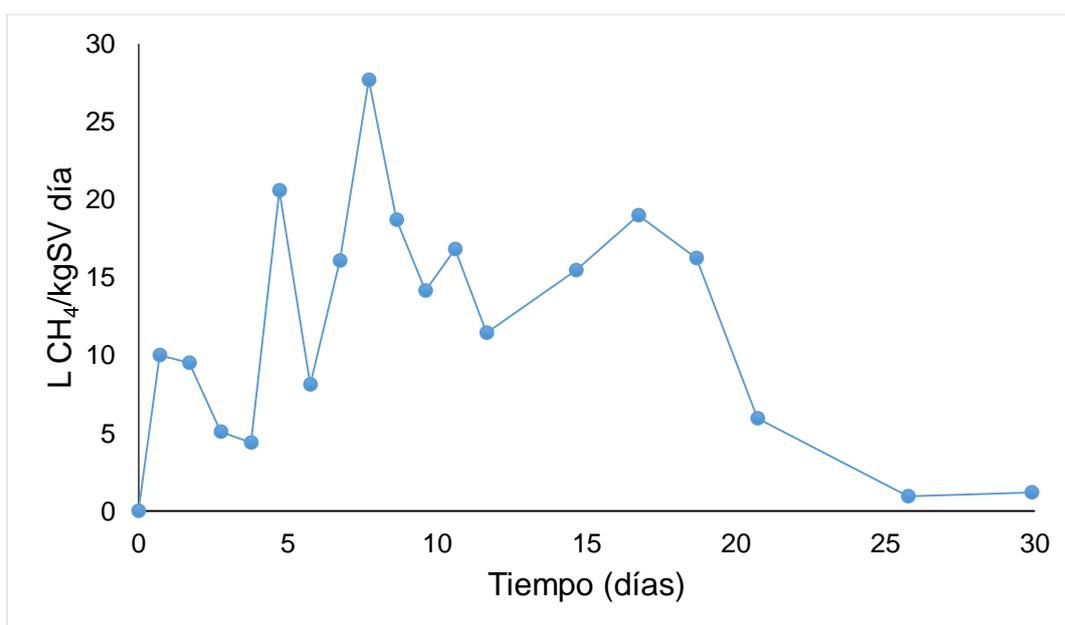


Figura 3.1.BMP Rendimiento de metano diario de nejayote

Aproximadamente el 85 % de metano fue generado entre los días 5 y 18 del ensayo BMP de nejayote. Esto coincide con otros estudios [165,188,190], en los que aproximadamente un 85 % de su producción de metano se genera desde los días 2 a 4 hasta los días 12 y 20. En ese periodo se consume prácticamente toda la materia orgánica accesible a las bacterias. En el presente estudio entre los días 5 y 18 las producciones varían entre 10 y 20 L CH₄/(kg SV·día) exceptuando el día 6 que baja a 8.13 L CH₄/(kg SV·día) y el día 8 que se da el máximo de producción 27.66±9.91 L CH₄/(kg SV·día).

3.3.2. Rendimientos de metano acumulados de nejayote, inóculo y nejayote corregido

En la figura 3.2 se analizan los rendimientos de metano acumulados para el inóculo, el nejayote y el nejayote menos lo producido por el inóculo (nejayote corregido). En la gráfica se constata que la desgasificación durante 7 días redujo el rendimiento de metano del inóculo a 10.85 ± 0.79 L CH₄/kg SV. El rendimiento de metano del inóculo en los reactores con nejayote se estimó en 4.38 ± 0.79 L CH₄/kg SV representando un 0.01 % del total. Esta pequeña influencia del inóculo se constata en la figura 3.2, en la que no se aprecian diferencias entre los rendimientos de metano del nejayote y del nejayote corregido. El rendimiento de metano acumulado en el nejayote fue 318 ± 27 L CH₄/kg SV y en el nejayote corregido 314 ± 27 L CH₄/kg SV. A partir del día 19 la curva presenta un comportamiento asintótico, representando el rendimiento de metano desde el día 19 al 30 de experimentación un 0.07 % del total.

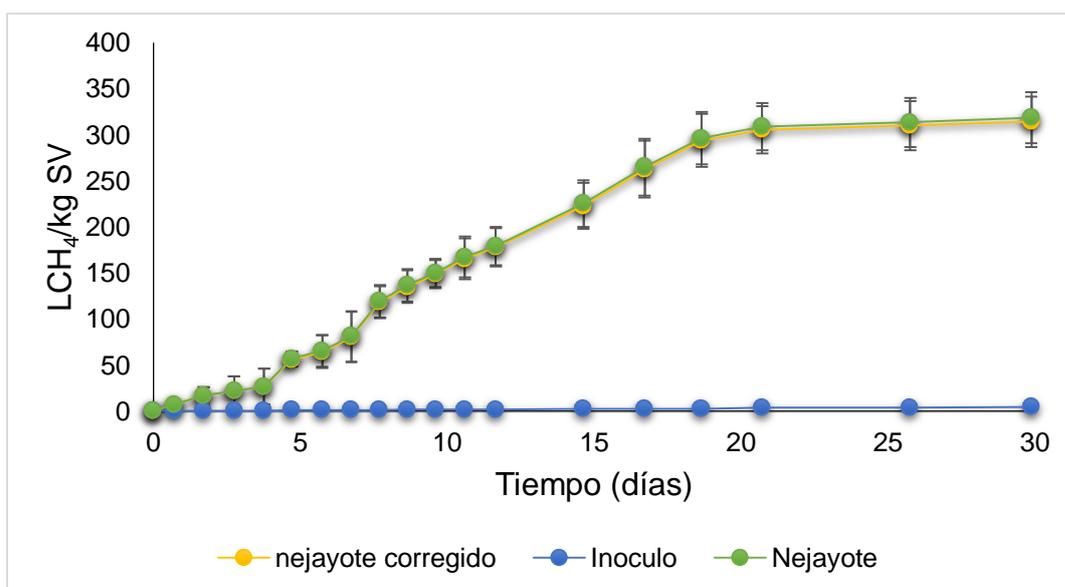


Figura 3.2. Ensayo BMP Rendimiento de metano acumulado

En la tabla 3.4 se compara el resultado obtenido en el ensayo BMP de este estudio con los resultados que se alcanzaron en otros estudios previos. El rendimiento de metano medio de las aguas residuales reportadas en la tabla 3.4 fue 345 ± 90 L CH₄/kg SV [61,188]. El agua residual de la industria de queso alcanzó el valor más elevado con 461 LCH₄/kg SV y el estiércol líquido de cerdo el más bajo con 99 L CH₄/kg SV.

Tabla 3.4 Comparativa de resultados obtenidos en diferentes ensayos BMP

Volumen reactor (L)	Sustrato	Relación SVinóculo/SVsustrato	SV%	Tiempo (días)	Rendimiento (L CH ₄ /kg SV)	Referencia
0.1	Nejayote	2	0.8	30	314	Este estudio
0.5	Estiércol líquido cerdo	2	4.2	30	99	[188]
0.5	Agua residual urbana	2	6.7	30	242	[188]
0.5	Agua residual industria queso	2	7.6	30	461	[188]
0.5	Agua residual celulosa microcristalina	2	7.8	21	332	[61]
0.5	Estiércol vaca	2	10.2	45	204	[189]
0.25	Estiércol de vaca	1.87	11.9	35	262	[165]
0.5	Fango seco	2	14.9	30	46	[63]
0.5	Residuos matadero	2	18.1	30	403	[188]
0.5	Estiércol caballo	2	18.6	45	155	[189]
1	Estiércol pollo	2	19.1	28	359	[183]
0.5	Residuos comida doméstica	2	19.9	30	419	[188]
0.5	Estiércol cerdo	2	26.9	45	323	[189]
1	Residuos pescado	2	27.6	45	435	[191]
0.25	Posos de café	1.5	40	35	338	[165]
0.5	Estiércol pollo	2	47.5	45	259	[189]
0.5	Estiércol cabra	2	64.2	45	159	[189]
0.25	Cáscara cacao	1.85	82.3	35	259	[165]
1	Residuos maíz	2	85.2	28	311	[183]
0.5	Celulosa microcristalina	2	96.1	30	408	[63]

El valor promedio en el rendimiento de metano de los ensayos BMP reportados de la tabla 3.4 [61,63,165,183,188,189,191] fue 289 ± 114 L CH₄/kg SV y el rendimiento de metano para el nejayote fue 314 ± 27 L CH₄/kg SV, siendo superior al promedio.

3.3.3. pH, AGV y alcalinidad

Al finalizar el BMP se midió el pH de todos los reactores, la concentración de AGV y la alcalinidad. La tabla 3.5 muestra un pH final del ensayo BMP de 7.26 ± 0.02 , se encuentra dentro del rango 6.8-7.5 como recomienda la literatura [89,94]. La alcalinidad tanto de los reactores inóculo como de los reactores nejayote aumentó. El CO₂ producido durante la digestión anaerobia reacciona con el agua presente en el reactor para formar ácido carbónico (H₂CO₃), este se transforma en bicarbonato (HCO₃⁻) elevándose así la alcalinidad del medio [95]. La relación AGV/alcalinidad tanto en los reactores inóculo como en los reactores nejayote fue menor a 0.1. En la digestión anaerobia se recomiendan valores inferiores a 0.5, cuando sobrepasa 0.5 se produce la acidificación del medio e inhibición de la metanogénesis [95]. Al finalizar el ensayo la concentración de AGV en los reactores nejayote fue 340 ± 68 mg/L. 1 g/L de DQO produce alrededor de 350 mL de CH₄ [52]. Aplicando la ecuación (6) [49]:

$$V_{CH_4} \text{ (ml)} = 0.34 \text{ g DQO}_{VFA}/L * 0.055 \text{ L (V}_{medio}) * 350 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO} = 6.54 \text{ mL CH}_4$$

Por lo tanto, 6.54 mL CH₄ (2 %) no se generaron y quedaron en forma de AGV

Tabla 3.5. pH, AGV y alcalinidad después del ensayo BMP

Reactores	pH	Alcalinidad (mgCaCO ₃ /L)	AGV (mg/L)	AGV/alcalinidad
Inóculo	8.23 ± 0.02	$10,725 \pm 235$	921 ± 310	0.09
Nejayote	7.26 ± 0.02	$5,491 \pm 77$	340 ± 68	0.06

3.4. Ensayo BMP nejayote con CAG

3.4.1. Rendimiento de metano diario N, N0 y N10

En las figuras 3.3 y 3.4 se pueden observar los efectos en el BMP del CAG y de incubar el inóculo con el CAG previamente. Los picos de rendimiento de metano se produjeron en N, N0 y N10 el tercer día de ensayo con valores de 39, 46 y 45 L CH₄/(kg SV·día) respectivamente. Como muestra la figura 3.3, la primera diferencia significativa entre los

reactores N10 y, los reactores N y N0 se produce en el quinto día del ensayo (t-student $P < 0.05$). El rendimiento de metano en los reactores N10 fue 26 L CH₄/(kg SV·día) mientras los reactores N0 y N produjeron 17 y 10 L CH₄/(kg SV·día) respectivamente. DIET o IHT ocurre en el último paso del proceso de digestión anaerobia, la presencia de CAG promueve el DIET en lugar de IHT en los reactores N0 y N10. Los compuestos que pueden ser oxidados por las bacterias exoelectrogénicas son alcoholes y AGV. Cuando estos compuestos están disponibles se estimula la producción de metano en los reactores N0 y N10 a través del DIET, se pueden observar diferencias significativas (t-student $P < 0.05$) entre los reactores con materiales conductores y los que no presentan materiales conductores. Como muestra la figura 3.3, desde el décimo día hasta el decimoquinto día de experimentación, los rendimientos de metano en N0 y N10 fueron consistentemente superiores a 10 L CH₄/(kg SV·día) mientras el rendimiento de metano de N fue siempre inferior a 10 L CH₄/(kg SV·día). Durante este mismo periodo se llegaron a alcanzar valores de rendimiento de metano mayores a 22 L CH₄/(kg SV·día) tanto en N0 como en N10, por otra parte N nunca obtuvo valores por encima de 10 L CH₄/(kg SV·día).

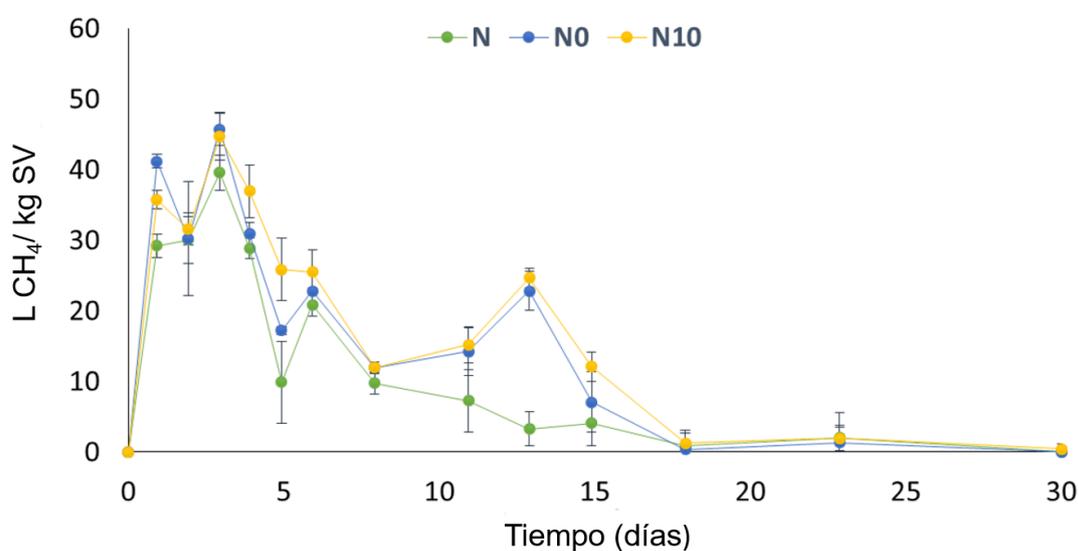


Figura 3.3 Rendimiento de metano diario BMP con CAG

En estudios anteriores [148,149] se ha reportado diferencias en el rendimiento de metano desde el tercer día de experimentación, pero los sustratos que empleaban eran etanol y glucosa, no un sustrato orgánico complejo como el nejayote. DIET afecta en la etapa de la metanogénesis, siendo una vía alternativa al transporte de electrones mediante hidrógeno realizado por las bacterias hidrogenotróficas. Hasta la fecha solo se

conoce que mediante DIET se pueden oxidar algunos alcoholes y AGV [19,117,145] para la reducción de CO_2 a CH_4 . En este estudio el CAG sirve como conductor de electrones para acelerar la conversión sintrófica de alcoholes y AGV a metano. Se requiere un eficiente mecanismo de intercambio de electrones con una producción y consumo de los mismos para descomponer residuos orgánicos complejos [141].

El hecho de que las diferencias en el rendimiento de metano, entre los BMP con material conductor y sin material conductor, sean más tardías en este estudio, es debido a que DIET tiene un efecto más notable cuando las concentraciones de AGV son elevadas produciéndose una degradación más rápida y evitando la acumulación de los mismos [121,150,153]. La mayor velocidad de degradación y por ende menor acumulación de AGV se debe a la diferencia en la velocidad de transporte de electrones entre DIET y el transporte por moléculas de hidrógeno, se ha reportado una ventaja en la cinética en la metanogénesis de 10^8 veces con DIET [138].

3.4.2. Rendimiento de metano acumulado N, N0 y N10

En la figura 3.4 se aprecia claramente diferencias significativas (t-student $P < 0.05$) en los rendimientos acumulados de metano entre N, N0 y N10. Los rendimientos finales de metano para N, N0 y N10 alcanzaron valores de 222 ± 23 L $\text{CH}_4/\text{kg SV}$, 297 ± 10 L $\text{CH}_4/\text{kg SV}$ y 342 ± 29 L $\text{CH}_4/\text{kg SV}$ respectivamente. El rendimiento de metano de N0 fue 34% mayor que la de N, aunque la gran diferencia se produjo entre N y N10, incrementando este último hasta un 54 %.

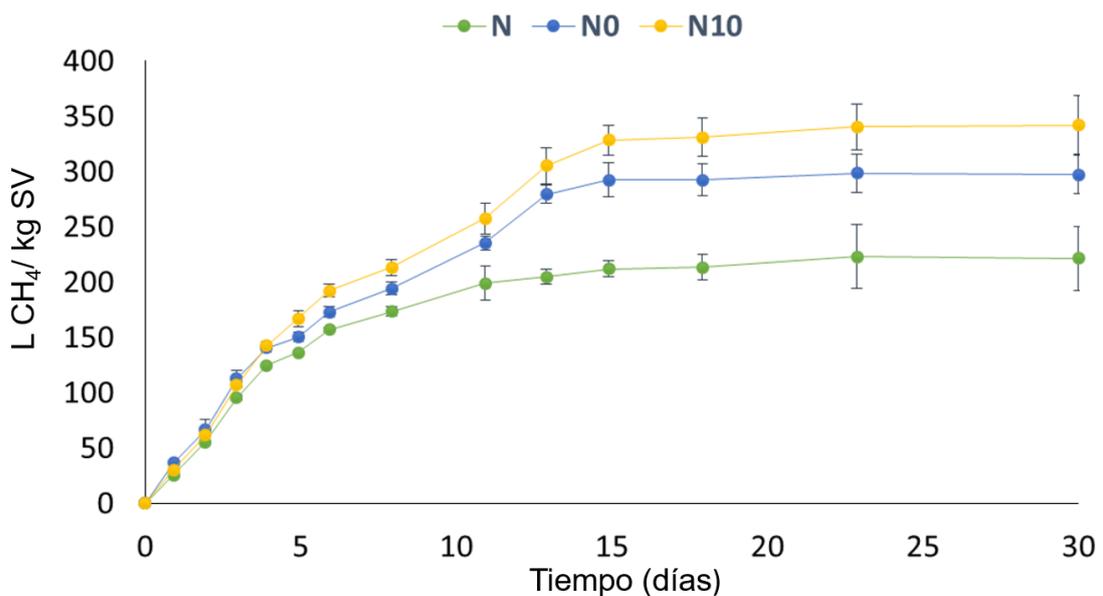


Figura 3.4 Rendimiento de metano acumulado BMP con CAG

Adicionalmente, los resultados muestran que el rendimiento de metano de N10 fue un 15 % superior al de N0, esto es debido a la formación de la biopelícula y desarrollo de microorganismos con capacidad de realizar DIET en el CAG previamente a la adición del nejayote.

3.4.3. Concentración de metano N, N0 y N10

Como ilustra la figura 3.5 la primera diferencia en la composición del biogás aparece el sexto día de experimentación. La concentración de metano registrada fue un 5 % superior para N10 en relación con N0 y N. Esta diferencia se mantuvo constante a lo largo de todo el periodo de experimentación para N10 y N0.

Entre los días 11 y 18 del ensayo la composición del biogás de N0 fue un 5% más rica en metano que N. A su vez, la concentración de metano en el biogás para N10 fue un 10 % más elevada que N. La máxima concentración de metano fue alcanzada al decimoquinto día con valores de 64 %, 71 % y 77 % para N, N0 y N10 respectivamente. Después del decimoctavo día de ensayo no hubo más producción de biogás por lo que la composición del mismo se mantuvo estable.

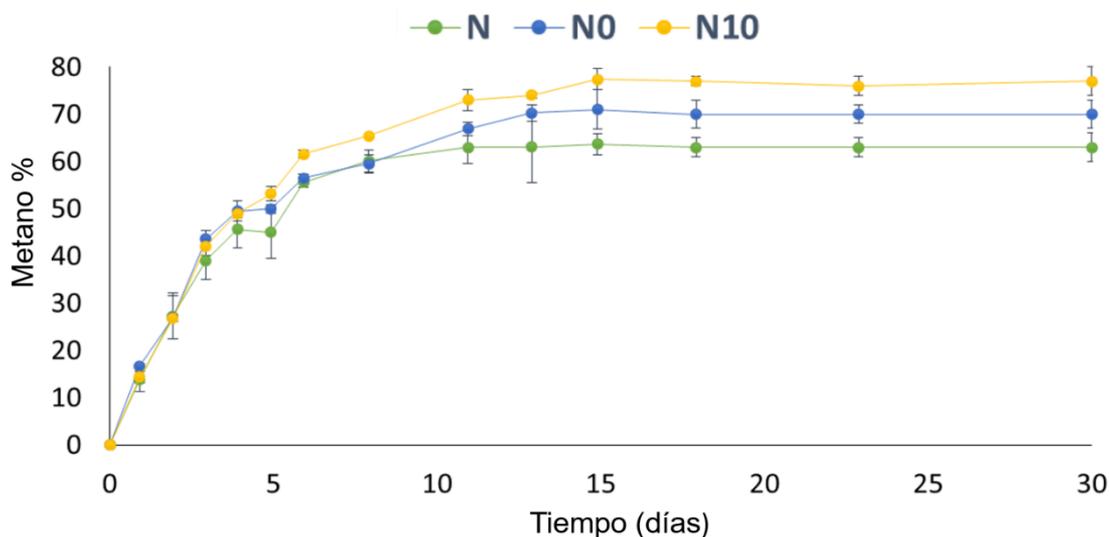


Figura 3.5 Concentración de metano ensayo BMP con CAG

3.4.4. Procesos batch con material conductor

El porcentaje en el incremento del rendimiento de metano producido en este estudio está en concordancia con estudios previos reportados en la tabla 3.6. La introducción de materiales conductores en procesos batch supuso un aumento entre el 17 % y 86 %

en los estudios de la tabla 3.6 El estudio de Dang y colaboradores [153] reporta un incremento del 865 % y 1,685 % debido a la acumulación de AGV y consecuente inhibición de la metanogénesis en los reactores sin material conductor añadido. El aumento registrado en este estudio del 54 %, cuando se desarrolla la biopelícula previamente, y 34 % sin la formación previa de la misma, está dentro del rango de los ensayos BMP en los que no se produce inhibición por acumulación de AGV.

Tabla 3.6. Procesos de digestión anaerobia (batch) con material conductor

Volumen(ml)	Fuente de carbono	Material conductor	Incremento rendimiento metano (%)	Tiempo digestión(días)	Referencia
120	Nejayote	CAG	54	30	Este estudio
250	Etanol	Grafeno	25	12	[148]
500	ARS	CAG	86	43	[144]
120	ARS	Magnetita	32	20	[21]
2,000	Fracción orgánica seca residuos sólidos urbanos	CAG	*1,685	120	[153]
2,000	Fracción orgánica seca residuos sólidos urbanos	Tela carbono	*865	140	[153]
250	Glucosa	Grafeno	51	15	[149]
250	Lodo planta tratamiento	CAG	17	20	[141]

*Inhibición en la metanogénesis.

3.4.5. pH y potencial oxidación reducción

Al finalizar el ensayo BMP el contenido de los diferentes reactores fue analizado para los parámetros pH y el potencial de oxidación reducción. No hubo diferencias significativas en los valores de pH en los tres ensayos, los resultados obtenidos fueron 7.27 ± 0.07 , 7.20 ± 0.03 y 7.27 ± 0.02 para N, N0 y N10 respectivamente. El potencial oxidación-reducción presente en cada uno de los reactores presentó unos valores de -222 mV, -466 mV y -471 mV para N, N0 y N10. Un potencial adecuado para la realización de metanogénesis es por debajo de -200 mV [192]. En el ensayo BMP con CAG todos ellos estuvieron por debajo de este valor por lo que en todos hubo generación de metano. Al añadir CAG se genera una atmósfera más reductora, esto concuerda con el estudio realizado por Salvador y colaboradores [193], el cual introdujo nanotubos de carbono observando cómo estos disminuían el potencial redox del medio. En ese mismo

estudio se evaluó el efecto al aumentar la concentración de nanotubos de carbono de 0.5 g/L a 5 g/L, disminuyendo el potencial redox de -335 mV a -381 mV en un medio abiótico con H_2/CO_2 . La energía (ATP) que puede emplear un microorganismo para un proceso metabólico es directamente proporcional a la diferencia de potencial de energía (ΔE°) entre el dador y aceptor de electrones [194]. Por lo que un ambiente más reductor puede promocionar una mayor donación de electrones, dándose una mayor fuerza termodinámica para un ataque electrofílico con el aumento del proceso reductor de las bacterias metanogénicas favoreciendo la reducción de CO_2 a CH_4 [195]. Esta reportado en la literatura que cuando se aplica un potencial a un reactor metanogénico, se reduce el potencial de oxidación-reducción de valores en torno a -250 mV a valores inferiores a -450 mV incrementándose la degradación de DQO y el rendimiento de metano [195,196]. En este potencial de oxidación reducción se genera una mayor cantidad de hidrógeno el cual puede servir para la reducción de CO_2 a CH_4 [196-198]. En este estudio la disminución del potencial de oxidación reducción no se produce por la aplicación de un potencial eléctrico sino por la presencia del CAG.

Se evidencia que un potencial de oxidación reducción bajo, estimula la relación sintrófica entre las bacterias exoelectrogénicas y las metanogénicas electrotróficas, generando un incremento en los niveles de concentración de metano como se puede observar en la figura 3.5. Un estudio previo observó que un cultivo puro de metanogénicas con materiales de carbono tuvo unos rendimientos superiores en la producción de metano que el mismo cultivo pero sin material de carbono añadido, debido a una disminución del potencial de oxidación-reducción [193]. Esto demuestra que en ausencia de bacterias exoelectrogénicas, con la capacidad para enviar electrones a las arqueas metanogénicas a través de DIET, el rendimiento de metano se incrementa debido a la reducción del potencial de oxidación-reducción. La reducción del potencial de oxidación-reducción a valores menores de -450 mV provoca un incremento en la población de metanogénicas hidrogenotróficas como demostró Hirano y colaboradores [192]. Este cambio poblacional se debe a un menor requerimiento de energía por parte de las metanogénicas para realizar un ataque electrofílico y reducir el dióxido de carbono a metano.

El CAG tiene un doble efecto en la mejora de la metanogénesis, provee de la capacidad para conducir los electrones entre los microorganismos a través del DIET y crea una atmósfera más reductora para una mayor eficiencia en la metanogénesis, favoreciéndose un incremento en el rendimiento de metano.

3.4.6. AGV y DQO

La concentración final de AGV presente en los diferentes reactores N, N0 y N10 fue 293, 139 y 109 mg/L respectivamente. La composición de AGV estuvo formada por 203 mg/L de ácido acético y 90 mg/L de ácido butírico en los reactores N. Sin embargo, en los ensayos N0 y N10 la composición de AGV solo tuvo presencia de ácido acético. La concentración de DQO fue superior en los reactores N que en N0 y N10 presentando valores de 532 ± 10 mg/L, 307 ± 21 mg/L y 218 ± 14 mg/L respectivamente. Este hecho explica parte de la diferencia en la producción de metano acumulada. La concentración total de AGV fue más del doble para los reactores N que en los reactores N0 y N10, lo cual en parte puede explicar la diferencia entre los potenciales de biometanización obtenidos en los ensayos, aunque no es suficiente para la diferencia total mostrada al final del ensayo. Estas diferencias en los rendimientos de metano pueden ser debidas a la presencia de materia orgánica remanente la cual no ha sido aún transformada a AGV en los reactores N.

3.4.7 Identificación molecular de comunidades de bacterias y arqueas

3.4.7.1. Análisis a nivel de filo y género de bacterias

Como se puede apreciar en la figura 3.6, los principales filos en todas las muestras fueron *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*.

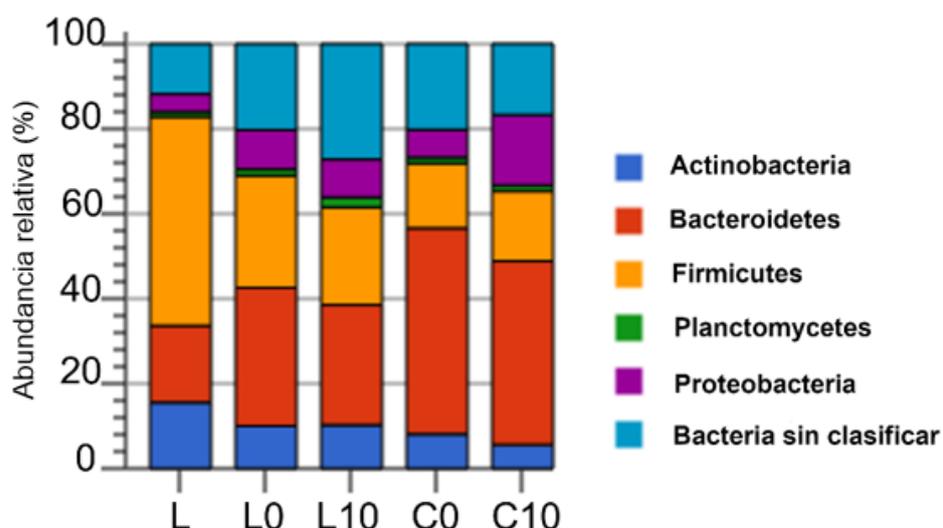


Figura 3.6. Abundancia relativa de los filos de las bacterias. Lodo del reactor control (L), lodo del reactor con CAG (L0), lodo del reactor con biopelícula desarrollada en el CAG antes de realizar el ensayo BMP (L10), biopelícula del CAG del reactor con CAG (C0), y biopelícula CAG del reactor con biopelícula desarrollada en el CAG antes de realizar el ensayo BMP (C10).

Firmicutes fue el filo con mayor abundancia en la muestra L, comprendiendo aproximadamente el 50 % del total de la comunidad bacteriana. La presencia de *Firmicutes* en las muestras de lodo L0 y L10 se redujo a un 26 % y 25 % respectivamente del total de las bacterias. Este porcentaje de *Firmicutes* desciende a valores de 15 % y 16 % en la biopelícula formada en las muestras C0 y C10 respectivamente.

Por el contrario, *Bacteroidetes* sigue una tendencia opuesta a *Firmicutes*. En las biopelículas formadas en el carbón *Bacteroidetes* tuvo la mayor abundancia, alcanzando valores de 48 % en C0 y 43 % en C10. Mientras en la muestra L, *Bacteroidetes* representaba un 18 % de la comunidad bacteriana. Las bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* presentaron diferente abundancia en las distintas muestras. Este filo fue detectado con una representación del 17 % de la comunidad bacteriana en la muestra C10. Sin embargo, *Proteobacteria* en otras muestras nunca a tener una abundancia del 10 % de la población.

La figura 3.7 muestra la clasificación de las bacterias a nivel de género. *Clostridium*, bacteria anaerobia fermentativa fue altamente desarrollada en L, comprendiendo el 46 % de la comunidad bacteriana, mientras que su abundancia en L0 y L10 fue menor al 21 %, y su porcentaje en la biopelícula desarrollada en C0 y C10 fue el 7 % de la comunidad bacteriana.

Parabacteroides fue desarrollada en las biopelículas y lodos de los reactores con CAG con una abundancia relativa del 8 %, 13 %, 12 % y 14 % para L0, L10, C0 y C10 respectivamente; aunque su presencia no fue detectada en L. *Parabacteroides* tiene la capacidad de producir AGV como producto final de fermentación. Estos AGV generados por el proceso de fermentación pueden ser oxidados por bacterias exoelectrogénicas. El género *Parabacteroides* tiene la capacidad de transformar polisacáridos en acetato [199]. En este estudio la principal función de estas bacterias fermentativas, fue convertir la materia orgánica en compuestos más sencillos. Estos compuestos fueron oxidados por las bacterias exoelectrogénicas en el proceso DIET. Nuestra hipótesis es que *Parabacteroides* jugó un papel importante en el DIET, produciendo los AGV requeridos por las bacterias exoelectrogénicas, para degradarlos, y donar los electrones a las metanogénicas electrotróficas, y así estas poder reducir el dióxido de carbono a metano. El crecimiento de *Parabacteroides* ha sido reportado en celdas de combustible microbianas [200], asumiendo el mismo rol que nosotros proponemos en este estudio. Adicionalmente, un enriquecimiento de este género ha sido reportado en otros estudios, tanto de celdas de combustible microbiana [186] como en celdas de electrolisis microbiana [201]. Aunque su presencia no ha sido reportada en estudios relacionados con la estimulación del DIET en digestión anaerobia. Este hecho se debe a que la

mayoría de los estudios emplean aguas residuales sintéticas fácilmente degradables. Una de las dificultades previamente detectadas en el DIET fue la hidrólisis y acidogénesis [151]. Un mal desempeño en estas etapas limita las concentraciones de alcoholes y AGV que son requeridas para tomar la ventaja del DIET, con respecto al transporte de electrones realizado por moléculas de hidrógeno [151]. El crecimiento de *Parabacteroides* en el material conductor agregado a los reactores, facilitó de manera significativa la resolución de este problema, generando la crucial fuente de carbono necesaria para las bacterias exoelectrogénicas.

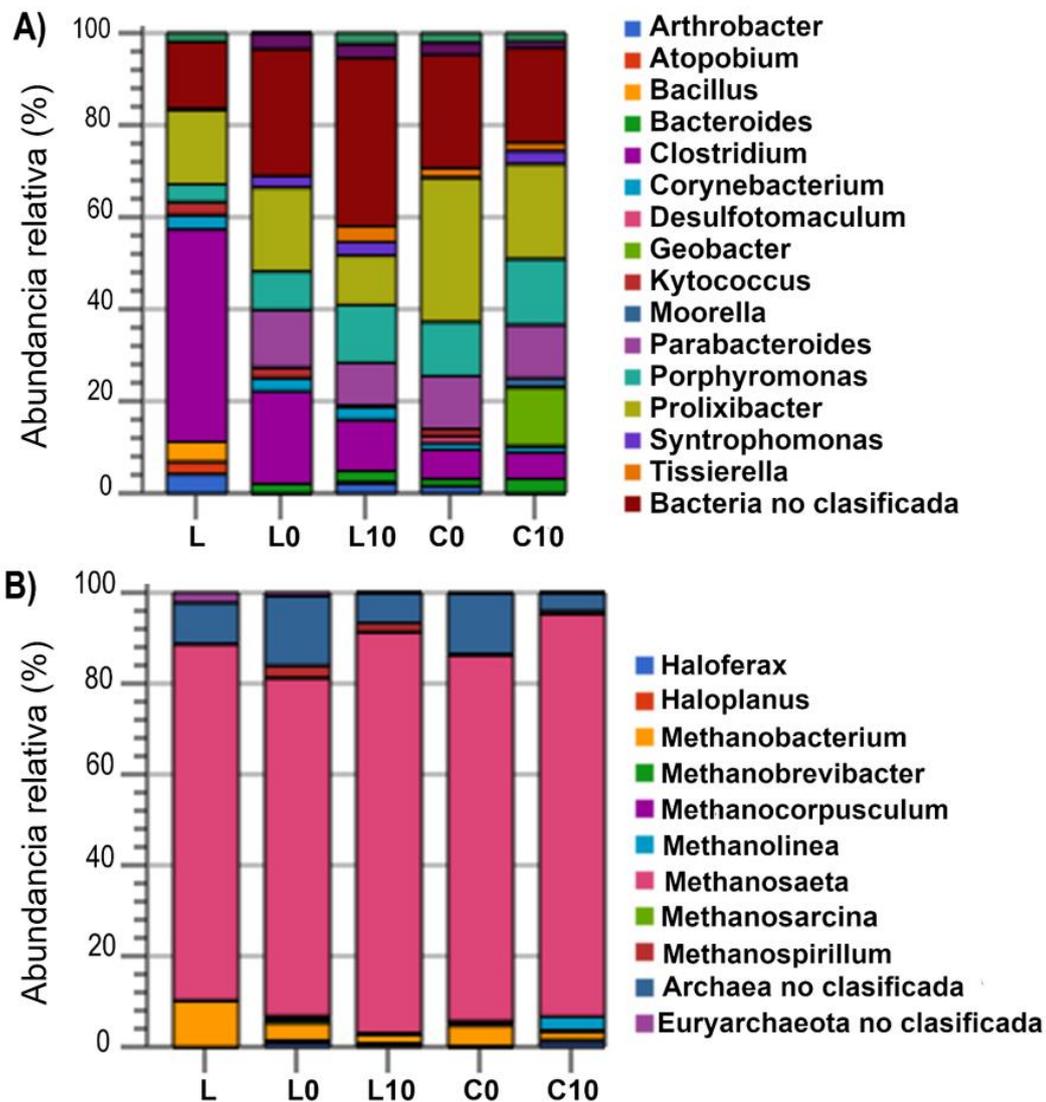


Figura 3.7. Estructura de las comunidades de bacterias (A) y arquea (B) a nivel de género. Lodo del reactor control (L), lodo del reactor con CAG (L0), lodo del reactor con biopelícula desarrollada en el CAG antes de realizar el ensayo BMP (L10), biopelícula del CAG del reactor con CAG (C0), y biopelícula CAG del reactor con biopelícula desarrollada en el CAG antes de realizar el ensayo BMP (C10).

La superficie del CAG fue enriquecida con diferentes bacterias electroactivas; *Geobacter*, *Bacteroides* y *Syntrophomonas*. Todos estos géneros han sido reconocidos como donadores de electrones en DIET [118,152]. *Geobacter* es una bacteria exoelectrónica ampliamente aceptada como participante exoelectrogénico en DIET [122], su presencia solo fue detectada en la muestra C10, donde fue desarrollada la biopelícula 10 días antes de iniciar el ensayo BMP. La cantidad de *Geobacter* en C10, aunque no fue dominante, mantiene un sustancial 14 % del total de la comunidad bacteriana y un 82 % dentro del filo de *Proteobacteria*. Al desarrollar la biopelícula en el CAG, antes de que se introdujera el nejayote en N10, permitió que *Geobacter* creciera en condiciones favorables. La ausencia de *Geobacter* en la muestra C0 puede ser explicada por el hecho de que *Geobacter* no puede degradar eficientemente residuos orgánicos complejos [202]. Además, ha sido reportado que *Geobacter* tiene dificultad en su desarrollo en presencia de residuos complejos y/o bajo condiciones extremas como puede ser alta salinidad [150,152]. El enriquecimiento de *Geobacter* se produjo durante los 10 días previos al inicio del BMP en los reactores N10. Este enriquecimiento no fue posible en los reactores N0 debido al hecho que el nejayote fue añadido al reactor al mismo tiempo que el CAG y otras bacterias exoelectrónicas provenientes del nejayote o del inóculo se adaptaron mejor a las nuevas condiciones ambientales generadas por el nejayote. El género más abundante en la superficie del CAG tanto en la muestra C0 y C10 fue *Prolixibacter*, con una abundancia del 31 % y 21 % respectivamente. *Prolixibacter* tuvo una abundancia relativa del 16 %, 18 % y 11 % en L, L0 y L10 respectivamente. Este género no ha sido reportado antes en ningún estudio relacionado con DIET en digestión anaerobia. La capacidad de *Prolixibacter* para transportar electrones extracelularmente no ha sido concluida aún, pero ha sido reportada como bacteria fermentativa en celdas de combustibles de sedimentos con capacidad para transferir electrones extracelularmente [203]. Además, ha sido reportado su enriquecimiento en celdas de electrolisis microbiana [204]. Un leve enriquecimiento en *Syntrophomonas* y *Bacteroides* fue detectado en el análisis de comunidades microbianas. Ambos géneros mostraron una abundancia relativa del 3 % en C0 y C10 sin embargo no fueron detectados en el lodo del reactor N. Estudios previos han reportado su desarrollo en tela de carbono en reactores anaerobios y su capacidad de transferir electrones extracelularmente a hierro férrico y donar electrones a metanogénicas electrotróficas via DIET [152,205]. No hay evidencia de que *Syntrophomonas* sea capaz de transportar electrones extracelularmente, pero ha sido reportado un notable crecimiento de su población actuando como donador de electrones via DIET en sistemas anaerobios [206]. Tanto *Syntrophomonas* como *Bacteroides* se

encuentran en la literatura como bacterias exoelectrogénicas en procesos de DIET con sustratos complejos [142].

En este estudio, el porcentaje de comunidad electroactiva (*Geobacter*, *Prolixibacter*, *Bacteroides* y *Syntrophomonas*) fue del 41 %, 37 %, 17 %, 22 % y 16 % para C10, C0, L10, L0 y L respectivamente. El enriquecimiento de las bacterias exoelectrogénicas en C10 y C0 con respecto a L fue 25 % y 21 % respectivamente.

El desarrollo de la biopelícula previa en el CAG en N10 tuvo dos efectos positivos; un incremento del 4% de la comunidad electroactiva con respecto a la biopelícula formada en el CAG de N0 y el desarrollo de *Geobacter* en la biopelícula C10.

3.4.7.2 Análisis a nivel género arqueas

La comunidad de arqueas fue dominada por *Methanosaeta* en todos los reactores, adjunta al carbón y los lodos. *Methanosaeta* fue más prevalente en C10 alcanzando un 89 % dentro de las arqueas, mientras en L su porcentaje descendió a un 78 %. *Methanosaeta* ha sido establecida como una de las principales metanogénicas con la capacidad de aceptar electrones en DIET [122]. *Methanolinea* tiene capacidad electrotrófica via DIET [159]. *Methanolinea* solo fue detectada en la biopelícula de C10 con una abundancia relativa menor al 5 % en la comunidad de arqueas.

Solo *Methanosaeta* y *Methanosarcina* son capaces de generar metano a partir de acetato [207]. *Methanosaeta* jugó un rol vital como consumidor de acetato para la producción de metano en N. Aunque en N0 y N10, debido a la presencia de CAG, *Methanosaeta* funcionó como aceptor de electrones reduciendo dióxido de carbono a metano. *Methanobacterium* es una arquea hidrogenotrófica con tendencia a estar suspendida en el lodo del reactor [146]. Por otro lado, *Methanobacterium* ha sido detectada en soportes conductores como aceptor de electrones en DIET [154]. *Methanobacterium* tuvo una abundancia relativa superior al 10 % en L, mientras en L0 y L10 fue detectada con una presencia inferior al 5 %. En este estudio, *Methanobacterium* fue responsable de reducir la presión parcial de hidrógeno en N a través de IHT. *Methanolinea* es una arquea hidrogenotrófica que solo fue detectada en C10 con un porcentaje del 3 % dentro de la comunidad de arqueas. *Methanolinea* y *Methanobacterium* pueden aceptar electrones cuando están adjuntas a un soporte conductor aceptando electrones en procesos DIET [144]. En este estudio, las dos arqueas hidrogenotróficas tuvieron diferentes roles: una (*Methanobacterium*) estuvo suspendida en el lodo y participó en IHT controlando la presión parcial de hidrógeno, mientras *Methanolinea* estaba adjunta a la superficie de CAG aceptando electrones para reducir dióxido de carbono a metano.

3.4.7.3 Mapa de calor para comunidades de bacterias y arqueas

Las similitudes de las estructuras de las comunidades microbianas fueron analizadas a nivel de género en las cinco muestras mediante un mapa de calor agrupado jerárquicamente (figura 3.8).

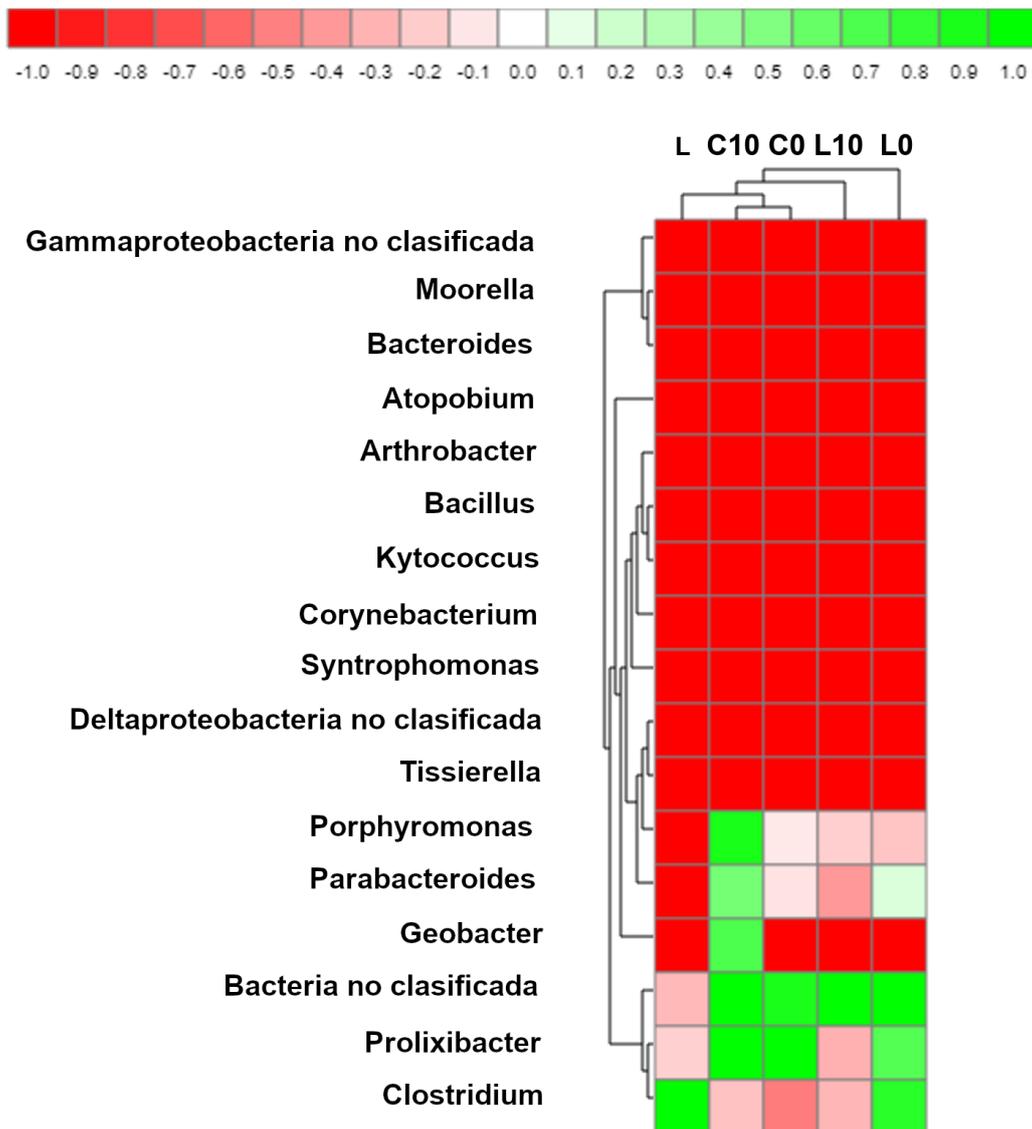


Figura 3.8. Mapa de calor a nivel de género. Lodo del reactor control (L), lodo del reactor con CAG (L0), lodo del reactor con biopelícula desarrollada en el CAG antes de realizar el ensayo BMP (L10), biopelícula del CAG del reactor con CAG (C0), y biopelícula CAG del reactor con biopelícula desarrollada en el CAG antes de realizar el ensayo BMP (C10). La escala del mapa de calor está basada en un código de color (rojo menor abundancia a verde mayor abundancia).

El mapa de calor incluye 17 géneros. C10 es la muestra con mayor número de géneros diferentes. Las comunidades que conforman las biopelículas C0 y C10 presentan la mayor similitud entre todas las muestras, esto se observa en la figura 3.8 al aparecer unidas en el mismo clado. Este análisis, corrobora el desarrollo de comunidades microbianas similares en superficies de materiales conductores en digestores anaerobios. Los materiales conductores promueven el DIET, esto favorece que se genere una comunidad electroactiva con bacterias donadoras de electrones y una comunidad de arqueas con capacidad electrotrófica para aceptar estos electrones. Las comunidades electrogénicas y electrotróficas desarrolladas van a depender de las presentes en el inóculo inicial y del ambiente que se genere dependiendo del sustrato al que se enfrenten.

3.4.7.4 Microscopía electrónica de barrido

A través de la microscopía electrónica de barrido fue posible examinar la superficie y porosidad del carbón libre de comunidades microbianas antes de añadirlo a los reactores figura 3.9.A. En la figura 3.9.B se visualizan con claridad las comunidades microbianas adjuntas al CAG.

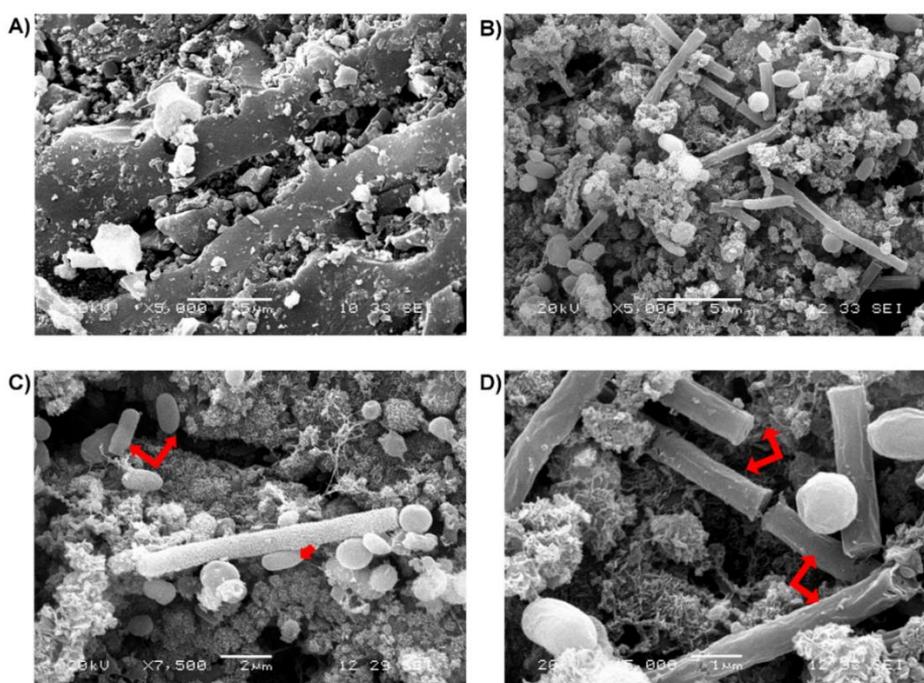


Figura 3.9. Micrografías de la superficie del carbón activado granular (A), biopelícula formada en el carbón activado granular (B), comunidades específicas (*Geobacter*) adheridas al carbón activado granular (C), y comunidades específicas (*Methanosaeta*) desarrolladas en el carbón activado granular (D) después del ensayo BMP.

Geobacter fue identificada en el análisis microbiológico, como bacteria exoelectrogénica adjunta al carbón, presentando una abundancia del 14 % con respecto a la comunidad bacteriana. *Geobacter* ha sido descrita como una bacteria con forma filamentosa y una longitud entre 2-4 μm [208]. En la figura 3.9.C. pueden ser visualizadas bacterias con las mismas características morfológicas que las descritas anteriormente, esto unido al alto porcentaje de *Geobacter* adjunto al CAG hace plausible su identificación en la figura 3.9.C. *Methanosaeta* es una arquea con forma de baston que presenta una longitud media entre 2 y 6 μm por célula individual. Las células están encerradas dentro de una estructura de funda estriada, anular y están separadas por particiones que forman una estructura filamentosa. Los filamentos de *Methanosaeta* pueden alcanzar una longitud de 100 μm [209]. En la figura 3.9.D. se observan las comunidades formadas por *Methanosaeta*. *Methanosaeta* fue la arquea dominante en el análisis de comunidades microbianas haciendo fácil su identificación por microscopía electrónica de barrido. Estas bacterias y arqueas son reconocidas por su capacidad de participar en DIET con y sin material conductor [20,117,118,151].

3.5 Reactores

3.5.1 Hidrólisis en APBR con y sin microaireación

3.5.1.1 AGV y pH

En la figura 3.10 se muestra la evolución de los diferentes AGV en el ensayo para determinar el día de acoplamiento del reactor APBR al UASB y la comparación entre un APBR con microaireación (RM) y un APBR control (RC). La concentración inicial de AGV en el nejayote fue de 9.4 g/L, siendo el 100 % ácido acético. Ha sido reportado la presencia de bacterias fermentativas en el nejayote, estas tienen la capacidad de realizar la hidrólisis si el pH se encuentra entre valores de 5 y 8.5 [210]. Esto unido a las altas temperaturas a la que se encuentra el nejayote, cuando es recolectado, genera una alta concentración de AGV inicial.

El primer día los AGV subieron un 17.53 % y un 31.28 % para RC y RM respectivamente. El análisis por cromatografía muestra que en RC el incremento de los AGV corresponde a ácido butírico en su totalidad, mientras que en RM ascendió la concentración de ácido acético un 21.26 % y el ácido butírico un 78.74 %. En el anexo I se puede observar la evolución de los AGV durante las primeras 24 horas de experimentación. Al segundo día se redujo este crecimiento en los AGV a 13.97 % en RC y un escaso 2.33 % en RM,

alcanzando concentraciones de AGV totales similares 12.59 g/L y 12.63 para RC y RM respectivamente. Ambos reactores continuaron enriqueciéndose en ácido butírico como muestra la figura 3.10 y empobreciendo su concentración de ácido acético.

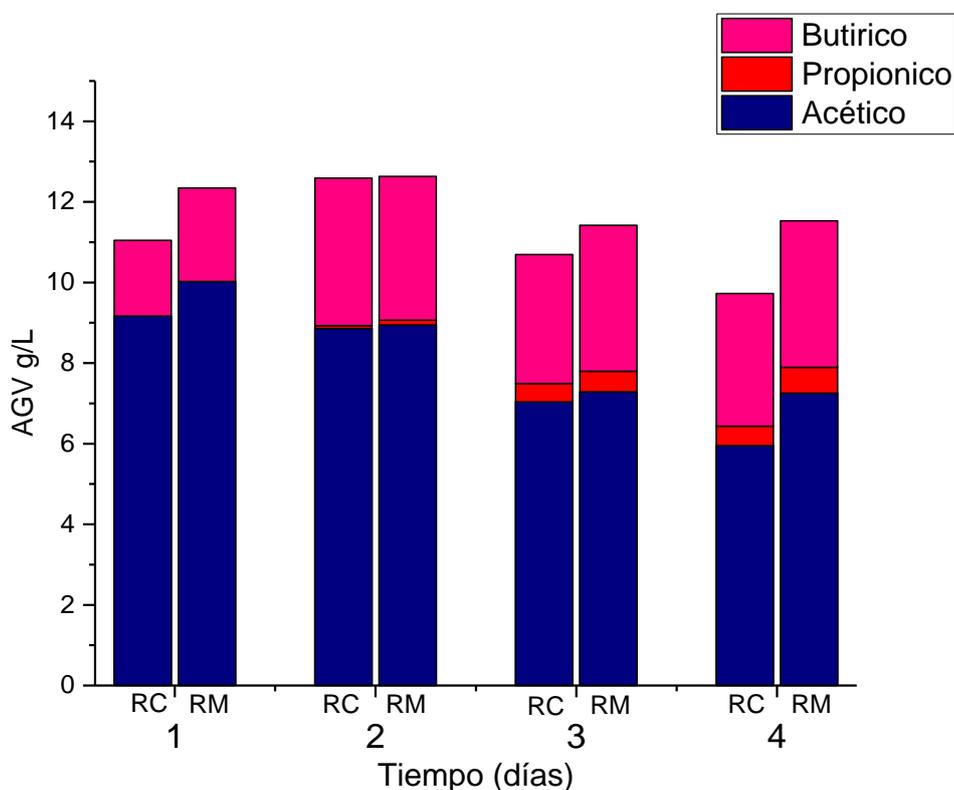


Figura 3.10 Concentración de AGV en APBR sin microaireación (RC) y con microaireación (RM)

Este segundo día también se registra el ácido propiónico en concentraciones inferiores a 0.12 g/L tanto en RC como en RM. A partir del tercer día la concentración de AGV disminuyó en ambos reactores, siendo este descenso más pronunciado en el reactor control. La tendencia en el descenso de la concentración de ácido acético continuó en ambos reactores hasta el final de la experimentación, presentando una proporción del total de los AGV totales de 61.2 % y 62.9 % en RC y RM respectivamente. A su vez, la concentración de ácido butírico incrementó su porcentaje en la concentración total de AGV, llegando a ser superior al 30 % en ambos reactores. En la tabla 3.7 se observa la evolución del pH durante el periodo de experimentación. El pH descendió de 8.1 a 5.7 al primer día, a partir de ese momento se mantuvo en valores constantes entre 5.7 y 6.1 hasta el final del ensayo en ambos reactores. El rango de pH recomendado para realizar un acoplamiento entre un reactor hidrolítico y un reactor metanogénico es entre 5.7 y 6 [211], lo cual no supuso ningún inconveniente para seleccionar el día de acoplamiento.

El valor de pH define el tipo de AGV que se va a formar mayoritariamente. Estudios previos confirman que a pH 6 la producción de AGV es óptima. La actividad enzimática se ve favorecida al realizarse el proceso a pH 6, lo cual beneficia a las enzimas hidrolíticas [212]. En caso de realizarse el proceso a pH 4 o inferior se inhibiría la producción de AGV, al verse afectada la comunidad microbiana. Los AGV no están disociados a pH 4 y estos traspasan la membrana celular, una vez dentro se disocian y fuerzan a la células a expulsar los protones, esto supone un consumo de energía limitando el metabolismo de las mismas y finalmente la inhibición de su crecimiento [213,214]. Los AGV producidos durante la experimentación están formados prácticamente en su totalidad por ácido butírico. Esto concuerda con lo publicado por otros autores [167,215], los cuales destacan la generación de ácido butírico a pH 6 como el principal AGV que se forma entre pH 5.5 y 6. Otro factor que influye en el tipo de ácido graso que se forma es la composición del residuo. Ha sido demostrado que residuos ricos en carbohidratos, como puede ser el caso del nejayote, tienden a fermentar ácido butírico [216].

Tabla 3.7. Parámetros APBR con microaireación (RM) y sin microaireación (RC)

Tiempo (días)	0	1		2		3		4	
Reactor	Inicial	RC	RM	RC	RM	RC	RM	RC	RM
pH	8.1	5.7	5.7	5.8	5.9	5.8	6.2	6.0	6.1
ORP (mV)	48	-557	-562	-560	-496	-375	-325	-291	-275
%H ₂	N/D	67.3	39.4	28.3	1.1	7.7	0	0.7	0
%CH ₄	N/D	0	0	0	0	1.7	0.1	1.8	0.1

La microaireación, en aguas residuales, solo ha sido aplicada para mejorar la remoción de H₂S [217-219] y el arranque del reactor estabilizando el pH [220]. Para incrementar la acidogénesis y la consecuente producción de AGV, solo ha sido aplicada en sustratos sólidos o en codigestión de sustratos sólidos y líquidos [11,39,41,221]. El nejayote puede ser considerado un residuo líquido, pero al analizarlo detalladamente se observa gran cantidad de sólidos provenientes del proceso de nixtamalización [1]. En este proceso,

se desprende el pericarpio de los granos de maíz y pasa a formar parte del nejayote dándole una consistencia entre líquido y sólido al mismo [5].

El grado de solidez del nejayote dependerá de las proporciones de maíz, agua y cal añadidas durante la nixtamalización [1]. Al ser un residuo en su mayor parte líquido, la materia orgánica está más expuesta al ataque de las enzimas hidrolíticas y la consecuente formación de sustratos solubles aprovechables por las bacterias fermentativas para la generación de AGV. Por otro lado, la parte sólida que presenta el nejayote es más difícil de degradar por las enzimas hidrolíticas. Esto permite una mejora en fase hidrolítica si se aumenta la actividad enzimática de las bacterias hidrolíticas. La comunidad de bacterias hidrolíticas y fermentativas se ve incrementada, así como la actividad enzimática de las mismas, en reactores en los que se aplica la microaireación [41,42]. El aumento en la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en RM, y la consecuente mejora en la hidrólisis de carbohidratos, proteínas y otras sustancias orgánicas complejas, se ve reflejado en una mayor concentración de AGV después de las primeras 24 horas de experimentación. Al no ser un residuo totalmente sólido, en el cual la fase hidrolítica supone una gran limitación y necesita de una gran actividad enzimática para llevarla a cabo de manera rápida y eficaz [222], al segundo día de experimentación ambos reactores tienen la misma concentración de AGV.

La presencia de hidrógeno en el biogás es un indicador de que se está realizando la hidrólisis en el reactor. En la tabla 3.7 se presenta el porcentaje de hidrógeno en el biogás de RM (39.4%), es menor que en RC desde el primer día, decreciendo hasta el 1.1% el segundo día. Por otro lado, en RC el día uno de experimentación el porcentaje de hidrógeno es casi un 30% superior que en RM y el día dos el porcentaje se mantiene en un 28.3% en comparación con el 1.1% mencionado anteriormente en RM. Al tercer día no fue detectado hidrógeno en el reactor RM, en cambio, RC tuvo un porcentaje del 7.7%. Al cuarto día el porcentaje fue inferior al 1% en ambos reactores. En ambientes microaerobios, como el generado en el reactor RM, microorganismos facultativos reducen las moléculas de hidrógeno provenientes de la hidrólisis con las moléculas de oxígeno introducidas por la microaireación, generando H_2O_2 , $\cdot OH$ y H_2O [10]. Este fenómeno explica la diferencia en el porcentaje de hidrógeno presente en el biogás entre los dos reactores.

Con base a los resultados obtenidos, se ha decidido realizar el acoplamiento después de un día, empleando microaireación en el reactor empacado. Los resultados muestran que se alcanza la máxima concentración de AGV en la mitad de tiempo cuando se aplica la microaireación.

3.5.1.2 Potencial oxidación reducción

En contra de lo publicado anteriormente en la literatura [13], la adición de aire no provocó un aumento en el potencial de oxidación reducción como se observa en la tabla 3.7 El ambiente reductor generado por la presencia del inóculo anaerobio y la falta de oxígeno en el reactor, produjo un descenso rápido del potencial de oxidación reducción a valores inferiores a -500 mV en ambos reactores. Este descenso está ligado a la alta concentración de hidrógeno en ambos reactores. El potencial de oxidación reducción es la tendencia de un compuesto a adquirir electrones, cuanto mayor sea ésta mayor será el mismo [223]. Cada par redox tiene un potencial de oxidación reducción específico, en el caso de H^+/H es -420 mV [224], mientras el oxígeno/agua +820 mV [223]. Esto significa que los electrones van a tener mayor afinidad por el oxígeno introducido en el reactor y el potencial de oxidación reducción del medio debe incrementarse al ser este potencial específico muy elevado. Por otro lado, una vez reducido todo el oxígeno, los electrones restantes producidos en la hidrólisis y fermentaciones acidogénicas van a continuar oxidando compuestos con menor potencial de oxidación reducción. En los reactores con una gran concentración de hidrógeno estos electrones comenzaran a reducir protones libres lo cual provoca un descenso en el potencial de oxidación reducción del medio alcanzándose los valores presentados anteriormente. Conforme se va consumiendo el hidrógeno, el potencial de oxidación reducción incrementa. Esto es debido a que pares redox con un mayor potencial de oxidación reducción intrínseco adquieren una mayor relevancia. Este aumento se observa a partir del segundo día en ambos reactores, siendo mayor en RM por el oxígeno añadido.

El objetivo de la microaireación en este estudio es incrementar la producción de AGV, lo cual se consigue con la cantidad de aire inyectado. No se considera necesario inyectar un mayor volumen de aire para aumentar el potencial de oxidación reducción del medio como ocurre en otros estudios [13,41]. Adicionalmente, un mayor flujo de aire en los reactores supondría un coste energético elevado y un posible impacto negativo en el balance energético del proceso global.

3.5.2 Arranque UASB

Las velocidades de carga orgánicas empleadas fueron desde 1.1 kg DQO/(m³·día) hasta 5.5 kg DQO/(m³·día) en UASB control y UASB DIET. La biomasa inicial de ambos UASB fue 4.77 kg SSV/m³. En el arranque de un reactor UASB para evitar procesos de inhibición por acidificación del mismo, se aconseja tener una biomasa inicial entre 10 y

20 kg SSV/m³ [185]. La carga másica inicial fue de 0.21 kg DQO/(kg SSV·día) siendo el rango sugerido por Lettinga y colaboradores [185] de 0.05 a 0.1 kg DQO/(kg SSV·día). Al presentar los reactores una biomasa inicial inferior a la mitad recomendada y una carga másica de más del doble de la recomendada, nos va a permitir un análisis más rápido del efecto del CAG en reactores UASB debido al estrés al que están sometidos los mismos desde el comienzo de la experimentación.

3.5.2.1 AGV, alcalinidad y pH

La concentración de AGV, la alcalinidad y el pH fueron monitoreados durante todo el periodo de experimentación como se puede ver en la figura 3.11 La alcalinidad fue aumentando en ambos UASB hasta los días 27 y 33 para el UASB control y UASB DIET respectivamente. A partir del día 34 la velocidad de carga orgánica incrementa de 2.3 a 2.8 kg DQO/(m³·día), manteniéndose el mismo aporte de alcalinidad desde el principio. A partir de este cambio en la velocidad de carga orgánica, la alcalinidad baja de forma continuada hasta valores de 2,150 y 2,400 mg CaCO₃/L para el UASB control y UASB DIET respectivamente. El pH óptimo para un proceso de digestión anaerobia es entre 6.8 y 7.3 [225], siendo este inferior al valor recomendado a partir de los días 62 y 65 para el UASB control y UASB DIET respectivamente. El día 49 de experimentación, con una velocidad de carga orgánica de 4.6 kg DQO/(m³·día), la concentración de AGV ascendió a niveles superiores a 3 g/L en UASB control, manteniéndose en valores inferiores a 0.2 g/L en UASB DIET. La relación AGV/alcalinidad sobrepaso 0.5 en UASB control. Un reactor UASB, en fase temprana de aclimatación, tiene un funcionamiento óptimo y sin riesgo de acidificación cuando se mantienen los AGV por debajo de 1.5 g/L y la relación AGV/alcalinidad inferior a 0.5 [95,171]. Consecuentemente, se disminuyó la velocidad de carga orgánica a 2.3 kg DQO/(m³·día) durante los siguientes 2 días, permitiendo así la recuperación de UASB control, decreciendo la concentración de los AGV a valores inferiores a 0.1 g/L. A continuación, se incrementó la velocidad de carga orgánica a 5.5 kg DQO/(m³·día) durante 4 días, produciéndose un incremento de los AGV en ambos UASB siendo este superior en UASB control (1.2 g/L) que en el reactor UASB DIET (0.8 g/L). Los reactores se volvieron a recuperar al bajar la velocidad de carga orgánica a 2.8 kg DQO/(m³·día) durante 2 días. A partir de ese momento se mantuvo la velocidad de carga orgánica a 5.5 kg DQO/(m³·día), ambos reactores se acidificaron alcanzando concentraciones de AGV de 7.8 y 6.7 g/L y valores de pH de 5.64 y 5.95 para UASB control y UASB DIET respectivamente. Durante el desarrollo de la experimentación se observa que la velocidad de carga orgánica óptima para el reactor UASB DIET fue 4.6

kg DQO/(m³·día), siendo esta exigente para el UASB control al alcanzarse concentraciones superiores a 3 g/L de AGV al quinto día de mantener esta velocidad de carga orgánica.

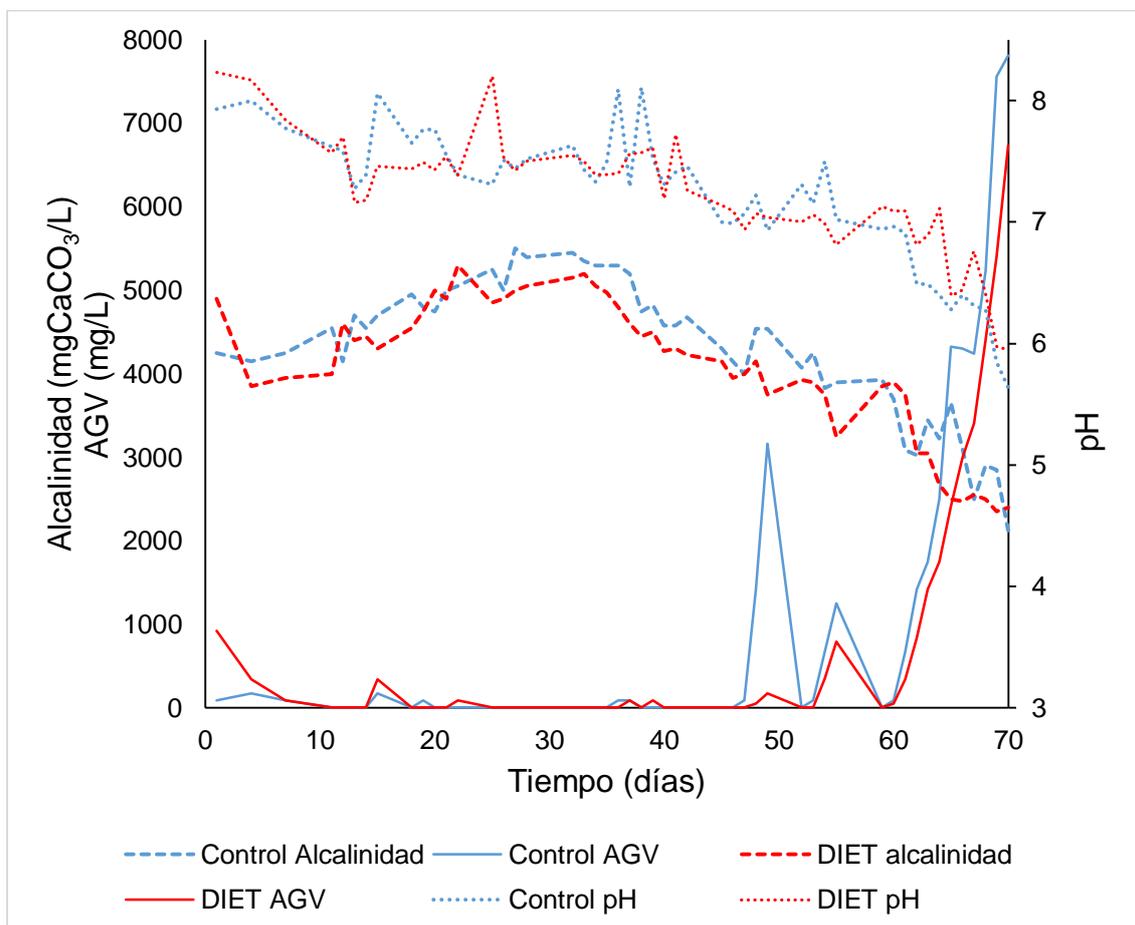


Figura 3.11 pH, alcalinidad, AGV en UASB control y UASB DIET en la fase de arranque.

El incremento de la concentración de AGV en el efluente es una señal de mal funcionamiento en un reactor [139]. El aumento de los AGV en el medio puede provocar una acidificación del mismo, en este medio acidificado gran parte de las arqueas metanogénicas no son viables inhibiéndose consecuentemente la generación de metano [140]. DIET es una relación sintrófica entre microorganismos en la que se produce la oxidación de AGV y la posterior reducción de dióxido de carbono a metano [141,142]. Cuando el transporte de electrones es viable a través de DIET, este reemplaza a IHT como la vía dominante en el IET, dándole al sistema anaerobio una mayor robustez y capacidad para soportar condiciones desfavorables, y así tener un desempeño adecuado [21]. El ácido propiónico es el AGV que provoca más problemas de inhibición en la metanogénesis. Esto es debido a que la reacción para su degradación no es espontánea y a que las bacterias participantes en ella pueden ser inhibidas si la presión

parcial de hidrógeno aumenta [143]. El valor de energía libre de Gibbs para la conversión de propionato en acetato a 37 °C y pH 7 es 76 kJ/mol cuando el transporte de electrones es vía IHT. Por otra parte, cuando el transporte es mediante DIET este valor es negativo (-26.4 kJ/mol) siendo la reacción espontánea [143]. Adicionalmente, ha sido demostrado que DIET puede funcionar a presiones parciales de hidrógeno de hasta 17.23 kPa mientras que IHT se inhibe a esta presión parcial [133].

El UASB DIET mostró una mayor robustez a velocidad de carga orgánica de 4.6 kg DQO/(m³-día) y un menor incremento en la concentración de AGV cuando se aumentó la velocidad de carga orgánica a 5.5 kg DQO/(m³-día). Esto es debido a 3 motivos principalmente; una cinética más rápida, al ser la velocidad del transporte de electrones superior en DIET, un valor negativo en la energía libre de Gibbs en la degradación de los AGV haciendo esta reacción espontánea y una resistencia a presiones parciales altas de hidrógeno por parte de las bacterias y arqueas participantes en DIET.

3.5.2.2 Remoción DQO

En la figura 3.12 se puede observar la evolución de la DQO a lo largo de la experimentación, así como el porcentaje de remoción de la misma.

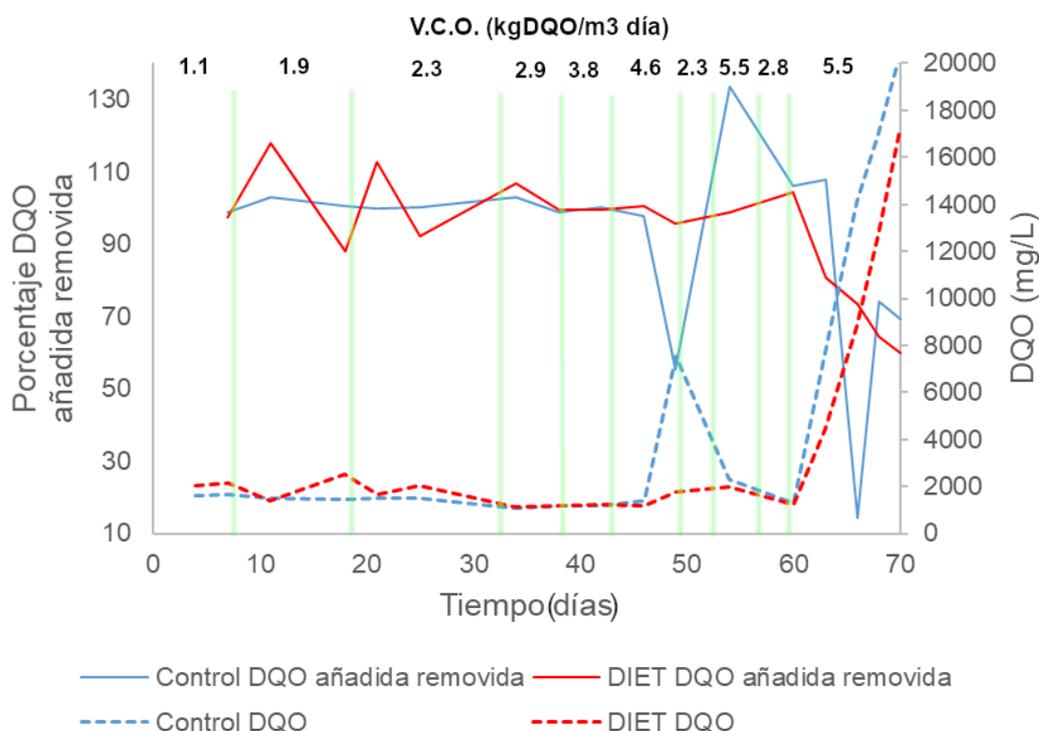


Figura 3.12 DQO en UASB control y UASB DIET en la fase arranque

El porcentaje de DQO eliminada en el UASB control antes de alcanzar la velocidad de carga orgánica de 5.5 kg DQO/(m³·día) fue del 95 %, descendiendo este a un 55 % a 4.6 kg DQO/(m³·día). Por otro lado, el UASB DIET tuvo un desempeño estable hasta que se aumentó la velocidad de carga orgánica a 5.5 kg DQO/(m³·día), manteniéndose la DQO del efluente en concentraciones en torno a 2 g/L y habiéndose removido el 101 % de la DQO añadida desde el inicio de la experimentación hasta aumentar la velocidad de carga orgánica a 5.5 kg DQO/(m³·día). El porcentaje de remoción con una velocidad de carga orgánica de 4.6 kg DQO/(m³·día) fue del 95 % en el UASB DIET, siendo este un 40 % superior al UASB control.

La DQO del efluente al final de la experimentación fue un 19 % superior en el UASB control que en el UASB DIET. Ha sido reportado en la literatura la capacidad que tienen reactores con CAG para soportar velocidades de carga orgánica más elevadas y remover una cantidad superior DQO que reactores sin CAG, esto es debido a una cinética más rápida en la formación de metano [15,149,152].

En este estudio la velocidad de carga orgánica a la que trabajaron sin presentar problemas los reactores UASB control y UASB DIET fue 3.8 y 4.6 kg DQO/(m³·día) respectivamente, siendo 5.5 kg DQO/(m³·día) muy elevada para ambos reactores. El hecho de que no se hayan alcanzado velocidades de carga orgánica superiores se debe al bajo contenido de biomasa inicial en los reactores y a una alta carga másica desde el inicio, como se describe anteriormente.

3.5.2.3 Nitrógeno total y fosfatos

La concentración de nitrógeno total y fosfatos a lo largo de la experimentación estuvo siempre dentro del rango óptimo para el desempeño de la digestión anaerobia, por lo que la falta de nutrientes, para que las bacterias y arqueas pudieran tener un buen desempeño, no fue el motivo causante de la acidificación de los reactores (figura 3.13). El nitrógeno total se mantuvo entre 200 y 560 mg/L para ambos reactores, la literatura recomienda concentraciones entre 200 y 1,000 mg/L [181].

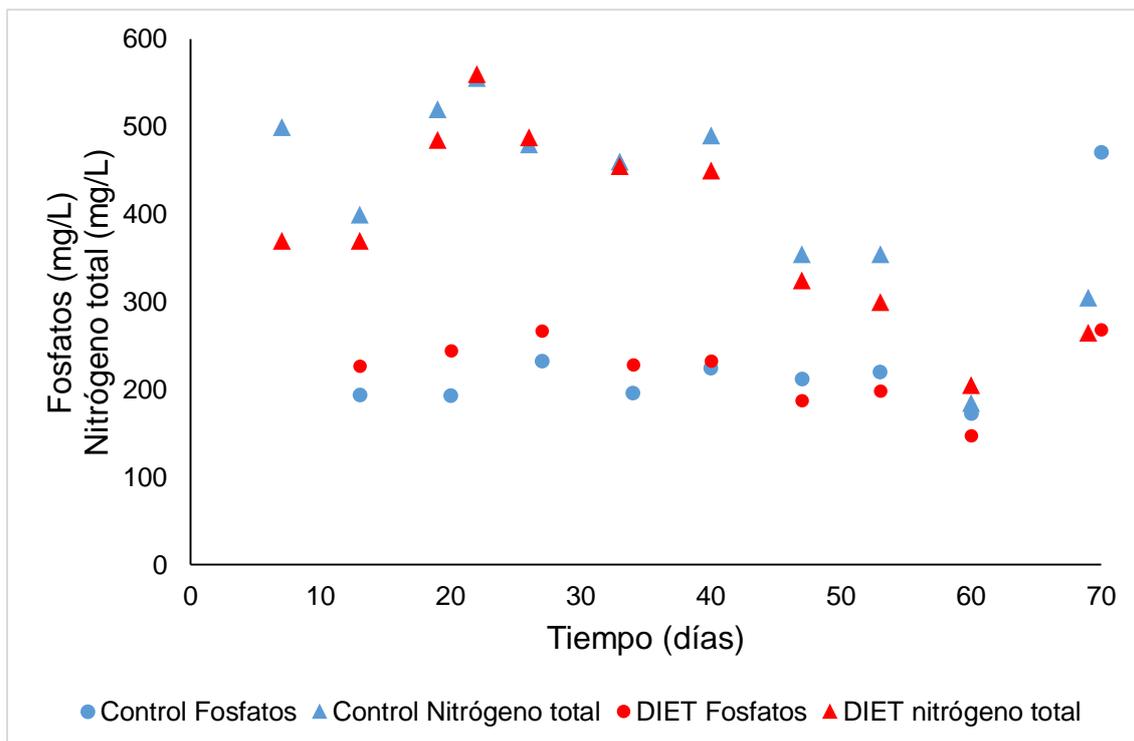


Figura 3.13 Concentración nitrógeno total y fosfatos en los reactores UASB control y UASB DIET en la fase de arranque

3.5.2.4 Rendimiento de metano

Los UASB estuvieron operando en continua recirculación durante 70 días. En la figura 3.14 se puede observar el rendimiento de metano que tuvieron los UASB en la fase de arranque. El rendimiento de metano fue más elevado en el UASB DIET que en el UASB control, apareciendo una mayor diferencia entre el UASB control y el UASB DIET en los 20 últimos días de la experimentación cuando la velocidad de carga orgánica fue 5.5 kg DQO/(m³·día). La producción total de metano fue un 19.93 % superior en el UASB DIET que en el UASB control. Adicionalmente, la eficiencia del UASB DIET fue superior a la del UASB control. Esta eficiencia se ve reflejada en el rendimiento de metano por cantidad de sustrato alimentado, se alcanzaron unos valores promedio de 0.21±0.07 y 0.26±0.07 L CH₄/g DQO_{añadida} en el UASB control y UASB DIET respectivamente. Previamente a que el UASB DIET se acidificara, y el pH fuera menor a 6, su rendimiento incrementó hasta 0.28±0.03 L CH₄/g DQO_{añadida}, operando a una velocidad de carga orgánica de 5.5 kg DQO/(m³·día).

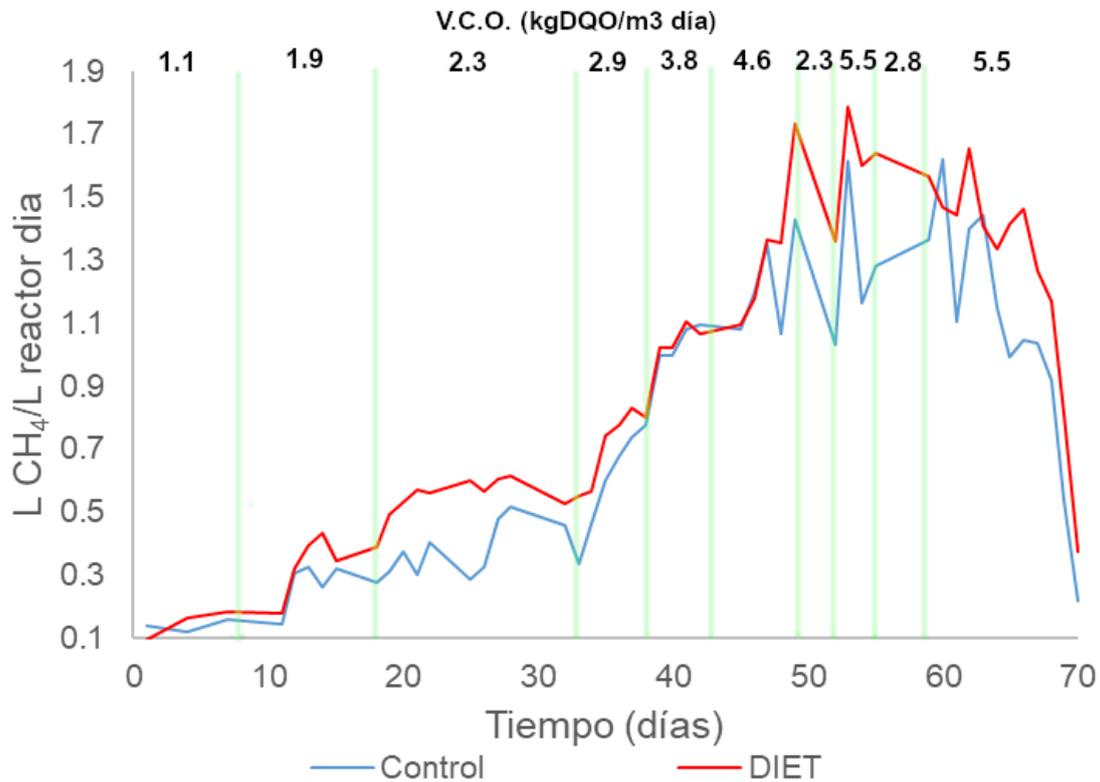


Figura 3.14 Rendimiento de metano diario en UASB control y UASB DIET en la fase de arranque

3.5.2.4.1 Concentración de metano

La concentración de metano en el biogás producido en UASB control y UASB DIET a lo largo del periodo de experimentación se puede observar en la figura 3.15. En ella se advierte una mayor concentración de metano en UASB DIET con un promedio durante toda la experimentación de 70.88 ± 8.12 %. Por el contrario, UASB control presenta un porcentaje de metano del 62.97 ± 9.21 %. Las concentraciones máximas de metano fueron registradas los días 49 (79.54 %) y 26 (85.45 %) para UASB control y UASB DIET respectivamente.

La razón principal del mayor rendimiento en la producción de metano en el reactor UASB DIET, es el incremento en la velocidad del transporte de electrones entre bacterias y arqueas a través del DIET, en comparación con el transporte electrones que emplea moléculas de hidrógeno para ello. Se ha reportado que el flujo de electrones empleando magnetita como material conductor es 10^6 veces mayor que vía hidrógeno [21].

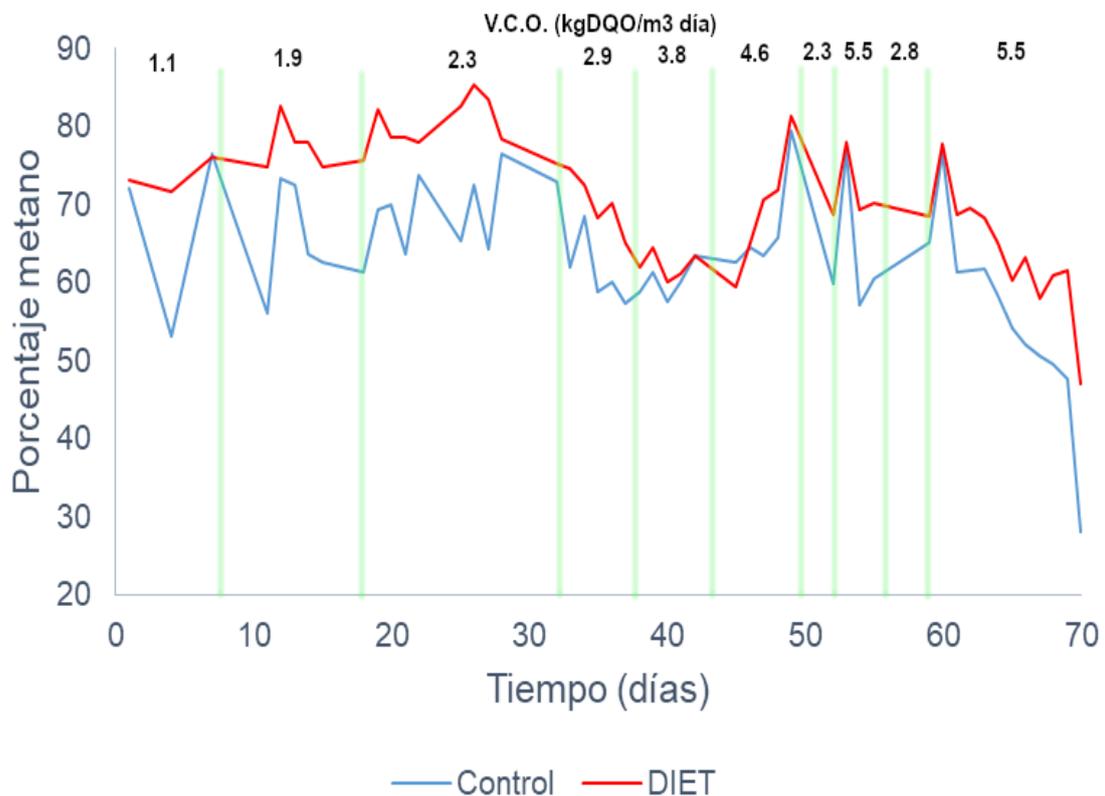


Figura 3.15 Porcentaje metano en UASB control y UASB DIET en la fase de arranque.

Adicionalmente, pueden aparecer problemas de competencia entre las diferentes bacterias por los subproductos generados en el proceso anaerobio. Los AGV y alcoholes producidos durante el proceso de digestión anaerobia pueden ser accesibles para otras bacterias anaerobias fermentativas, siendo competidoras de las bacterias electro donadoras participantes en el DIET o en IHT [23]. La formación de metano más rápida que se produce a través de DIET supone una ventaja de estas bacterias donadoras de electrones sobre otras bacterias anaerobias fermentativas [138].

El incremento en la concentración de metano del biogás se debe a una eficiente recuperación de los electrones cuando el transporte de los mismos se realiza a través de materiales conductores como CAG. Lin y colaboradores [148] demostraron en su estudio una eficiencia en la recuperación de electrones del 95 % cuando el transporte de electrones fue por DIET, mientras esta alcanzó el 76 % cuando el transporte de electrones fue vía IHT. Este incremento en la recuperación de electrones provoca una mayor reducción de dióxido de carbono a metano, aumentando la concentración del mismo en el biogás.

3.5.2.5 Procesos UASB DIET

En la tabla 3.8, están presentes los estudios realizados hasta la fecha en reactores UASB con materiales conductores, en condiciones mesofílicas de temperatura. Los estudios de Zhao y colaboradores [133] y Li y colaboradores [138] operaron a velocidades de carga orgánica similares a las del presente estudio (5.2 y 6.4 kg DQO/(m³·día) respectivamente). Sin embargo, el presente estudio alcanzó rendimientos de metano superiores 1.5 L CH₄/(L_{reactor}·día), mientras los otros dos estudios no llegaron a 1 L CH₄/(L_{reactor}·día). El único estudio en el que el reactor UASB presenta un volumen de trabajo similar a este estudio es el realizado por Xu y colaboradores [146]. Aunque alcanzaron una mayor velocidad de carga orgánica el rendimiento de metano tanto por volumen de reactor, como por cantidad de sustrato añadida al día, fue inferior un 14 % y 154 % respectivamente.

Tabla 3.8 Proceso de digestión anaerobia en UASB con material conductor

Volumen (L)	Sustrato	Velocidad carga orgánica (kg DQO/(m ³ ·día))	Material soporte	Rendimiento metano (L/(L _{reactor} ·día))	Rendimiento metano (L/(g DQO añadida·día))	Referencia
6.2	Glucosa	5.5	CAG	1.5	0.28	Este estudio
1	Etanol	12.33	Tela de carbono	3.6	0.29	[15]
1	Propionato	10.3	Biochar	3.06	0.30	[145]
0.8	Butanol	5.2	Tela de carbono	0.94	0.18	[133]
1.2	Lixiviado residuos sólidos urbanos	49.4	Tela de carbono	14.48	0.29	[152]
0.7	Lactato de sodio y sulfato de sodio	6.4	Acero inoxidable	0.23	0.04	[138]
5.6	Etanol y glucosa	12	CAG	1.31	0.11	[146]

El rendimiento de metano (0.28 L CH₄/(g DQO_{añadida}·día)) se encuentra muy próximo a los valores más elevados registrados hasta el momento (0.29 y 0.30 L CH₄/(g DQO_{añadida}·día)) (Tabla 3.8). En los estudios [15,146] que presentan un rendimiento de metano superior, los reactores fueron alimentados total o parcialmente con etanol.

Recientemente, ha sido demostrado que la presencia de etanol favorece el crecimiento de comunidades exoelectrogénicas como *Geobacter*, a su vez también potencia el desarrollo de microorganismos acetoclásticos electrotróficos como *Methanosarcina* [135,226]. Esto resulta en un mejor desempeño del reactor, en cuanto a degradación de AGV, especialmente ácidos propiónico y butírico, y un mayor rendimiento de metano. Los rendimientos de metano por volumen de reactor están por encima de los registrados en otros estudios a misma velocidad de carga orgánica. Adicionalmente, el rendimiento de metano por gramo de DQO añadida está en el rango de los más elevados, incluso cuando estos han sido estimulados con etanol (tabla 3.8). En vista de estos resultados obtenidos, se puede sugerir que si el UASB control y UASB DIET hubieran tenido una mayor biomasa de inóculo inicial no habrían sufrido un estrés tan elevado desde el principio, por lo que habrían mantenido los rendimientos de metano a velocidades de carga orgánica más elevadas, acercándose a las empleadas en los otros estudios.

3.5.3 Acoplamiento de APBR con microaireación con UASB control y UASB DIET

El nejayote empleado en estos ensayos presentaba una DQO más elevada 39.51 ± 5.57 g/L que los anteriores empleados. Este aumento en la concentración es debido a un incremento en la proporción maíz agua en el proceso de nixtamalización y/o a un mayor desprendimiento del pericarpio durante la generación del nixtamal. Este nuevo valor de DQO tiene un efecto en la duración del proceso, aumentado el tiempo necesario para la degradación del nejayote. La concentración de AGV registrada al inicio de la experimentación alcanzó un valor de 5.94 ± 1.15 g/L, representando un 15 % del total de la DQO inicial. Compuesta en un 99.9 % por ácido acético y un 0.01 % ácido butírico. Estos resultados tienen similitud con los obtenidos anteriormente, tanto en la proporción de AGV en la DQO, así como en la composición de los mismos.

3.5.3.1 Rendimientos en APBR control, APBR DIET, UASB control y UASB DIET

3.5.3.1.1 AGV y pH

Ha sido ampliamente reportado que DIET es más eficaz en la oxidación de alcoholes y AGV que IHT [15,145,148,150]. Además evita problemas de inhibición por alta presión parcial de hidrógeno y descensos drásticos en el pH por acumulación de AGV [133]. Cuando las primeras etapas de hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis se realizan de

forma eficaz y la metanogénesis no se realiza a la misma velocidad que las primeras etapas, el sistema se desbalancea, acumulándose AGV [227].

La figura 3.16 muestra la concentración de los diferentes AGV en los cuatro reactores empleados en la experimentación. Al tercer día de ensayo, los APBR alcanzaron su concentración máxima de AGV (11 g/L). La concentración de AGV superó los 5 g/L en el UASB control, al acumularse los AGV formados en el APBR control debido a un rendimiento deficiente en la fase metanogénica del UASB control. El reactor con mejor desempeño en la degradación de AGV fue el UASB DIET. La concentración de AGV nunca sobrepasó los 1.6 g/L en UASB DIET durante toda la experimentación. Debido al mejor rendimiento del reactor UASB DIET que el UASB control, la concentración de AGV de APBR DIET descendió hasta 1.57 ± 0.51 g/L al final de la experimentación. En cambio, APBR control registró una concentración de AGV 4.35 ± 0.02 g/L al término del ensayo.

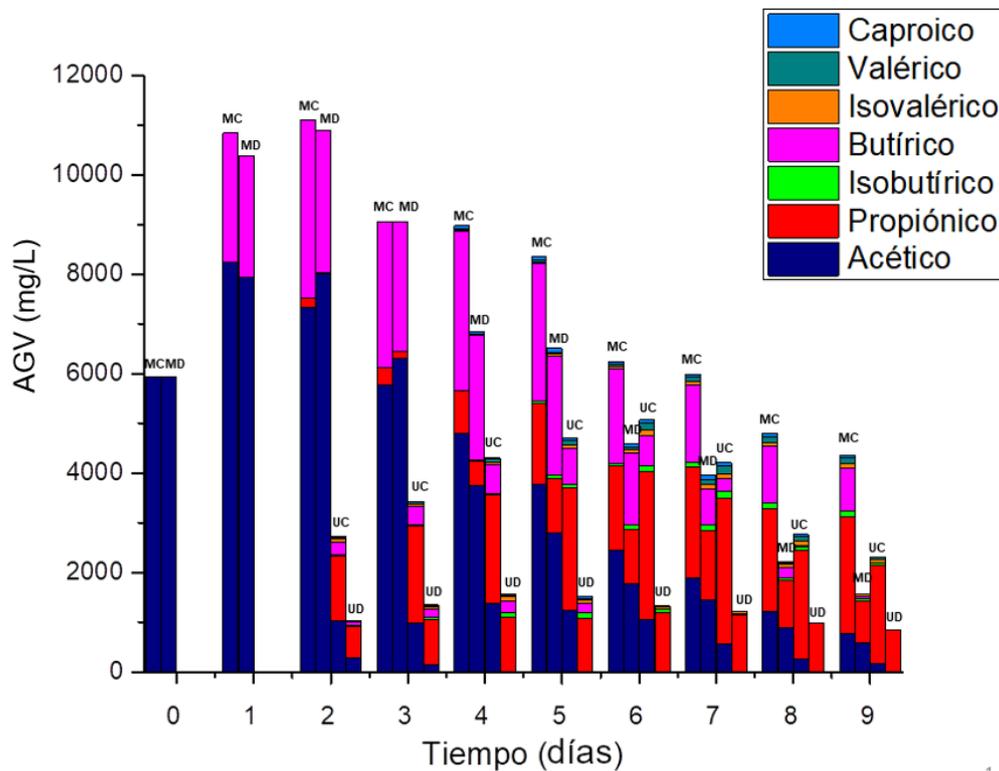


Figura 3.16 Concentración AGV en APBR control (MC), APBR DIET (MD), UASB control (UC), y UASB DIET (UD)

En la etapa acidogénica los principales AGV formados son ácido acético, propiónico y butírico, otros ácidos grasos como isobutírico, valérico, isovalérico y caproico están presentes en menor medida en los reactores de digestión anaerobia [228,229]. Estos

últimos AGV nombrados, fueron detectados tanto en los reactores metanogénicos como en los hidrolíticos. La concentración de ninguno de ellos sobrepasa 0.13 g/L durante todo el ensayo en los diferentes reactores.

Los carbohidratos son la principal materia orgánica presente en el nejayote. Estos carbohidratos son degradados y forman piruvato, precursor del ácido acético y butírico [230]. En la figura 3.16, al inicio de la experimentación, los AGV presentes en los APBR son principalmente acético y butírico. Conforme avanza la experimentación la presencia de ácido propiónico en todos los reactores aumenta disminuyendo la de ácido acético y butírico.

La concentración más elevada de acético en el UASB DIET fue 0.29 g/L, al día siguiente de la conexión de los reactores. En cambio, el UASB control alcanzó una concentración máxima de 1.36 ± 0.55 g/L el cuarto día de experimentación, en ese momento el ácido acético había sido totalmente consumido en el UASB DIET. La experimentación demuestra claramente que tanto la generación de acético como su posterior consumo fue mucho más rápida en UASB DIET. Esta mejora en el desempeño de la comunidad microbiana en la degradación del ácido acético, debido a la adición de un material conductor, y la promoción del DIET, concuerda con los resultados obtenidos por Lin y colaboradores [148]. En su estudio sugiere que los materiales conductores promocionan la relación sintrófica entre las bacterias acetogénicas y las arqueas metanogénicas, facilitándose la degradación del ácido acético y mejorando la generación de metano. El ácido acético es precursor en la formación de metano, el cual es producido en la degradación de ácidos grasos con mayor número de carbonos (ácido propiónico o butírico). Hay dos vías potenciales para la producción de metano a partir de acético [143]. Una es a partir de arqueas acetoclásticas metanogénicas y la otra es mediante la oxidación del acético en la relación sintrófica entre bacterias y arqueas, sea vía DIET o IHT [231]. La no presencia de acético a partir del cuarto día en el reactor UASB DIET, nos indica que el acético generado en la oxidación tanto del propiónico y como del butírico es totalmente metabolizado. Esto es debido a la acción conjunta de arqueas acetoclásticas presentes en el lodo y principalmente a la relación sintrófica entre bacterias exoelectrogénicas y arqueas electrotróficas vía DIET en la biopelícula formada en el CAG.

En UASB control se observa presencia de ácido acético durante toda la experimentación, lo cual demuestra que no fue posible metabolizar todo el acético producido en la degradación de propiónico y butírico a través de arqueas acetoclásticas y mediante la oxidación sintrófica por IHT. Este efecto en la degradación total del acético producido a partir de propiónico y butírico vía DIET ha sido reportado por Barua y colaboradores [232]. Estos resultados demuestran que el CAG es capaz de impulsar las

relaciones sintróficas entre las bacterias y arqueas en la degradación del acético, en un proceso de digestión anaerobia de un residuo complejo como el nejayote.

En la figura 3.17 se observa la evolución del pH en los APBR (control y DIET) y en los UASB (control y DIET). El pH en los APBR desciende a valores inferiores a 6 el primer día de experimentación. En el APBR DIET el pH alcanza un valor de 6 el cuarto día y supera 7 el octavo día. Por otro lado, el APBR control nunca alcanza el valor 7.

El pH óptimo para el desarrollo de la comunidad de microorganismos participantes en la metanogénesis es entre 6.8 y 7.3 [225]. El UASB DIET se mantiene en los valores citados durante toda la experimentación, favoreciéndose el buen funcionamiento de la comunidad para la formación de metano. En cambio, el UASB control estuvo fuera del rango óptimo para el desempeño correcto de la comunidad metanogénica. Desde que se conectó el APBR control al UASB control los valores de pH registrados en el UASB control fueron inferiores a 7. Los microorganismos metanogénicos son más sensibles a descensos en el pH que las bacterias fermentadoras, descensos en el pH pueden afectar a su rendimiento en la metanogénesis [23]. Ha sido demostrado en otros estudios que el pH de los reactores con materiales conductores añadidos se mantiene más estable, en valores cercanos a la neutralidad, en comparación con reactores sin estos materiales [19,152,153]. La acumulación de AGV provoca el descenso del pH, al ser estos AGV degradados con una mayor eficiencia a través de DIET evita este descenso en el pH, manteniendo el reactor en unas condiciones más estables.

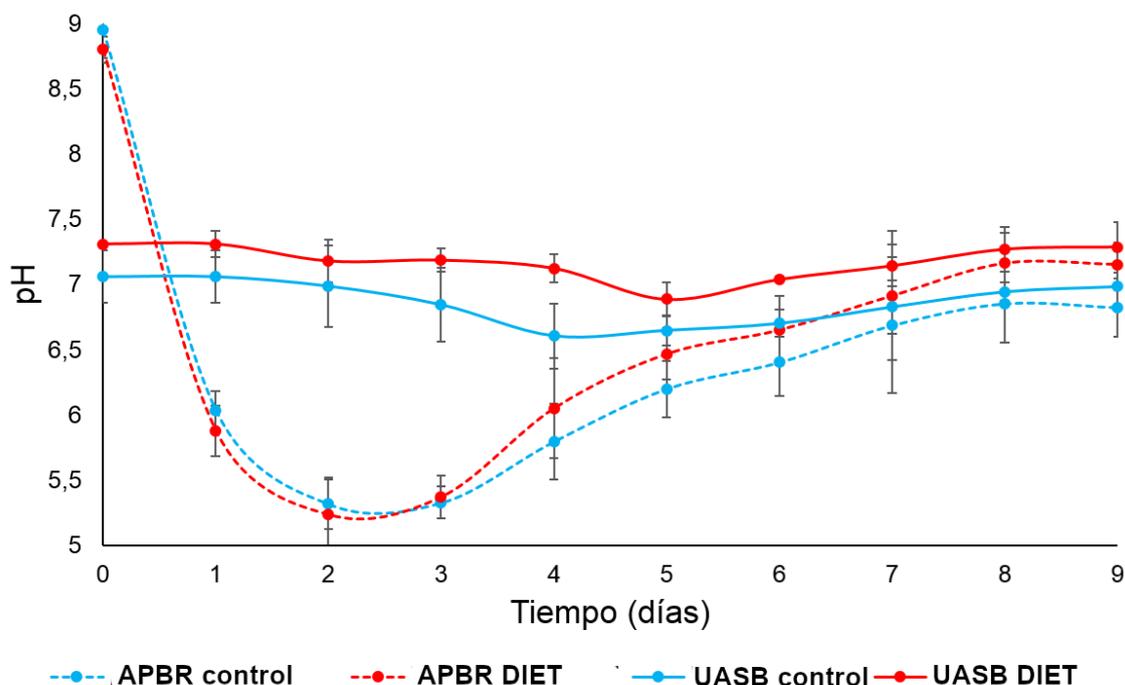


Figura 3.17 pH en APBR control, APBR DIET, UASB control y UASB DIET

Al estar los reactores conectados en recirculación, los APBR se ven afectados por los UASB. En la figura 3.17, se observa que al final de la experimentación los pH de los reactores conectados entre sí se igualan, APBR DIET y UASB DIET se mantienen con un valor de pH por encima de 7 y APBR control y UASB control por debajo de 7.

3.5.3.1.2 Remoción de DQO

La figura 3.18 muestra la evolución de la DQO en los APBR y UASB. El nejayote empleado en esta serie de ensayos presentó una DQO elevada de 39.51 ± 5.57 g/L.

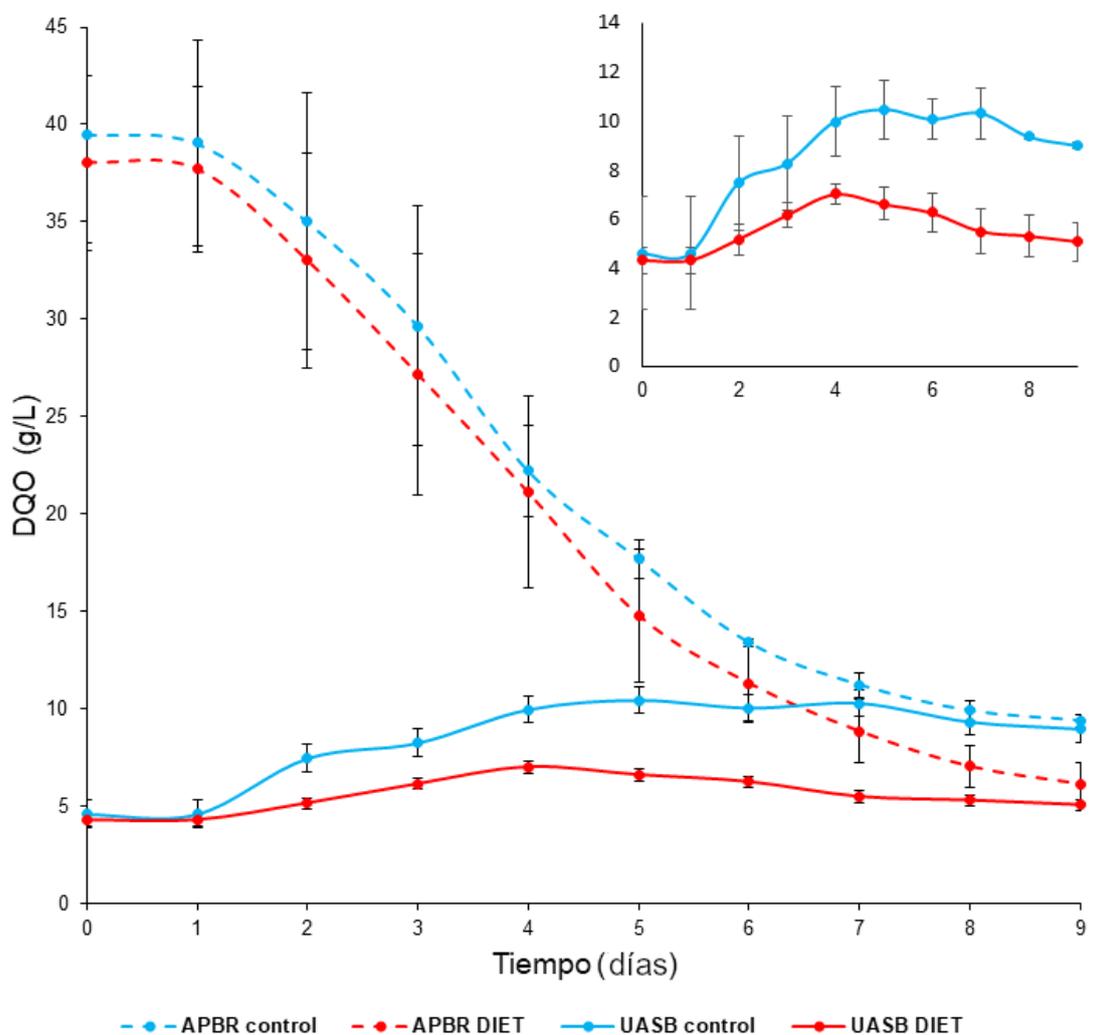


Figura 3.18 Concentración DQO en APBR control, APBR DIET, UASB control y UASB DIET. Zoom en la parte superior derecha para UASB control y UASB DIET.

La DQO final registrada en el APBR DIET fue un 52.6 % inferior que la del APBR control. En los UASB, donde se produce la metanogénesis, esta diferencia se incrementa a un

77.12 % entre UASB DIET y UASB control. La DQO inicial en los reactores UASB control y UASB DIET fue 4.5 ± 1.8 g/L y 4.3 ± 0.54 g/L respectivamente. Al final de la experimentación el UASB DIET registró una DQO de 5.07 ± 0.77 g/L. En cambio, la remoción de DQO en UASB control fue menos efectiva, presentando una DQO final de 8.98 ± 0.13 g/L. Debido a la recirculación entre los APBR y los UASB, y al propio proceso de digestión anaerobia realizado, la cantidad de materia orgánica presente en los reactores conectados se va igualando conforme va avanzando el proceso. Al finalizar el ensayo la diferencia en la concentración de DQO entre APBR control y UASB control descendió de 34.91 g/L a 0.42 g/L, y en APBR DIET y UASB DIET de 35.21 g/L a 1.09 g/L. El equilibrio alcanzado entre los reactores conectados entre sí, tanto en DQO como pH, unido al descenso en el rendimiento en la producción de metano en ambos UASB fue clave para finalizar el ensayo al noveno día.

3.5.3.1.3 Concentración de metano

Cruz Viggí y colaboradores [21] reportan en sus cálculos teóricos que el flujo de electrones máximo a través de magnetita es 10^6 veces superior al que se produce en la transferencia de electrones con hidrógeno como transportador de electrones (IHT).

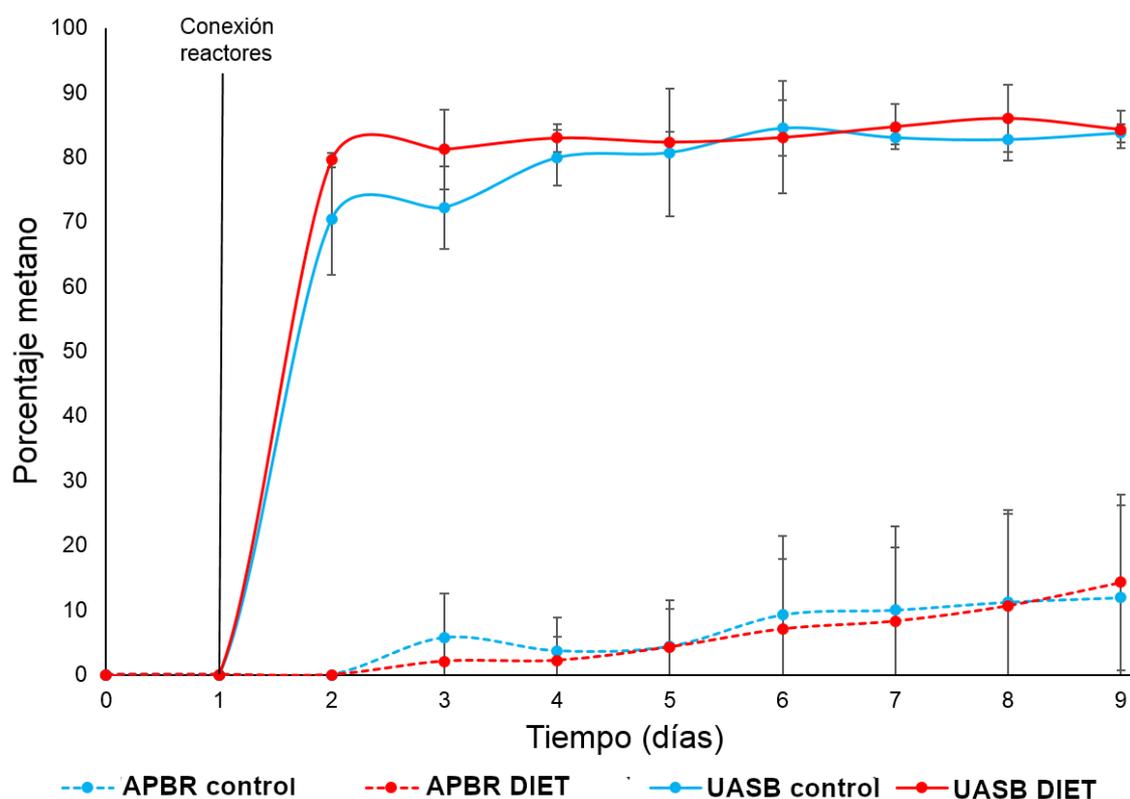


Figura 3.19 Porcentaje de metano en APBR control, APBR DIET, UASB control y UASB DIET

Este efecto tiene como consecuencia un incremento en la concentración de metano en el biogás generado. En la figura 3.19, se observa la concentración de metano en UASB control y UASB DIET. El contenido en metano del biogás supera el 80 % en UASB DIET desde el primer día de producción de metano. Por otro lado, el UASB control alcanza el 80 % de metano en el biogás generado el cuarto día del ensayo. Esta diferencia en la concentración de metano en el biogás se hace más presente a velocidades de carga orgánica superiores. Lei y colaboradores [233] en su estudio, muestran una concentración de metano un 32 % superior en el reactor con material conductor añadido que en el reactor control operando a una velocidad de carga orgánica por encima de 20 kg DQO/(m³·día). En ese mismo estudio cuando los reactores operaban a velocidades de carga orgánica inferiores a 5 kg DQO /m³-día no presento diferencias significativas en la concentración de metano en el biogás, al igual que en este trabajo.

En el caso de que la velocidad de carga orgánica hubiera sido más elevada en el estudio, aumentándose la concentración del nejayote en los UASB, la diferencia en la concentración de metano hubiera sido más notable a la que se presenta en la figura 3.19. En los APBR se detecta metano a partir del tercer día de experimentación. Al ser recirculado el nejayote con parte del inóculo del UASB, se incrementa la actividad metanogénica en los APBR, superándose al octavo día del ensayo el 10 % de concentración de metano en APBR control y APBR DIET.

3.5.3.2 Rendimientos totales en procesos control y DIET

3.5.3.2.1 AGV

En figura 3.20 se observa la evolución en la concentración de los diferentes AGV en el proceso control y en el proceso DIET. Durante las fases de hidrólisis y acidogénesis los principales productos generados son butirato y propionato, los cuales no pueden transformarse en metano directamente y necesitan ser degradados a acetato previamente para su posterior metanización [234]. La degradación de butirato es más favorable que la de propionato, esta requiere una concentración de hidrógeno entre cinco y seis veces menor que en la degradación de butirato [235]. El transporte de electrones a través de DIET puede reducir la acumulación de hidrógeno en el reactor y la posible inhibición del mismo, al ser transportados los electrones directamente a través del CAG en lugar de mediante moléculas de hidrógeno.

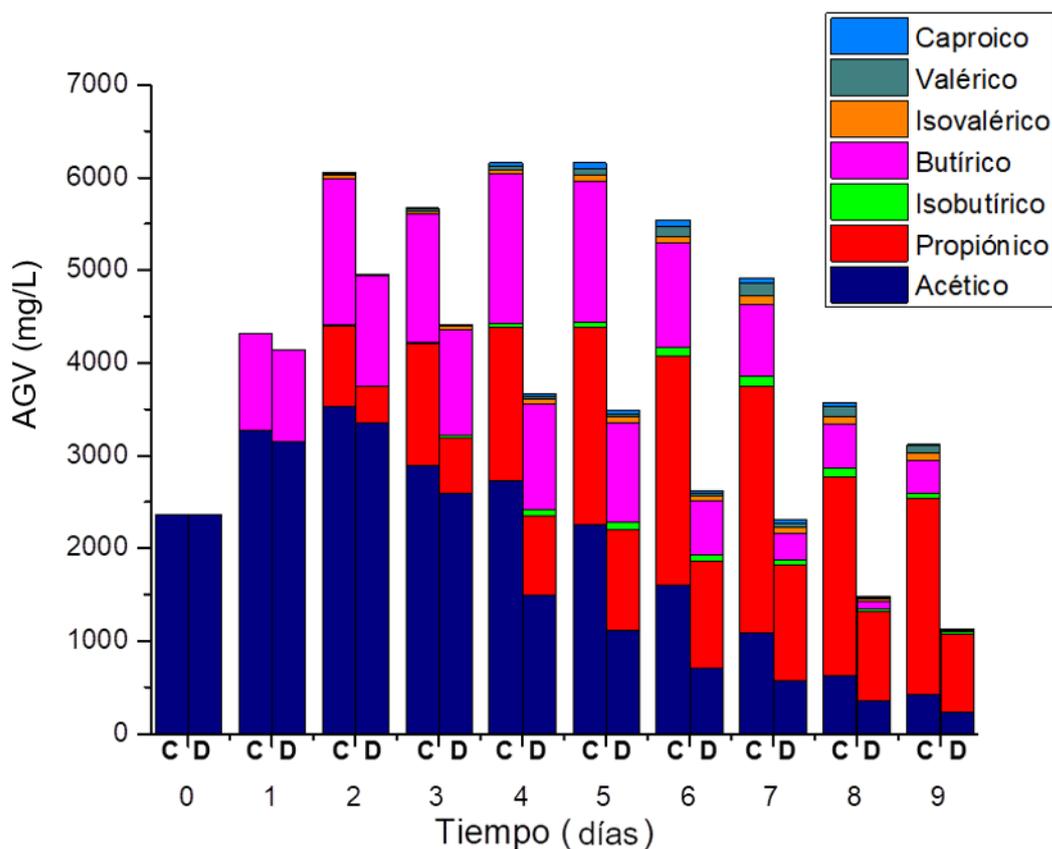


Figura 3.20 Concentración AGV en proceso control (C) y proceso DIET (D)

Los resultados presentados confirman este hecho, el ácido propiónico fue aumentando su concentración en ambos procesos hasta el séptimo día de experimentación. Sin embargo, la concentración máxima alcanzada del mismo al séptimo día fue de 2.66 ± 0.56 g/L y 1.25 ± 0.21 g/L en los procesos control y DIET respectivamente (figura 3.20). Al finalizar la experimentación, la concentración de ácido propiónico registrada en el proceso control fue superior a 2 g/L, por otro lado, el valor en la concentración del mismo en el proceso DIET fue inferior a 0.9 g/L. En el proceso control, el valor final de concentración de ácido butírico registrado fue 0.35 ± 0.06 g/L y estuvo presente en el UASB control hasta el octavo día del ensayo. El ácido butírico fue prácticamente totalmente metabolizado en el proceso DIET, siendo su concentración final de 0.02 ± 0.03 g/L y su presencia inexistente en el UASB DIET desde el sexto día de experimentación. La degradación de ácido propiónico en reactores anaerobios es un proceso de oxidación termodinámicamente desfavorable, lo cual provoca la acumulación del mismo y problemas de inhibición en los reactores debido a ello [235]. La degradación de propiónico en un sistema anaerobio requiere de la syntrofia entre bacterias oxidantes de propiónico y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas [131]. Ha sido reportado que el

transporte de electrones mediante DIET tiene un valor de energía libre de Gibbs más negativa que el realizado por IHT o IFT [21,138,231]. La adición de CAG en el reactor UASB induce el DIET en la biopelícula formada en el mismo, superándose la barrera termodinámica, este hecho supone un incremento en la eficiencia en la degradación de ácido propiónico como se observa en los resultados obtenidos.

3.5.3.2.2 Remoción DQO

La degradación de la materia orgánica en los UASB fue más efectiva en el proceso DIET después de los procesos de hidrólisis y acidogénesis realizados en los APBR. La figura 3.21 muestra el porcentaje de DQO removido. El proceso DIET alcanzó una eliminación de DQO del 78.77 ± 4.55 % y el proceso control 62.66 ± 6.23 %. El CAG promovió la transferencia de electrones directa, provocando un incremento en la velocidad de degradación de la materia orgánica hidrolizada por el APBR [19,141,144].

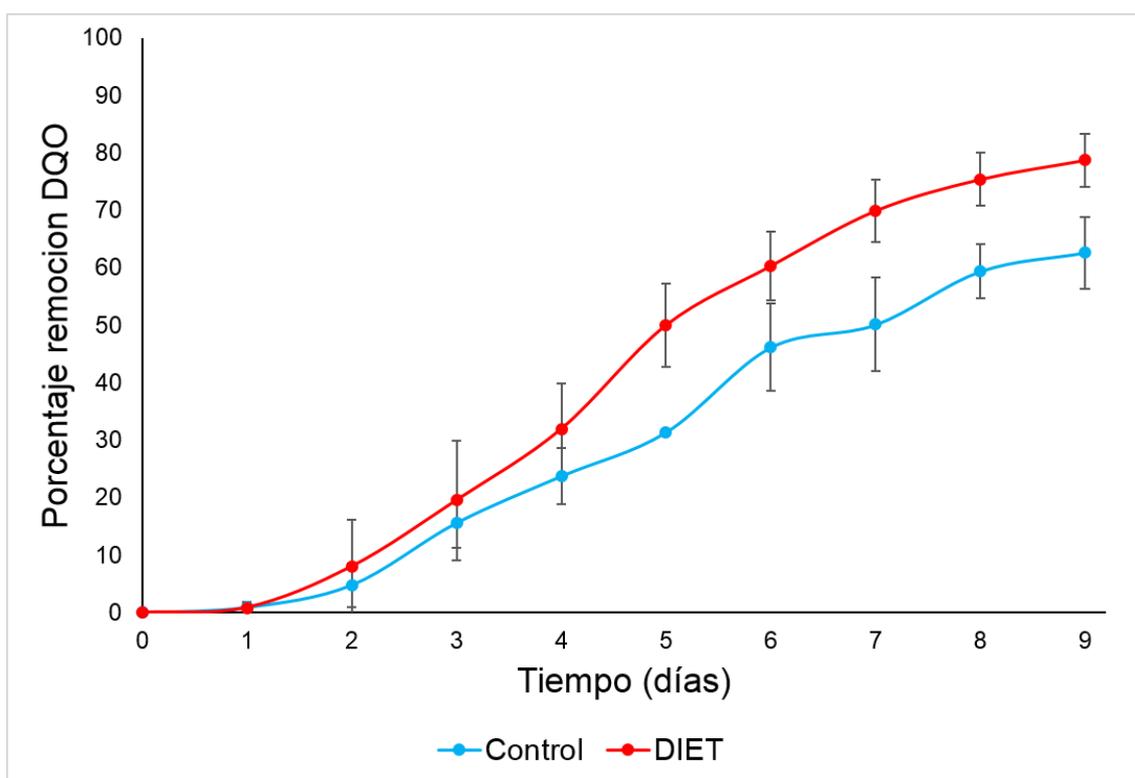


Figura 3.21 Porcentaje remoción DQO en proceso control y proceso DIET

3.5.3.2.3 Rendimiento de metano

La figura 3.22 muestra el rendimiento de metano a lo largo de la experimentación. Hasta el segundo día de experimentación no se registran datos de producción de metano. Los UASB se comienzan a alimentar con los APBR al finalizar el primer día de experimentación, por lo que el primer registro de metano generado es al terminar el segundo día del ensayo. El rendimiento de metano es superior en el proceso DIET todos los días de la experimentación. El rendimiento de metano en el proceso DIET es superior a $0.9 \text{ L CH}_4/\text{L reactor}\cdot\text{día}$ hasta el sexto día de experimentación. Este valor nunca es alcanzado por el proceso control. El rendimiento de metano hasta el quinto día es un 80.11 % mayor en el proceso DIET que en el proceso control. El valor máximo en el rendimiento de metano se alcanza al tercer día de ensayo en el proceso DIET $1.08 \pm 0.13 \text{ L CH}_4/(\text{L reactor día})$. En cambio, en el proceso control este es registrado el sexto día del ensayo $0.79 \pm 0.04 \text{ L CH}_4/(\text{L reactor día})$. El nejayote se encuentra recirculando entre los APBR y UASB. Al principio de la experimentación hay una mayor concentración de la materia orgánica, la cual es aprovechada por UASB DIET para alcanzar $1.08 \pm 0.13 \text{ L CH}_4/(\text{L reactor día})$.

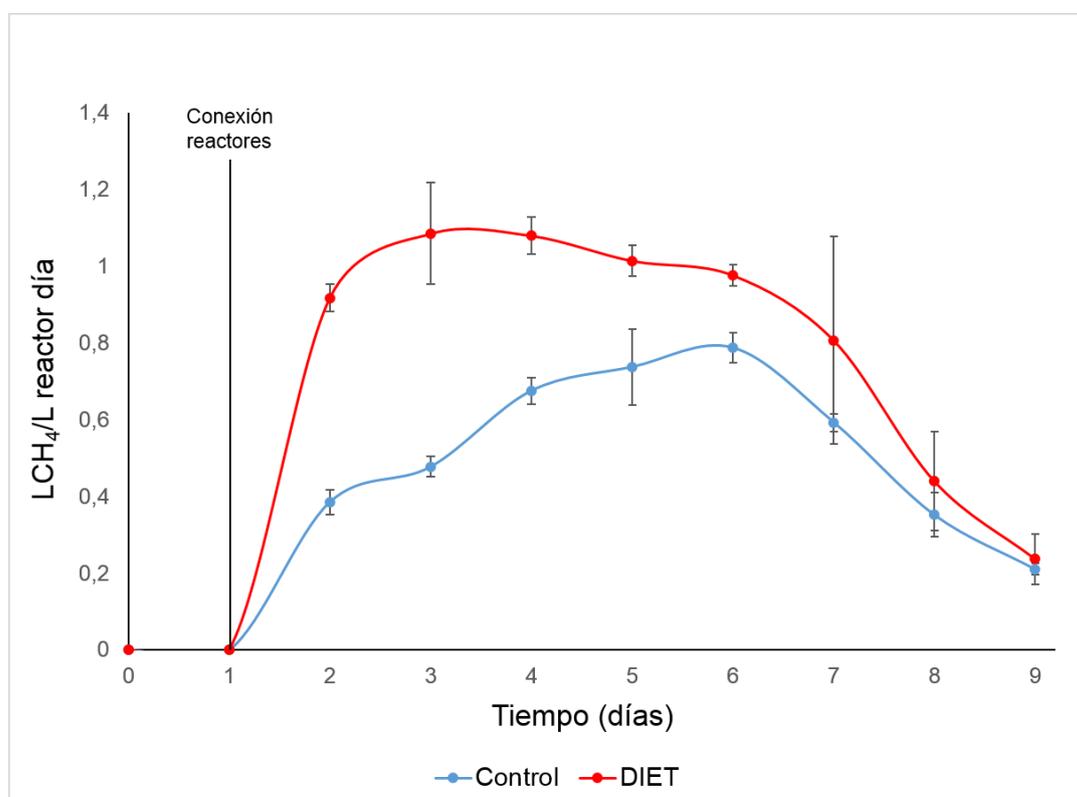


Figura 3.22 Rendimiento de metano en proceso control y proceso DIET

Por el contrario, el proceso control necesita que la materia orgánica se encuentre más diluida y formando compuestos de mayor facilidad para ser biodegradados, y así alcanzar su rendimiento de metano más elevado $0.79 \pm 0.04 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \text{ día})$.

La hidrólisis es una etapa limitante en la producción de metano, Zhao y colaboradores [151] demostraron que para que los materiales conductores mejoren de una manera más acentuada el rendimiento en la fase metanogénica es necesario que la hidrólisis y acidogénesis sean lo más eficientes posible. Hasta la fecha los compuestos reconocidos que pueden participar en un proceso DIET son alcoholes y AGV [24,121,134,160]. En el presente estudio, la acidogénesis es mejorada mediante la aplicación de microaireación en el APBR previamente a la alimentación del UASB, esto provoca un aumento en la concentración de AGV disponibles para oxidar y generar metano a partir de ellos. Estos compuestos son oxidados por bacterias exoelectrogénicas, enviando electrones a través del CAG a arqueas electrotróficas, para la reducción de dióxido de carbono a metano. El rendimiento total de metano, durante toda la experimentación, es un 55.48 % superior en el proceso DIET. Han sido reportados incrementos entre 20 % y 300 % en reactores metanogénicos con materiales conductores añadidos [23,141,143,149-151]. En estos estudios los sustratos empleados en su gran mayoría fueron AGV o sustratos de fácil biometanización como glucosa o agua residual sintética. En este estudio el residuo empleado es nejayote, el cual presenta una mayor complejidad y la diferencia en el rendimiento es menos notable debido a ello.

3.5.3.3 Identificación molecular de comunidades de bacterias en reactores UASB control y UASB DIET acoplados

3.5.3.3.1 Análisis a nivel filo y género de bacterias

El análisis de comunidades microbianas aporta información concluyente a los procesos de digestión anaerobia que han sido discutidos anteriormente.

Synergistetes representa más del 35 % de la comunidad bacteriana en L UASB control. Este filo ha sido reportado abundante en reactores UASB [116], tiene la capacidad de degradar proteínas generando principalmente ácido acético y como producto secundario ácido propiónico [236,237]. En cambio, ha sido descartado como posible participante en DIET [22] lo cual se refleja en su baja presencia en B CAG. En el filo *Proteobacteria* un gran número de bacterias exoelectrogénicas han sido identificadas ligadas a procesos de oxidación reducción y participantes como bacterias donadoras de electrones en DIET [23,143]. La presencia de bacterias pertenecientes a este filo en L UASB control se reduce al 1.6 % siendo la abundancia más baja de las cuatro muestras analizadas.

Adicionalmente, *Thermotogae*, otro filo con capacidad para transferir electrones via DIET su abundancia disminuye en L UASB control a 1.1 %. *Thermotogae* ha sido reportado como participante en DIET formando parte de una biopelícula desarrollada en Fe₃O₄ [161]. En la figura 3.23 se observa en L UASB control gran abundancia de *Firmicutes*. Los *Firmicutes* presentes en L UASB control son totalmente diferentes a los de B CAG. La figura 3.24 muestra las diferencias en la abundancia de las diferentes bacterias detectadas a nivel de género. Dentro de los *Firmicutes* los géneros pertenecientes al orden *Clostridiales* son los relacionados con la transferencia de electrones en DIET [157,238]. En L UASB control ningún género perteneciente al orden *Clostridiales* fue detectado con una abundancia mayor al 1 %, siendo el *Firmicutes* del género *Geobacillus* el más abundante con un 32.6 %.

En L UASB DIET y B acero el filo *Synergistetes* tiene la mayor abundancia en ambas muestras superando su presencia más del 35 %. Adicionalmente, *Thermotogae* presenta su mayor abundancia en L UASB DIET y en B acero con un porcentaje del 10.2 % y 13.5 % respectivamente.

Los filos con una mayor abundancia en la biopelícula formada en el CAG (B CAG) fueron *Firmicutes* (62.6 %), *Proteobacteria* (10.5 %) y *Thermotogae* (6.8 %) (Figura 3.23). Las bacterias pertenecientes a estos tres filos han sido identificadas como donadoras de electrones en DIET [23,143,161].

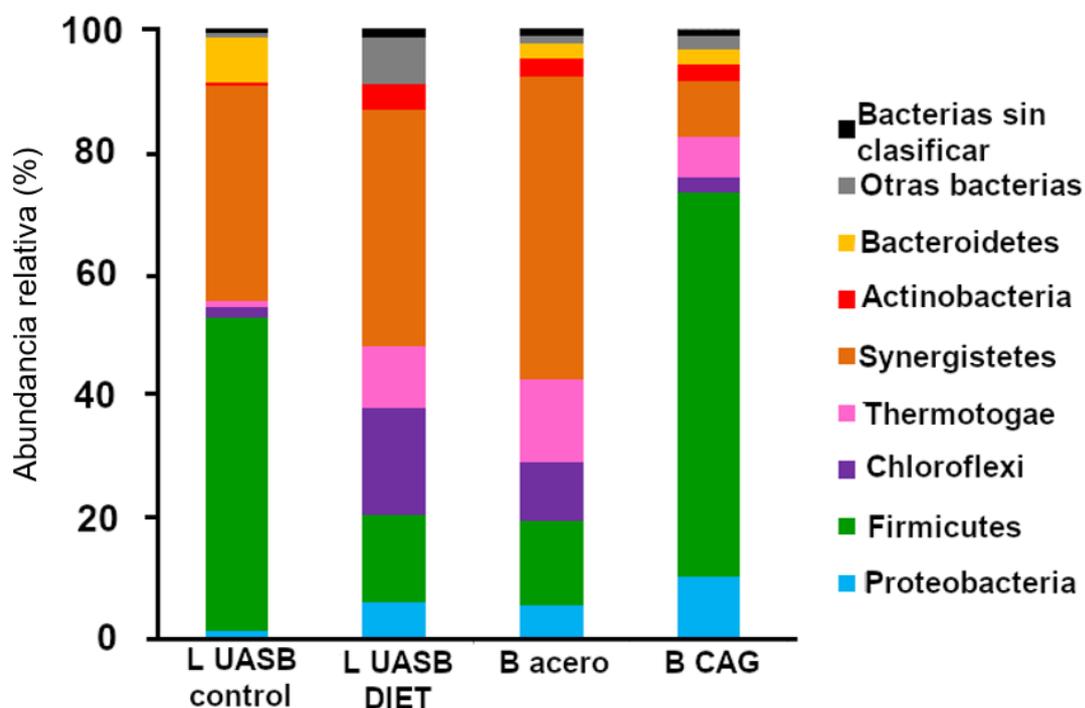


Figura 3.23 Abundancia relativa de los filos de las bacterias. Lodo del UASB control (L UASB control), lodo del UASB DIET (L UASB DIET), biopelícula de la bolsa malla de acero (B acero) y biopelícula del CAG (B CAG)

Este hecho, unido al incremento de su población tanto en las biopelículas como en el lodo de UASB DIET, sugiere su capacidad para donar electrones en un proceso DIET. Por otro lado, la presencia de *Synergistetes* se reduce a menos del 9 % en B CAG. En B CAG se detectó un enriquecimiento en *Firmicutes* electroactivos. *Clostridium* tuvo un enriquecimiento desde menos de 1 % en las muestras L UASB control, L UASB DIET y B acero, a un 12.8 % en B CAG. Este género ha sido reportado su capacidad de transferir electrones extracelularmente y de reducir Fe(III) [239]. Además, ha sido identificado en otros estudios como bacteria exoelectrogénica participante en DIET [159,238], incrementando su presencia en las biopelículas formadas en estos estudios. Dos *Firmicutes* pertenecientes a la familia *Peptococcaceae*, *Desulfotomaculum* y *Pelotomaculum* fueron detectados con una presencia de 4.3 % y 4.8 % en B CAG. *Desulfotomaculum* y *Pelotomaculum* tienen la capacidad de oxidar propionato a acetato para su posterior formación de metano a través de relaciones sintróficas con arqueas metanogénicas [240,241]. Ninguno de estos dos géneros fue detectado en L UASB control. Otra bacteria exoelectrogénica degradadora de propionato (*Syntrophobacter*) perteneciente al filo *Proteobacteria* solo fue detectada en B CAG [242]. *Syntrophobacter* registró un 1.8 % de abundancia en B CAG. El enriquecimiento de estas bacterias en el CAG, unido al mayor rendimiento del UASB DIET en la degradación de propiónico, confirma el rol de las mismas como exoelectrogénicas donadoras de electrones en un proceso DIET.

Un proceso DIET en un digestor anaerobio necesita tanto una bacteria exoelectrogénica como una arquea electrotrófica para realizarse. El inóculo empleado en este ensayo fue el mismo que el usado en el BMP con CAG. En la figura 3.7 se observa que *Methanosaeta* fue la arquea más abundante en todas las muestras. *Methanosaeta* es una arquea acetoclástica con la capacidad de degradar acetato a metano [243]. Esta función la realiza en el UASB control. En la biopelícula formada en el CAG del UASB DIET, *Methanosaeta* tiene un cambio de rol y pasa de ser una arquea acetoclástica a una arquea electrotrófica participante en DIET [24].

3.5.3.3.2 Mapa de calor, dendrograma y análisis componentes principales de bacterias

3.5.3.3.2.1 Mapa de calor y dendrograma

En el dendrograma de géneros de bacterias de la figura 3.24 se observan tres grandes clados. El segundo clado está formado por las bacterias que solo fueron detectadas en B CAG o las que su abundancia es mayor en B CAG que en cualquier otra muestra. En

este clado se agrupan todas las bacterias exoelectrogénicas anteriormente mencionadas. Cabe destacar la presencia, con menor abundancia que las anteriores, pero no menos relevante, de otra serie de bacterias con capacidad de transferir electrones extracelularmente.

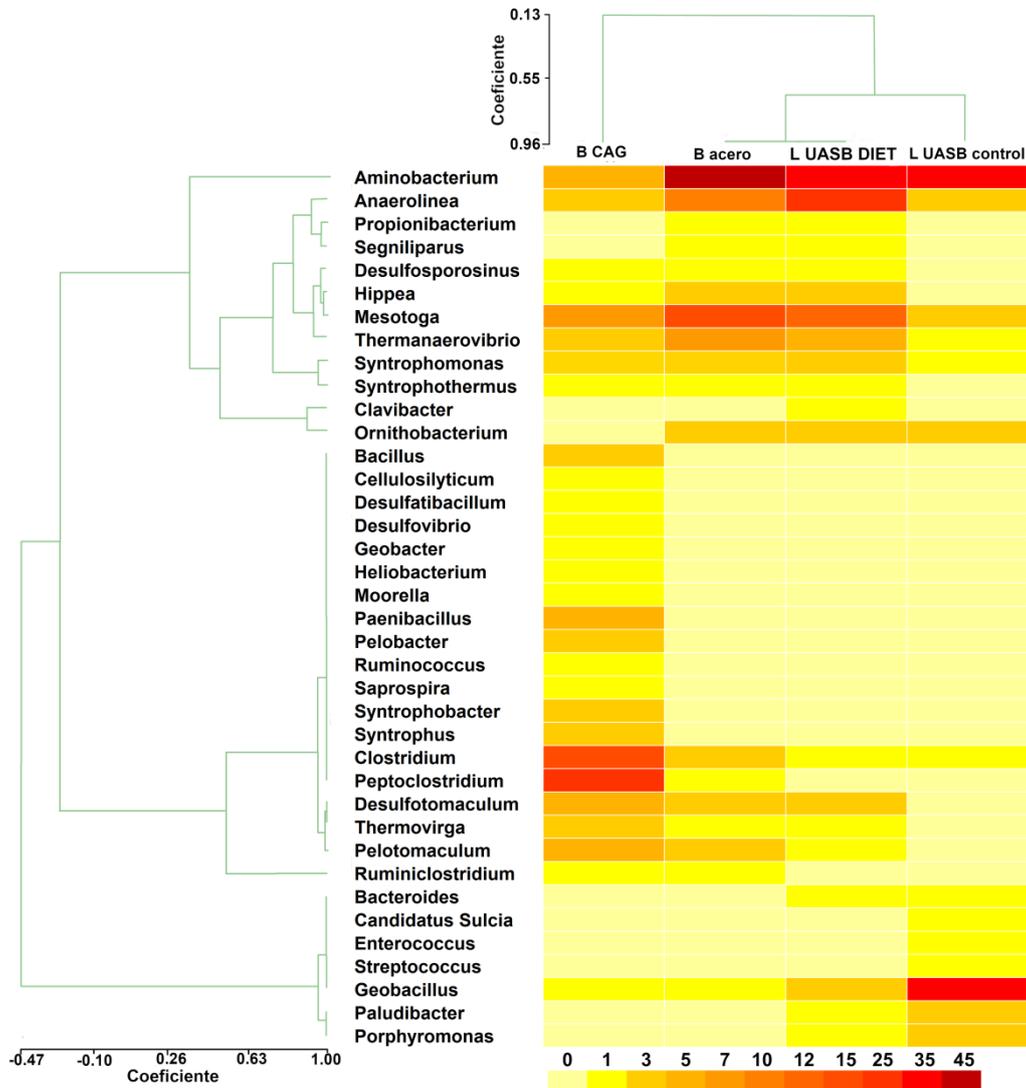


Figura 3.24 Mapa de calor y dendrogramas a nivel de género. Biopelícula carbón activado granulada (B CAG), biopelícula bolsa de malla de acero (B acero), lodo del UASB DIET (L UASB DIET) y lodo del UASB control (L UASB control). La escala del mapa de calor está basada en un código de color desde una abundancia del 0% al 45%. El coeficiente de correlación en los dendrogramas de los géneros y las diferentes muestras aparece en las dos escalas presentes en la figura

Desulfatibacillum, *Geobacter*, *Pelobacter* y *Desulfovibrio* son Deltaproteobacterias reductoras de Fe(III) y sulfato [244,245]. Los microorganismos reductores de hierro pueden transportar electrones extracelularmente en sedimentos y suelos [246]. Esta

capacidad es trasladada a otro ambiente como los digestores anaerobios. Estos microorganismos al formar parte de la biopelícula en materiales conductores como CAG, biochar, magnetita etc, se comportan como donadores de electrones en DIET [24]. *Peptoclostridium* fue la bacteria con mayor presencia en B CAG (17.3 %). *Peptoclostridium* solo fue detectada en B CAG y B acero, pero con una presencia en esta última mucho menor que en B CAG (0.7 %). Hasta el momento esta bacteria solo ha sido reportada como fermentadora de azúcares generando acetato como producto principal [247]. Este específico desarrollo en la biopelícula del CAG y sus similitudes en los procesos metabólicos llevados a cabo por *Clostridium*, actualmente identificada por otros autores como participante en DIET [159,238], sugieren que jugó un rol en el proceso DIET transfiriendo electrones a través del CAG a las metanogénicas electrotróficas.

La transferencia de electrones a través de DIET supone un ahorro de energía para las bacterias, en comparación con el transporte de electrones IHT o IFT [16]. Esto permite un crecimiento más rápido y una mayor variedad de los microorganismos como se observa en los resultados obtenidos (figura 3.24).

El dendrograma situado en la parte superior de la figura 3.24 explica la similitud entre las cuatro muestras analizadas. El coeficiente de correlación entre B acero y L UASB DIET es 0.96 indicando gran similitud entre ambas muestras. L UASB control es la siguiente en similitud a ellas con un coeficiente de 0.64. Por último, B CAG muestra una gran diferencia con respecto a las otras tres con un coeficiente de 0.13.

3.5.3.3.2 Análisis componentes principales de bacterias

Con el fin de profundizar más en las similitudes entre las comunidades detectadas en los lodos de ambos reactores y en las biopelículas formadas tanto en el CAG como en la bolsa de malla de acero se realizó un análisis de componentes principales. La figura 3.25 y 3.26 nos muestran este análisis. La figura 3.25 ilustra cómo se agrupan las bacterias en las muestras analizadas. La componente principal 1 explica el 58.2 % de la varianza de los datos y la componente principal 2 el 36.2 % sumando un total del 94.4 %. En la figura 3.25 se forman cuatro grupos principales. Los géneros que se distribuyen espacialmente en los valores más negativos del eje X (cuadro verde) solo fueron detectados en B CAG o su abundancia fue significativamente superior a la de ninguna otra muestra. Por otro lado, en el lado positivo del eje X se forman dos agrupaciones principalmente (cuadro amarillo y rojo). Las bacterias presentes en estas dos agrupaciones no fueron detectadas en B CAG o su abundancia es significativamente inferior en la misma con respecto a las otras muestras. Los valores negativos del eje X

explican la distribución de las bacterias con mayor abundancia en B CAG y menor presencia en el resto de las muestras. En los valores positivos de este eje aparecen los géneros menos abundantes o no detectados en B CAG, que a su vez son los principales géneros presentes en L UASB control, L UASB DIET y B acero.

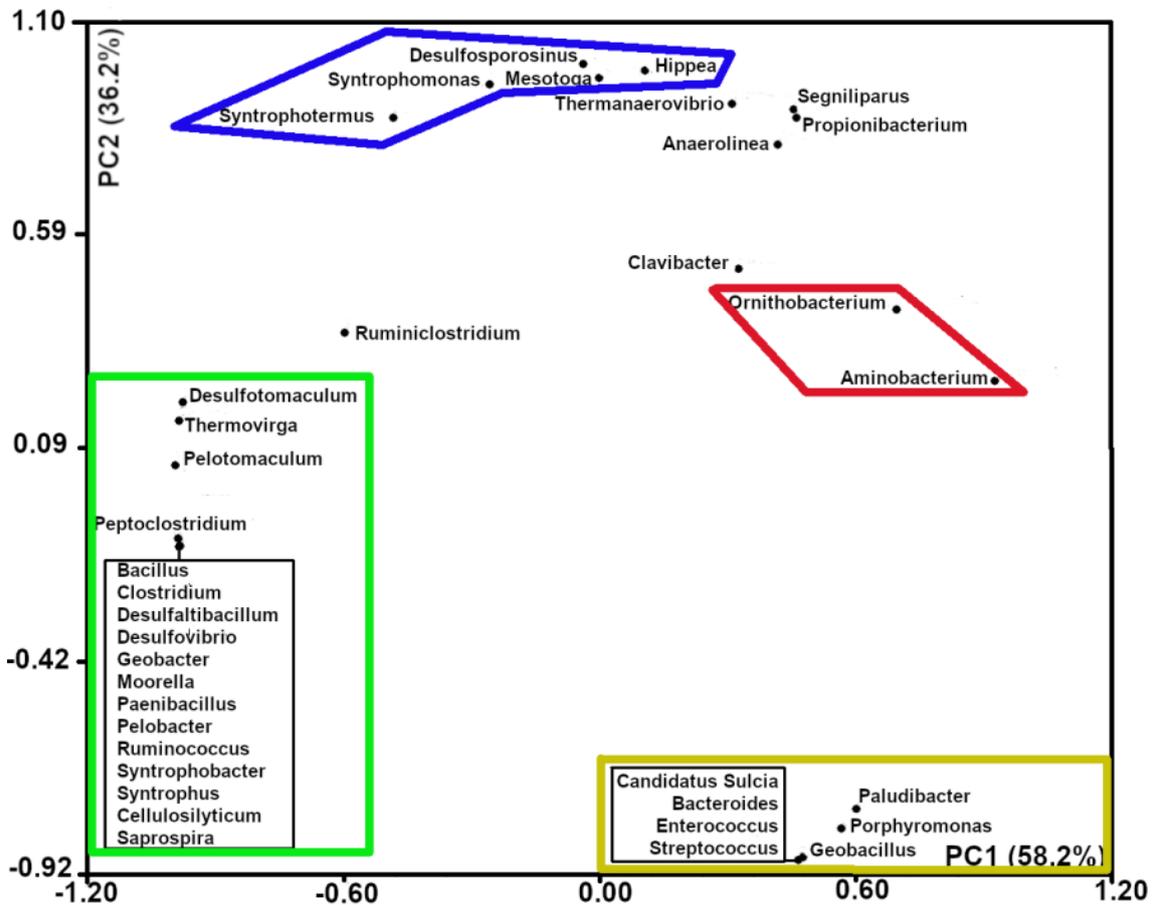


Figura 3.25 Análisis de componentes principales en dos dimensiones a nivel de género

Las agrupaciones en los recuadros amarillo, rojo y azul se diferencian entre sí por la componente principal 2. Los géneros que aparecen en los valores más negativos del eje Y, (cuadro amarillo), su abundancia es mayor en L UASB control o solo fueron detectados en esta muestra. Los géneros presentes en los valores más positivos del eje Y, (cuadro azul), tienen una abundancia superior en L UASB DIET y B acero, siendo su presencia menor o inexistente en L UASB control. La distribución espacial relacionada con la componente principal 2 explica la diferencia entre las comunidades formadas en L UASB control y las desarrolladas en L UASB DIET y B acero.

La similitud entre las cuatro muestras se explica en la figura 3.26 Las componentes principales 1, 2 y 3 describen el 64.2 %, 24.4 % y 10.6 % de las diferencias entre las

cuatro muestras. La muestra B CAG se sitúa en los valores más negativos del eje X y del eje Y, mientras que las otras tres muestras se encuadran en los valores más positivos de ambos ejes.

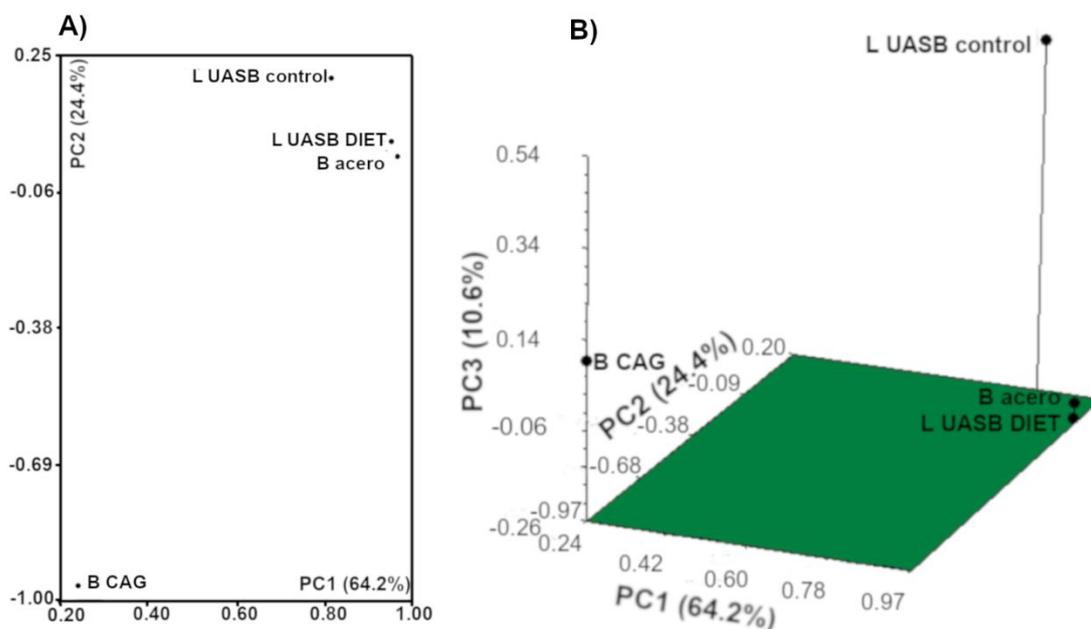


Figura 3.26 Análisis de componentes principales en tres dimensiones de las cuatro muestras, lodo UASB control (L UASB control), lodo UASB DIET (L UASB DIET), biopelícula bolsa malla de acero (B acero) y biopelícula de carbón activado granulado (B CAG). A) Análisis dos dimensiones. B) Análisis tres dimensiones

Esta gran diferencia se debe al desarrollo de las comunidades exoelectrogénicas en B CAG y como estas bacterias no están presentes en las otras muestras o con una abundancia mínima en ellas. El eje Z del análisis en tres dimensiones ilustra la diferencia entre los reactores UASB control y UASB DIET. Las muestras L UASB DIET y B acero están influenciadas por las comunidades exoelectrogénicas presentes en B CAG. Algunas de ellas están presentes en menor abundancia que en B CAG en ambas muestras, sin embargo, no tienen presencia en el lodo desarrollado en el UASB control. Además, hay una serie de géneros como *Candidatus sulcia*, *Enterococcus* y *Streptococcus* solo detectados en L UASB control.

Los diferentes análisis mostrados (mapa calor, dendrograma y análisis de componentes principales) reflejan una gran similitud entre B acero y L UASB DIET. El movimiento constante del lodo en el reactor, unido a la superficie completamente lisa de la malla de acero provocó que ambas comunidades se asemejaran. Por otro lado, el CAG se encontraba estático en el interior de la bolsa, y al contrario que la bolsa de malla de

acero, la superficie del carbón es totalmente porosa, permitiendo el desarrollo de comunidades completamente distintas al resto de las muestras.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

La fase hidrolítica es una etapa limitante en los procesos de digestión anaerobia. Para superar esta barrera, la digestión anaerobia en dos etapas con microaireación en el APBR hidrolítico redujo el tiempo necesario para la hidrólisis a la mitad e incrementó el porcentaje de los ácidos acético y butírico disponibles en el medio para la etapa metanogénica un 51 %. Los compuestos metabolizados en UASB DIET son AGV de cadena corta o alcoholes producidos en la etapa hidrolítica. El desempeño del proceso DIET fue un 55 % superior en rendimiento total de metano. La concentración final de AGV en el proceso control fue 3 veces superior que en el proceso DIET. Adicionalmente, la remoción de DQO total paso del 62.7 % al 78.8 % para el proceso control y proceso DIET respectivamente. Un enriquecimiento del 25 % y del 48 % de comunidades exoelectrogénicas ha sido demostrado en las biopelículas del CAG del ensayo BMP y del UASB DIET. La gran diversidad de bacterias exoelectrogénicas (*Geobacter*, *Prolixibacter*, *Bacteroides*, *Syntrophomonas*, *Pelotomaculum*, *Desulfotomaculum*, *Peptoclostridium*, *Desulfovibrio*, *Pelobacter*, *Desulfatibacillum*) identificadas en la biopelícula formada en el CAG con propiedades de participar en la transferencia directa de electrones entre especies, sugiere la posibilidad de emplear el sistema DIET con diferentes inóculos.

Bibliografía

- [1] Rosentrater, K. A. (2006) A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization, *Waste Manage.* 26, 284-292
- [2] Ibarra-Mendívil, M. H., Gallardo-Navarro, Y. T., Torres, P. I., and Ramírez Wong, B. (2008) EFFECT OF PROCESSING CONDITIONS ON INSTRUMENTAL EVALUATION OF NIXTAMAL HARDNESS OF CORN, *Journal of Texture Studies.* 39, 252-266
- [3] Rojas-Molina, I. *et al.* (2009) Effect of temperature and steeping time on calcium and phosphorus content in nixtamalized corn flours obtained by traditional nixtamalization process, *Cereal Chem.* 86, 516-521
- [4] Valderrama-Bravo, C. *et al.* (2012) Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels in maize processing, *J. Food Eng.* 110, 478-486
- [5] Rosentrater, K. A., Flores, R. A., Richard, T. L., and Bern, C. J. (1999) Physical and nutritional properties of corn masa by-product streams, *Appl. Eng. Agric.* 15, 515-523
- [6] NOM-CCA-006-ECOL/1993 (1993) NORMA Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de fabricación de harinas,
- [7] Kaparaju, P. and Rintala, J. (2011) Mitigation of greenhouse gas emissions by adopting anaerobic digestion technology on dairy, sow and pig farms in Finland, *Renewable Energy.* 36, 31-41
- [8] Riva, C., Schievano, A., D'Imporzano, G., and Adani, F. (2014) Production costs and operative margins in electric energy generation from biogas. Full-scale case studies in Italy, *Waste Manage.* 34, 1429-1435
- [9] Khanal, S. K. (2011) Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications,
- [10] Nguyen, D. and Khanal, S. K. (2018) A little breath of fresh air into an anaerobic system: How microaeration facilitates anaerobic digestion process, *Biotechnol. Adv.*
- [11] Lim, J. W. and Wang, J.-Y. (2013) Enhanced hydrolysis and methane yield by applying microaeration pretreatment to the anaerobic co-digestion of brown water and food waste, *Waste Manage.* 33, 813-819
- [12] Botheju, D., Lie, B., and Bakke, R. (2010) Oxygen effects in anaerobic digestion-II,
- [13] Yin, J. *et al.* (2016) Enhancement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste: Effect of redox potential and inoculum, *Bioresour. Technol.* 216, 996-1003
- [14] Xu, S., Selvam, A., Karthikeyan, O. P., and Wong, J. W. (2014) Responses of microbial community and acidogenic intermediates to different water regimes in a hybrid solid anaerobic digestion system treating food waste, *Bioresour. Technol.* 168, 49-58
- [15] Zhao, Z., Zhang, Y., Woodard, T. L., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2015) Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials, *Bioresour. Technol.* 191, 140-145
- [16] Shen, L., Zhao, Q., Wu, X., Li, X., Li, Q., and Wang, Y. (2016) Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 54, 1358-1367
- [17] Shrestha, P. M. and Rotaru, A.-E. (2014) Plugging in or Going Wireless: Strategies for Interspecies Electron Transfer, *Frontiers in Microbiology.* 5,
- [18] Lovley, D. R. (2011) Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy & Environmental Science.* 4, 4896-4906
- [19] Liu, F., Rotaru, A.-E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2012) Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon, *Energy & Environmental Science.* 5, 8982-8989

- [20] Chen, S. *et al.* (2014) Promoting Interspecies Electron Transfer with Biochar, *Scientific Reports*. 4, 5019
- [21] Cruz Viggi, C., Rossetti, S., Fazi, S., Paiano, P., Majone, M., and Aulenta, F. (2014) Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation, *Environ. Sci. Technol.* 48, 7536-7543
- [22] Shrestha, P. M. *et al.* (2014) Correlation between microbial community and granule conductivity in anaerobic bioreactors for brewery wastewater treatment, *Bioresour. Technol.* 174, 306-310
- [23] Park, J.-H., Kang, H.-J., Park, K.-H., and Park, H.-D. (2018) Direct interspecies electron transfer via conductive materials: a perspective for anaerobic digestion applications, *Bioresour. Technol.*
- [24] Barua, S. and Dhar, B. R. (2017) Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 244, 698-707
- [25] Sefa-Dedeh, S., Cornelius, B., Sakyi-Dawson, E., and Afoakwa, E. O. (2004) Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize, *Food Chem.* 86, 317-324
- [26] Meraz, K. A. S., Vargas, S. M. P., Maldonado, J. T. L., Bravo, J. M. C., Guzman, M. T. O., and Maldonado, E. A. L. (2016) Eco-friendly innovation for nejayote coagulation–flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements, *Chem. Eng. J.* 284, 536-542
- [27] Chalé Canul, J. S. (2016) Obtención de metano a partir de aguas residuales de maíz (nejayote) mediante dos reactores en serie. Centro de Investigación Científica Yucatán,
- [28] García-Zamora, J. L. *et al.* (2015) Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content, *Process Biochem.* 50, 125-133
- [29] Valderrama-Bravo, C., Valderrama-Bravo, C., Gutiérrez-Cortez, E., Contreras-Padilla, M., and Oaxaca-Luna, A. (2013) Physico-mechanic treatment of nixtamalization by-product (nejayote), *CYTA: journal of food.* 11, 75-83
- [30] Ou, S. and Kwok, K. C. (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J. Sci. Food Agric.* 84, 1261-1269
- [31] de Brenes, R. P. and de Bazúa, C. D. (1987) RBC characteristics for nejayote aerobic treatment, *Environ. Technol.* 8, 579-588
- [32] Salmerón-Alcocer, A. *et al.* (2003) Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor, *Journal of Environmental Engineering & Science.* 2, 401-406
- [33] Civit, E., de Bazúa, C. D., Engelmann, G., González, S., and Hartmann, L. (1984) Anaerobic treatment of maize processing waste water (Nejayote) in a packed bed reactor cascade, *Environmental Technology Letters.* 5, 89-96
- [34] Polanco, M. F. (2012) Depuración anaerobia de aguas residuales tratamiento integrado anaerobio/aerobio,
- [35] Kong, X., Xu, S., Liu, J., Li, H., Zhao, K., and He, L. (2016) Enhancing anaerobic digestion of high-pressure extruded food waste by inoculum optimization, *J. Environ. Manage.* 166, 31-37
- [36] Wilson, L. P., Sharvelle, S. E., and De Long, S. K. (2016) Enhanced anaerobic digestion performance via combined solids- and leachate-based hydrolysis reactor inoculation, *Bioresour. Technol.* 220, 94-103
- [37] Kawai, M., Nagao, N., Tajima, N., Niwa, C., Matsuyama, T., and Toda, T. (2014) The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield, *Bioresour. Technol.* 157, 174-180
- [38] Lü, F., He, P., Hao, L., and Shao, L. (2008) Impact of recycled effluent on the hydrolysis during anaerobic digestion of vegetable and flower waste, *Water Sci. Technol.* 58, 1637-1643

- [39] Jagadabhi, P. S., Kaparaju, P., and Rintala, J. (2010) Effect of micro-aeration and leachate replacement on COD solubilization and VFA production during mono-digestion of grass-silage in one-stage leach-bed reactors, *Bioresour. Technol.* 101, 2818-2824
- [40] Díaz, I., Donoso-Bravo, A., and Fdz-Polanco, M. (2011) Effect of microaerobic conditions on the degradation kinetics of cellulose, *Bioresour. Technol.* 102, 10139-10142
- [41] Lim, J. W., Chiam, J. A., and Wang, J.-Y. (2014) Microbial community structure reveals how microaeration improves fermentation during anaerobic co-digestion of brown water and food waste, *Bioresour. Technol.* 171, 132-138
- [42] Fu, S.-F., Wang, F., Shi, X.-S., and Guo, R.-B. (2016) Impacts of microaeration on the anaerobic digestion of corn straw and the microbial community structure, *Chem. Eng. J.* 287, 523-528
- [43] Feng, Y., Zhang, Y., Quan, X., and Chen, S. (2014) Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron, *Water Res.* 52, 242-250
- [44] Wang, L., Zhou, Q., and Li, F. T. (2006) Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production, *Biomass Bioenergy.* 30, 177-182
- [45] Ren, N., Chua, H., Chan, S., Tsang, Y., Wang, Y., and Sin, N. (2007) Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors, *Bioresour. Technol.* 98, 1774-1780
- [46] Xue, Y., Liu, H., Chen, S., Dichtl, N., Dai, X., and Li, N. (2015) Effects of thermal hydrolysis on organic matter solubilization and anaerobic digestion of high solid sludge, *Chem. Eng. J.* 264, 174-180
- [47] Ge, H., Jensen, P. D., and Batstone, D. J. (2011) Temperature phased anaerobic digestion increases apparent hydrolysis rate for waste activated sludge, *Water Res.* 45, 1597-1606
- [48] Cano, R., Nielfa, A., and Fdz-Polanco, M. (2014) Thermal hydrolysis integration in the anaerobic digestion process of different solid wastes: energy and economic feasibility study, *Bioresour. Technol.* 168, 14-22
- [49] Lesteur, M. *et al.* (2010) Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: a review, *Process Biochem.* 45, 431-440
- [50] Buffiere, P., Loisel, D., Bernet, N., and Delgenes, J. (2006) Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties, *Water Sci. Technol.* 53, 233-241
- [51] Hansen, T. L. *et al.* (2004) Method for determination of methane potentials of solid organic waste, *Waste Manage.* 24, 393-400
- [52] Angelidaki, I. and Sanders, W. (2004) Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 3, 117-129
- [53] Strömberg, S., Nistor, M., and Liu, J. (2014) Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests, *Waste Manage.* 34, 1939-1948
- [54] Pozdniakova, T. A., Costa, J. C., Santos, R. J., Alves, M. M., and Boaventura, R. A. R. (2012) Anaerobic biodegradability of Category 2 animal by-products: Methane potential and inoculum source, *Bioresour. Technol.* 124, 276-282
- [55] Raposo, F. *et al.* (2011) Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1088-1098
- [56] Angelidaki, I. *et al.* (2009) Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays, *Water Sci. Technol.* 59, 927-934
- [57] Raposo, F., De la Rubia, M. A., Fernández-Cegrí, V., and Borja, R. (2012) Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 16, 861-877

- [58] Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., and Martín, A. (2001) Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate, *Process Biochem.* 37, 483-489
- [59] Wang, B. *et al.* (2015) Effects of substrate concentration on methane potential and degradation kinetics in batch anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 194, 240-246
- [60] Maya-Altamira, L., Baun, A., Angelidaki, I., and Schmidt, J. E. (2008) Influence of wastewater characteristics on methane potential in food-processing industry wastewaters, *Water Res.* 42, 2195-2203
- [61] Rodriguez-Chiang, L. M. and Dahl, O. P. (2014) Effect of inoculum to substrate ratio on the methane potential of microcrystalline cellulose production wastewater, *BioResources.* 10, 898-911
- [62] Lindmark, J., Thorin, E., Bel Fdhila, R., and Dahlquist, E. (2014) Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 40, 1030-1047
- [63] Wang, B., Björn, A., Strömberg, S., Nges, I. A., Nistor, M., and Liu, J. (2017) Evaluating the influences of mixing strategies on the Biochemical Methane Potential test, *J. Environ. Manage.* 185, 54-59
- [64] Aslanzadeh, S., Rajendran, K., and Taherzadeh, M. J. (2014) A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 95, Part A, 181-188
- [65] Rincón, B., Borja, R., Martín, M. A., and Martín, A. (2009) Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic–acidogenic step, *Waste Manage.* 29, 2566-2573
- [66] Bo, Z. and Pin-jing, H. (2014) Performance assessment of two-stage anaerobic digestion of kitchen wastes, *Environ. Technol.* 35, 1277-1285
- [67] Nasr, N., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G., and Hesham El Naggar, M. (2012) Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage, *Bioresour. Technol.* 111, 122-126
- [68] Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., and Ng, W. J. (2015) Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems – Performance and microbial community dynamics, *Chemosphere.* 140, 54-62
- [69] Singh, S. P. and Prerna, P. (2009) Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 13, 1569-1575
- [70] Lettinga, G. (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment systems, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 67, 3-28
- [71] Balaguer, M. D., Vicent, M. T., and Parfs, J. M. (1997) A Comparison of Different Support Materials in Anaerobic Fluidized Bed Reactors for the Treatment of Vinasse, *Environ. Technol.* 18, 539-544
- [72] Parawira, W., Murto, M., Zvauya, R., and Mattiasson, B. (2006) Comparative performance of a UASB reactor and an anaerobic packed-bed reactor when treating potato waste leachate, *Renewable Energy.* 31, 893-903
- [73] Mshandete, A., M. Murto, Kivaisi, A. K., Rubindamayugi, M. S. T., and Mattiasson, B. (2004) Influence of Recirculation Flow Rate On The Performance of Anaerobic Packed-bed Bioreactors Treating Potato-Waste Leachate, *Environ. Technol.* 25, 929-936
- [74] Amorim, A. K. B., Zaiat, M., and Foresti, E. (2005) Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads, *J. Environ. Manage.* 76, 319-325
- [75] Lim, J.-W., Seng, C.-E., Lim, P.-E., Ng, S.-L., and Ahmad Sujari, A.-N. (2011) Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials, *Bioresour. Technol.* 102, 9876-9883

- [76] Fia, F. R. L., Matos, A. T., Borges, A. C., Fia, R., and Cecon, P. R. (2012) Treatment of wastewater from coffee bean processing in anaerobic fixed bed reactors with different support materials: performance and kinetic modeling, *J. Environ. Manage.* 108, 14-21
- [77] Bertin, L. *et al.* (2010) Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon, *Water Res.* 44, 4537-4549
- [78] Sasaki, K., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2006) Archaeal population on supporting material in methanogenic packed-bed reactor, *J. Biosci. Bioeng.* 102, 244-246
- [79] Sasaki, K., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2007) Microbial population in the biomass adhering to supporting material in a packed-bed reactor degrading organic solid waste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 941-952
- [80] Zhang, D. *et al.* (2012) Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5–18 °C) anaerobic fixed-bed reactor, *Bioresour. Technol.* 104, 136-143
- [81] Bertin, L., Colao, M. C., Ruzzi, M., and Fava, F. (2004) Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters, *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 413-423
- [82] Sánchez Riera, F., Valz-Gianinet, S., Callieri, D., and Siñeriz, F. (1982) Use of a packed-bed reactor for anaerobic treatment of stillage of sugar cane molasses, *Biotechnol. Lett.* 4, 127-132
- [83] Abdullah, N., Fulazzaky, M. A., Yong, E. L., Yuzir, A., and Sallis, P. (2016) Assessing the treatment of acetaminophen-contaminated brewery wastewater by an anaerobic packed-bed reactor, *J. Environ. Manage.* 168, 273-279
- [84] Chen, S., Sun, D., and Chung, J. S. (2007) Anaerobic treatment of highly concentrated aniline wastewater using packed-bed biofilm reactor, *Process Biochem.* 42, 1666-1670
- [85] Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., and Mori, S. (2007) Effects of pH and temperature on products and bacterial community in l-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition, *Water Res.* 41, 2636-2642
- [86] Kim, M., Ahn, Y.-H., and Speece, R. E. (2002) Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic, *Water Res.* 36, 4369-4385
- [87] Latif, M. A., Ghufuran, R., Wahid, Z. A., and Ahmad, A. (2011) Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters, *Water Res.* 45, 4683-4699
- [88] Abbasi, T. and Abbasi, S. A. (2012) Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 16, 1696-1708
- [89] Bhunia, P. and Ghangrekar, M. M. (2008) Influence of biogas-induced mixing on granulation in UASB reactors, *Biochem. Eng. J.* 41, 136-141
- [90] Liu, Y., Xu, H.-L., Yang, S.-F., and Tay, J.-H. (2003) Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Water Res.* 37, 661-673
- [91] Guiot, S., Pauss, A., and Costerton, J. (1992) A structured model of the anaerobic granule consortium, *Water Sci. Technol.* 25, 1-10
- [92] Jeong, H. S., Kim, Y. H., Yeom, S. H., Song, B. K., and Lee, S. I. (2005) Facilitated UASB granule formation using organic-inorganic hybrid polymers, *Process Biochem.* 40, 89-94
- [93] Show, K.-Y., Wang, Y., Foong, S.-F., and Tay, J.-H. (2004) Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors, *Water Res.* 38, 2293-2304
- [94] Florencio, L., Field, J. A., and Lettinga, G. (1995) Substrate competition between methanogens and acetogens during the degradation of methanol in UASB reactors, *Water Res.* 29, 915-922

- [95] López-López, A., León-Becerril, E., Rosales-Contreras, M. E., and Villegas-García, E. (2015) Influence of alkalinity and VFAs on the performance of an UASB reactor with recirculation for the treatment of Tequila vinasses, *Environ. Technol.* 36, 2468-2476
- [96] Bhunia, P. and Ghangrekar, M. M. (2008) Effects of cationic polymer on performance of UASB reactors treating low strength wastewater, *Bioresour. Technol.* 99, 350-358
- [97] Ghangrekar, M. M., Asolekar, S. R., and Joshi, S. G. (2005) Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation, *Water Res.* 39, 1123-1133
- [98] Kosaric, N., Blaszczyk, R., and Orphan, L. (1990) Factors influencing formation and maintenance of granules in anaerobic sludge blanket reactors (UASBR), *Water Sci. Technol.* 22, 275-282
- [99] Grotenhuis, J. *et al.* (1991) Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1942-1949
- [100] Schmidt, J. E. and Ahring, B. K. (1996) Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, *Biotechnol. Bioeng.* 49, 229-246
- [101] Waewsak, J. *et al.* (2015) 2015 International Conference on Alternative Energy in Developing Countries and Emerging Economies Effect of Granule Sizes on the Performance of Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors for Cassava Wastewater Treatment, *Energy Procedia.* 79, 90-97
- [102] Nkemka, V. N. and Murto, M. (2013) Biogas production from wheat straw in batch and UASB reactors: the roles of pretreatment and seaweed hydrolysate as a co-substrate, *Bioresour. Technol.* 128, 164-172
- [103] Nkemka, V. N. and Murto, M. (2010) Evaluation of biogas production from seaweed in batch tests and in UASB reactors combined with the removal of heavy metals, *J. Environ. Manage.* 91, 1573-1579
- [104] Kaparaju, P., Serrano, M., and Angelidaki, I. (2010) Optimization of biogas production from wheat straw stillage in UASB reactor, *Appl. Energy.* 87, 3779-3783
- [105] Fang, C., Boe, K., and Angelidaki, I. (2011) Biogas production from potato-juice, a by-product from potato-starch processing, in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) and expanded granular sludge bed (EGSB) reactors, *Bioresour. Technol.* 102, 5734-5741
- [106] Fang, C., Sompong, O., Boe, K., and Angelidaki, I. (2011) Comparison of UASB and EGSB reactors performance, for treatment of raw and deoiled palm oil mill effluent (POME), *J. Hazard. Mater.* 189, 229-234
- [107] Sanchez Riera, F., Cordoba, P., and Siñeriz, F. (1985) Use of the UASB reactor for the anaerobic treatment of stillage from sugar cane molasses, *Biotechnol. Bioeng.* 27, 1710-1716
- [108] Borja, R. and Banks, C. (1994) Anaerobic digestion of palm oil mill effluent using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor, *Biomass Bioenergy.* 6, 381-389
- [109] Cronin, C. and Lo, K. (1998) Anaerobic treatment of brewery wastewater using UASB reactors seeded with activated sludge, *Bioresour. Technol.* 64, 33-38
- [110] Yilmaz, T., Yuceer, A., and Basibuyuk, M. (2008) A comparison of the performance of mesophilic and thermophilic anaerobic filters treating papermill wastewater, *Bioresour. Technol.* 99, 156-163
- [111] Kim, J. K., Oh, B. R., Chun, Y. N., and Kim, S. W. (2006) Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste, *J. Biosci. Bioeng.* 102, 328-332
- [112] Patel, H. and Madamwar, D. (2002) Effects of temperatures and organic loading rates on biomethanation of acidic petrochemical wastewater using an anaerobic upflow fixed-film reactor, *Bioresour. Technol.* 82, 65-71
- [113] Uemura, S. and Harada, H. (2000) Treatment of sewage by a UASB reactor under moderate to low temperature conditions, *Bioresour. Technol.* 72, 275-282
- [114]

- [115] Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., and Lovley, D. R. (2010) Direct Exchange of Electrons Within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria, *Science*. 330, 1413-1415
- [116] Morita, M. *et al.* (2011) Potential for Direct Interspecies Electron Transfer in Methanogenic Wastewater Digester Aggregates, *mBio*. 2, e00159-11
- [117] Rotaru, A.-E. *et al.* (2014) A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane, *Energy & Environmental Science*. 7, 408-415
- [118] Rotaru, A.-E. *et al.* (2014) Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*, *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4599-4605
- [119] Chen, S. *et al.* (2014) Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures, *Bioresour. Technol.* 173, 82-86
- [120] Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2015) Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange, *Environ. Microbiol.* 17, 648-655
- [121] Wang, L.-Y., Nevin, K., Woodard, T. L., Mu, B., and Lovley, D. R. (2016) Expanding the Diet for DIET: Electron Donors Supporting Direct Interspecies Electron Transfer (DIET) in Defined Co-Cultures, *Frontiers in Microbiology*. 7,
- [122] Lovley, D. R. (2016) Happy together: microbial communities that hook up to swap electrons, *The ISME Journal*.
- [123] Adhikari, R. Y., Malvankar, N. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2016) Conductivity of individual *Geobacter pili*, *RSC Advances*. 6, 8354-8357
- [124] Tan, Y. *et al.* (2016) Synthetic biological protein nanowires with high conductivity, *Small*. 12, 4481-4485
- [125] Malvankar, N. S. *et al.* (2015) Structural basis for metallic-like conductivity in microbial nanowires, *MBio*. 6, e00084-15
- [126] Lampa-Pastirk, S. *et al.* (2016) Thermally activated charge transport in microbial protein nanowires, *Scientific reports*. 6, 23517
- [127] Tan, Y. *et al.* (2016) The low conductivity of *Geobacter uraniireducens pili* suggests a diversity of extracellular electron transfer mechanisms in the genus *Geobacter*, *Frontiers in microbiology*. 7,
- [128] Tan, Y. *et al.* (2017) Expressing the *Geobacter metallireducens PiliA* in *Geobacter sulfurreducens* Yields Pili with Exceptional Conductivity, *mBio*. 8, e02203-16
- [129] Lovley, D. R. (2017) Electrically conductive pili: Biological function and potential applications in electronics, *Current Opinion in Electrochemistry*.
- [130] Venkidusamy, K., Megharaj, M., Schröder, U., Karouta, F., Mohan, S. V., and Naidu, R. (2015) Electron transport through electrically conductive nanofilaments in *Rhodospseudomonas palustris* strain RP2, *RSC Advances*. 5, 100790-100798
- [131] Stams, A. J. and Plugge, C. M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea, *Nature Reviews Microbiology*. 7, 568-577
- [132] Schmidt, J. E. and Ahring, B. K. (1995) Interspecies Electron Transfer during Propionate and Butyrate Degradation in Mesophilic, Granular Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2765-2767
- [133] Zhao, Z., Zhang, Y., Li, Y., Dang, Y., Zhu, T., and Quan, X. (2017) Potentially shifting from interspecies hydrogen transfer to direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism to resist acidic impact with conductive carbon cloth, *Chem. Eng. J.* 313, 10-18
- [134] Xu, H., Wang, C., Yan, K., Wu, J., Zuo, J., and Wang, K. (2016) Anaerobic granule-based biofilms formation reduces propionate accumulation under high H₂ partial pressure using conductive carbon felt particles, *Bioresour. Technol.* 216, 677-683

- [135] Zhao, Z., Zhang, Y., Yu, Q., Dang, Y., Li, Y., and Quan, X. (2016) Communities stimulated with ethanol to perform direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate, *Water Res.* 102, 475-484
- [136] Yoda, M., Kitagawa, M., and Miyaji, Y. (1987) Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm, *Water Res.* 21, 1547-1556
- [137] Lu, X., Zhen, G., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., and Li, Y.-Y. (2016) Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on biodegradation behaviors of starch wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, *Bioresour. Technol.* 214, 175-183
- [138] Li, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Quan, X., and Zhao, Z. (2017) Potentially direct interspecies electron transfer of methanogenesis for syntrophic metabolism under sulfate reducing conditions with stainless steel, *Bioresour. Technol.* 234, 303-309
- [139] McCarty, P. L. and McKinney, R. E. (1961) Volatile acid toxicity in anaerobic digestion, *Journal (Water Pollution Control Federation)*. 223-232
- [140] Wolfe, R. and Higgins, I. (1979) Microbial biochemistry of methane-a study in contrasts, *Int. Rev. Biochem.* 21, 267-353
- [141] Yang, Y., Zhang, Y., Li, Z., Zhao, Z., Quan, X., and Zhao, Z. (2017) Adding granular activated carbon into anaerobic sludge digestion to promote methane production and sludge decomposition, *Journal of Cleaner Production.* 149, 1101-1108
- [142] Baek, G., Kim, J., Kim, J., and Lee, C. (2018) Role and potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion, *Energies.* 11, 107
- [143] Zhang, J., Zhao, W., Zhang, H., Wang, Z., Fan, C., and Zang, L. (2018) Recent achievements in enhancing anaerobic digestion with carbon-based functional materials, *Bioresour. Technol.* 266, 555-567
- [144] Lee, J.-Y., Lee, S.-H., and Park, H.-D. (2016) Enrichment of specific electro-active microorganisms and enhancement of methane production by adding granular activated carbon in anaerobic reactors, *Bioresour. Technol.* 205, 205-212
- [145] Zhao, Z. *et al.* (2016) Potential enhancement of direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate with biochar in up-flow anaerobic sludge blanket reactors, *Bioresour. Technol.* 209, 148-156
- [146] Xu, S., He, C., Luo, L., Lü, F., He, P., and Cui, L. (2015) Comparing activated carbon of different particle sizes on enhancing methane generation in upflow anaerobic digester, *Bioresour. Technol.* 196, 606-612
- [147] Yan, W. *et al.* (2017) The role of conductive materials in the start-up period of thermophilic anaerobic system, *Bioresour. Technol.* 239, 336-344
- [148] Lin, R., Cheng, J., Zhang, J., Zhou, J., Cen, K., and Murphy, J. D. (2017) Boosting biomethane yield and production rate with graphene: The potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 239, 345-352
- [149] Tian, T., Qiao, S., Li, X., Zhang, M., and Zhou, J. (2017) Nano-graphene induced positive effects on methanogenesis in anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 224, 41-47
- [150] Dang, Y. *et al.* (2016) Enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with carbon-based conductive materials, *Bioresour. Technol.* 220, 516-522
- [151] Zhao, Z., Li, Y., Quan, X., and Zhang, Y. (2017) Towards engineering application: Potential mechanism for enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with different types of conductive materials, *Water Res.* 115, 266-277
- [152] Lei, Y. *et al.* (2016) Stimulation of methanogenesis in anaerobic digesters treating leachate from a municipal solid waste incineration plant with carbon cloth, *Bioresour. Technol.* 222, 270-276
- [153] Dang, Y., Sun, D., Woodard, T. L., Wang, L.-Y., Nevin, K. P., and Holmes, D. E. (2017) Stimulation of the anaerobic digestion of the dry organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with carbon-based conductive materials, *Bioresour. Technol.*

- [154] Zhuang, L., Tang, J., Wang, Y., Hu, M., and Zhou, S. (2015) Conductive iron oxide minerals accelerate syntrophic cooperation in methanogenic benzoate degradation, *J. Hazard. Mater.* 293, 37-45
- [155] Yang, Z., Guo, R., Shi, X., Wang, C., Wang, L., and Dai, M. (2016) Magnetite nanoparticles enable a rapid conversion of volatile fatty acids to methane, *RSC Advances*. 6, 25662-25668
- [156] Baek, G., Kim, J., Cho, K., Bae, H., and Lee, C. (2015) The biostimulation of anaerobic digestion with (semi) conductive ferric oxides: their potential for enhanced biomethanation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10355-10366
- [157] Luo, C., Lü, F., Shao, L., and He, P. (2015) Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes, *Water Res.* 68, 710-718
- [158] Yamada, C., Kato, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2015) Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate, *J. Biosci. Bioeng.* 119, 678-682
- [159] Hu, Q., Sun, D., Ma, Y., Qiu, B., and Guo, Z. (2017) Conductive polyaniline nanorods enhanced methane production from anaerobic wastewater treatment, *Polymer*. 120, 236-243
- [160] Yin, Q., Yang, S., Wang, Z., Xing, L., and Wu, G. (2018) Clarifying electron transfer and metagenomic analysis of microbial community in the methane production process with the addition of ferroferric oxide, *Chem. Eng. J.* 333, 216-225
- [161] Yin, Q., Miao, J., Li, B., and Wu, G. (2017) Enhancing electron transfer by ferroferric oxide during the anaerobic treatment of synthetic wastewater with mixed organic carbon, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119, 104-110
- [162] Kumar, G., Sivagurunathan, P., Sen, B., Kim, S.-H., and Lin, C.-Y. (2017) Mesophilic continuous fermentative hydrogen production from acid pretreated de-oiled jatropha waste hydrolysate using immobilized microorganisms, *Bioresour. Technol.* 240, 137-143
- [163] Ren, N.-Q., Tang, J., Liu, B.-F., and Guo, W.-Q. (2010) Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth, *Int. J. Hydrogen Energy*. 35, 2807-2813
- [164] APHA (2005) *Standard Methods for the Examination of Water Wastewater*, A. P. H. Association, Washington DC, USA
- [165] Valero, D., Montes, J. A., Rico, J. L., and Rico, C. (2016) Influence of headspace pressure on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests, *Waste Manage.* 48, 193-198
- [166] Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., and Kovács, K. L. (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing, *Biotechnology for biofuels*. 5, 41
- [167] Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., and Li, M. (2013) Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate, *Bioresour. Technol.* 143, 525-530
- [168] van Haandel, A. C. (1994) Influence of the digested COD concentration on the alkalinity requirement in anaerobic digesters, *Water Sci. Technol.* 30, 23
- [169] Van Haandel, A. C. and Lettinga, G. (1994) *Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate*,
- [170] Vázquez, C. E., Macarie, H., Kato, M. T., Vázquez, R. R., and Varaldo, H. M. P. (2001) Resistencia a la exposición al oxígeno de lodos anaerobios suspendidos, *Interciencia*. 26, 547-553
- [171] Alzate-Gaviria, L. M., Pérez-Hernández, A., Nevárez Moorillón, V., Rinderknecht Seijas, N., and Poggi Veraldo, H. (2003) Comparación de dos sistemas anaerobios acoplados para la biometanización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, *Interciencia*. 28, 436-442

- [172] Rohlf, F. (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1, Applied Biostatistics, NY.
- [173] Ibarra-Mendivil, M., Gallardo-Navarro, Y., Torres, P., and Ramírez Wong, B. (2008) Effect of processing conditions on instrumental evaluation of nixtamal hardness of corn, *Journal of texture studies*. 39, 252-266
- [174] R. Krishnan, R. R., N. Salinas, C. Durán-de-Bazúa (1998) Treatment of Maize Processing Industry Wastewater by Percolating Columns, *Environ. Technol.* 19:4, 417-424
- [175] García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., and López-López, A. (2017) A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum, *Int. J. Hydrogen Energy*. 42, 5820-5831
- [176] López-Maldonado, E. A., Oropeza-Guzmán, M. T., and Suárez-Meraz, K. A. (2017) Integral use of Nejayote: Characterization, new strategies for physicochemical treatment and recovery of valuable by-products, *Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery*. 239
- [177] Reinhart, D. R. and Basel Al-Yousfi, A. (1996) The impact of leachate recirculation on municipal solid waste landfill operating characteristics, *Waste Manage. Res.* 14, 337-346
- [178] Souza, M., Fuzaro, G., and Polegato, A. (1992) Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor, *Water Sci. Technol.* 25, 213-222
- [179] Nogueira-Terrones, H., Herman-Lara, E., Garcia-Alvarado, M., and Monroy-Rivera, J. (2004) Drying kinetics and sorption isotherms of the Nejayote, *Drying Technol.* 22, 2173-2182
- [180] Ye Chen, J. J. C., Kurt S. Creamer (2007) Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresour. Technol.* 4044-4064
- [181] Singh, R. P., Kumar, S., and Ojha, C. S. P. (1999) Nutrient requirement for UASB process: a review, *Biochem. Eng. J.* 3, 35-54
- [182] O'Reilly, C. and Colleran, E. (2006) Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on mesophilic anaerobic reactor biomass populations: physico-chemical and microbiological properties, *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 141-153
- [183] Li, Y. *et al.* (2013) Influence of Inoculum Source and Pre-incubation on Bio-Methane Potential of Chicken Manure and Corn Stover, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 117-127
- [184] Gerardi, M. H. (2003) The microbiology of anaerobic digesters,
- [185] Lettinga, G. *et al.* (1983) Design operation and economy of anaerobic treatment, *Water Sci. Technol.* 15, 177-195
- [186] Parker, R. and Tinsley, C. (1976) Electrical conduction in magnetite, *physica status solidi* (a). 33, 189-194
- [187] Zhou, G.-W. *et al.* (2017) Biochar addition increases the rates of dissimilatory iron reduction and methanogenesis in ferrihydrite enrichments, *Frontiers in microbiology*. 8,
- [188] Browne, J. D., Allen, E., and Murphy, J. D. (2013) Evaluation of the biomethane potential from multiple waste streams for a proposed community scale anaerobic digester, *Environ. Technol.* 34, 2027-2038
- [189] Kafle, G. K. and Chen, L. (2016) Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models, *Waste Manage.* 48, 492-502
- [190] Yoon, Y., Lee, S., Kim, K., Jeon, T., and Shin, S. (2017) Study of anaerobic co-digestion on wastewater treatment sludge and food waste leachate using BMP test, *J. Mater. Cycles Waste Manage.* 1-10
- [191] Kafle, G. K., Kim, S. H., and Sung, K. I. (2013) Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of biochemical methane potential (BMP) and kinetics, *Bioresour. Technol.* 127, 326-336
- [192] Hirano, S., Matsumoto, N., Morita, M., Sasaki, K., and Ohmura, N. (2013) Electrochemical control of redox potential affects methanogenesis of the

- hydrogenotrophic methanogen *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 315-321
- [193] Salvador, A. F. *et al.* (2017) Carbon nanotubes accelerate methane production in pure cultures of methanogens and in a syntrophic coculture, *Environ. Microbiol.* 19, 2727-2739
- [194] Thrash, J. C. and Coates, J. D. (2008) Direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism, *Environ. Sci. Technol.* 42, 3921-3931
- [195] Xu, X., Shao, J., Li, M., Gao, K., Jin, J., and Zhu, L. (2016) Reductive Transformation of p-chloronitrobenzene in the upflow anaerobic sludge blanket reactor coupled with microbial electrolysis cell: performance and microbial community, *Bioresour. Technol.* 218, 1037-1045
- [196] Wang, D., Han, H., Han, Y., Li, K., and Zhu, H. (2017) Enhanced treatment of Fischer-Tropsch (FT) wastewater using the up-flow anaerobic sludge blanket coupled with bioelectrochemical system: Effect of electric field, *Bioresour. Technol.* 232, 18-26
- [197] Huang, Y.-X., Guo, J., Zhang, C., and Hu, Z. (2016) Hydrogen production from the dissolution of nano zero valent iron and its effect on anaerobic digestion, *Water Res.* 88, 475-480
- [198] Xia, S. *et al.* (2011) Bioreduction of para-chloronitrobenzene in drinking water using a continuous stirred hydrogen-based hollow fiber membrane biofilm reactor, *J. Hazard. Mater.* 192, 593-598
- [199] Hodgson, D. M. *et al.* (2016) Segregation of the anodic microbial communities in a microbial fuel cell cascade, *Frontiers in microbiology.* 7, 699
- [200] Toczyłowska-Mamińska, R. *et al.* (2018) Evolving Microbial Communities in Cellulose-Fed Microbial Fuel Cell, *Energies.* 11, 124
- [201] Guo, K. *et al.* (2015) Heat-treated stainless steel felt as scalable anode material for bioelectrochemical systems, *Bioresour. Technol.* 195, 46-50
- [202] Wu, D., Wang, T., Huang, X., Dolfig, J., and Xie, B. (2015) Perspective of harnessing energy from landfill leachate via microbial fuel cells: novel biofuels and electrogenic physiologies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7827-7836
- [203] Holmes, D. E., Nevin, K. P., Woodard, T. L., Peacock, A. D., and Lovley, D. R. (2007) *Prolixibacter bellariivorans* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum Bacteroidetes, isolated from a marine-sediment fuel cell, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 701-707
- [204] Huang, L., Jiang, L., Wang, Q., Quan, X., Yang, J., and Chen, L. (2014) Cobalt recovery with simultaneous methane and acetate production in biocathode microbial electrolysis cells, *Chem. Eng. J.* 253, 281-290
- [205] Wang, A., Liu, L., Sun, D., Ren, N., and Lee, D.-J. (2010) Isolation of Fe (III)-reducing fermentative bacterium *Bacteroides* sp. W7 in the anode suspension of a microbial electrolysis cell (MEC), *Int. J. Hydrogen Energy.* 35, 3178-3182
- [206] Zhao, Z., Zhang, Y., Quan, X., and Zhao, H. (2016) Evaluation on direct interspecies electron transfer in anaerobic sludge digestion of microbial electrolysis cell, *Bioresour. Technol.* 200, 235-244
- [207]
- [208] Lovley, D. R. and Phillips, E. J. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480
- [209] Kamagata, Y. *et al.* (1992) Characterization of three thermophilic strains of *Methanothermobacter* ("Methanosaeta") *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanothermobacter* ("Methanosaeta") *thermoacetophila*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42, 463-468
- [210] Sanchez-Gonzalez, M., Blanco-Gamez, A., Escalante, A., Valladares, A., Olvera, C., and Parra, R. (2011) Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic *Bacillus*

- flexus strains from maize processing waste water (nejayote), *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 413-419
- [211] Demirel, B. and Yenigün, O. (2002) Two-phase anaerobic digestion processes: a review, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology.* 77, 743-755
- [212] Parawira, W., Murto, M., Read, J., and Mattiasson, B. (2005) Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste, *Process Biochem.* 40, 2945-2952
- [213] Infantes, D., Del Campo, A. G., Villaseñor, J., and Fernández, F. (2011) Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation, *Int. J. Hydrogen Energy.* 36, 15595-15601
- [214] Warnecke, T. and Gill, R. T. (2005) Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications, *Microbial cell factories.* 4, 25
- [215] Wang, K., Yin, J., Shen, D., and Li, N. (2014) Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH, *Bioresour. Technol.* 161, 395-401
- [216] Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., de Goñi, J. G.-M., and Esteban-Gutiérrez, M. (2017) Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence, *Bioresour. Technol.* 244, 1081-1088
- [217] Van der Zee, F., Villaverde, S., Garcia, P., and Polanco, F. F.-. (2007) Sulfide removal by moderate oxygenation of anaerobic sludge environments, *Bioresour. Technol.* 98, 518-524
- [218] Zhou, W., Imai, T., Ukita, M., Li, F., and Yuasa, A. (2007) Effect of limited aeration on the anaerobic treatment of evaporator condensate from a sulfite pulp mill, *Chemosphere.* 66, 924-929
- [219] Krayzelova, L., Bartacek, J., Kolesarova, N., and Jenicek, P. (2014) Microaeration for hydrogen sulfide removal in UASB reactor, *Bioresour. Technol.* 172, 297-302
- [220] Zitomer, D. and Shrout, J. (1998) Feasibility and benefits of methanogenesis under oxygen-limited conditions, *Waste Manage.* 18, 107-116
- [221] Sawatdeenarunat, C., Sung, S., and Khanal, S. K. (2017) Enhanced volatile fatty acids production during anaerobic digestion of lignocellulosic biomass via micro-oxygenation, *Bioresour. Technol.* 237, 139-145
- [222] Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J., and Gao, L. (2009) Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges, *Biotechnol. Adv.* 27, 1051-1060
- [223] Liu, C.-G., Xue, C., Lin, Y.-H., and Bai, F.-W. (2013) Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations, *Biotechnol. Adv.* 31, 257-265
- [224] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., and Rodwell, V. W. (2003) a LANGE medical book, *Harper's Illustrated Biochemistry.* 26th ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- [225] Gerardi, M. H. (2006) *Wastewater bacteria,*
- [226] Zhao, Z., Li, Y., Quan, X., and Zhang, Y. (2017) New Application of Ethanol-Type Fermentation: Stimulating Methanogenic Communities with Ethanol to Perform Direct Interspecies Electron Transfer, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* 5, 9441-9453
- [227] Capson-Tojo, G., Rouez, M., Crest, M., Steyer, J.-P., Delgenes, J.-P., and Escudie, R. (2016) Food waste valorization via anaerobic processes: a review, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 15, 499-547
- [228] Wang, G., Mu, Y., and Yu, H.-Q. (2005) Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater, *Biochem. Eng. J.* 23, 175-184
- [229] Banerjee, A., Elefsiniotis, P., and Tuhtar, D. (1998) Effect of HRT and temperature on the acidogenesis of municipal primary sludge and industrial wastewater, *Water Sci. Technol.* 38, 417-423

- [230] Chen, Y., Luo, J., Yan, Y., and Feng, L. (2013) Enhanced production of short-chain fatty acid by co-fermentation of waste activated sludge and kitchen waste under alkaline conditions and its application to microbial fuel cells, *Appl. Energy*. 102, 1197-1204
- [231] Jing, Y., Wan, J., Angelidaki, I., Zhang, S., and Luo, G. (2017) iTRAQ quantitative proteomic analysis reveals the pathways for methanation of propionate facilitated by magnetite, *Water Res.* 108, 212-221
- [232] Barua, S., Zakaria, B. S., and Dhar, B. R. (2018) Enhanced methanogenic co-degradation of propionate and butyrate by anaerobic microbiome enriched on conductive carbon fibers, *Bioresour. Technol.* 266, 259-266
- [233] Lei, Y. *et al.* (2018) Magnetite enhances anaerobic digestion and methanogenesis of fresh leachate from a municipal solid waste incineration plant, *Chem. Eng. J.* 348, 992-999
- [234] Zhang, J., Zhang, L., Loh, K.-C., Dai, Y., and Tong, Y. W. (2017) Enhanced anaerobic digestion of food waste by adding activated carbon: Fate of bacterial pathogens and antibiotic resistance genes, *Biochem. Eng. J.* 128, 19-25
- [235] Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., and Ahmad Asad, S. (2014) Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis, *The Scientific World Journal*. 2014,
- [236] Allison, M. J., Mayberry, W. R., Mcsweeney, C. S., and Stahl, D. A. (1992) *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols, *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 522-529
- [237] Baena, S. *et al.* (1998) *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge, *Anaerobe*. 4, 241-250
- [238] Li, L.-L., Tong, Z.-H., Fang, C.-Y., Chu, J., and Yu, H.-Q. (2015) Response of anaerobic granular sludge to single-wall carbon nanotube exposure, *Water Res.* 70, 1-8
- [239] Wiegel, J., Tanner, R., and Rainey, F. A. (2006) An introduction to the family Clostridiaceae, *The prokaryotes: volume 4: bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 654-678
- [240] Plugge, C. M., Balk, M., and Stams, A. J. (2002) *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-oxidizing, spore-forming bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 391-399
- [241] Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., and Harada, H. (2002) *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1729-1735
- [242] Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J., and Plugge, C. M. (2010) Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms, *Environmental microbiology reports*. 2, 489-499
- [243] Smith, K. S. and Ingram-Smith, C. (2007) *Methanosaeta*, the forgotten methanogen?, *Trends Microbiol.* 15, 150-155
- [244] Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Cayol, J.-L., Joulian, C., and Hirschler-Rea, A. (2004) *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an n-alkane- and n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 77-83
- [245] Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., and Lory, S. (2013) *The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry*,
- [246] Kato, S., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2012) Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals, *Environ. Microbiol.* 14, 1646-1654
- [247] Pereira, F. L. *et al.* (2016) Complete genome sequence of *Peptoclostridium difficile* strain Z31, *Gut pathogens*. 8, 11
- [248] Öztürk, M. (1991) Conversion of acetate, propionate and butyrate to methane under thermophilic conditions in batch reactors, *Water Res.* 25, 1509-1513
- [249] Felchner-Zwirello, M., Winter, J., and Gallert, C. (2013) Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9193-9205

- [250] Wall, J. D., Harwood, C. S., and Demain, A. L. (2008) *Bioenergy*,
- [251] Deppenmeier, U. (2002) The unique biochemistry of methanogenesis,
- [252] Xu, Z., Zhao, M., Miao, H., Huang, Z., Gao, S., and Ruan, W. (2014) In situ volatile fatty acids influence biogas generation from kitchen wastes by anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 163, 186-192
- [253] Nagarajan, V. and Chandiramouli, R. (2018) Investigation of NH₃ adsorption behavior on graphdiyne nanosheet and nanotubes: A first-principles study, *J. Mol. Liq.* 249, 24-32

Anexo I Análisis de hidrólisis en APBR con y sin microaireación en las primeras 24 horas

AGV y pH

En la figura A.1.1 se puede observar la evolución de los AGV y el pH durante las primeras 24 horas. Ambos APBR se mantienen en valores de pH entre 6.5 y 7.5 durante las primeras 13 horas. Esto concuerda con una concentración de AGV constante en los reactores. A partir de las 15 horas de ensayo, el pH desciende a valores inferiores a 6.25 en ambos, coincidiendo con un aumento en la concentración de AGV. Entre las 18 y 24 horas el pH se mantiene entre 5.8 y 6 para ambos APBR. Este rango de pH ha sido demostrado como óptimo para la generación de AGV [167]. Esto es corroborado con los resultados presentados en la figura A.1.1.

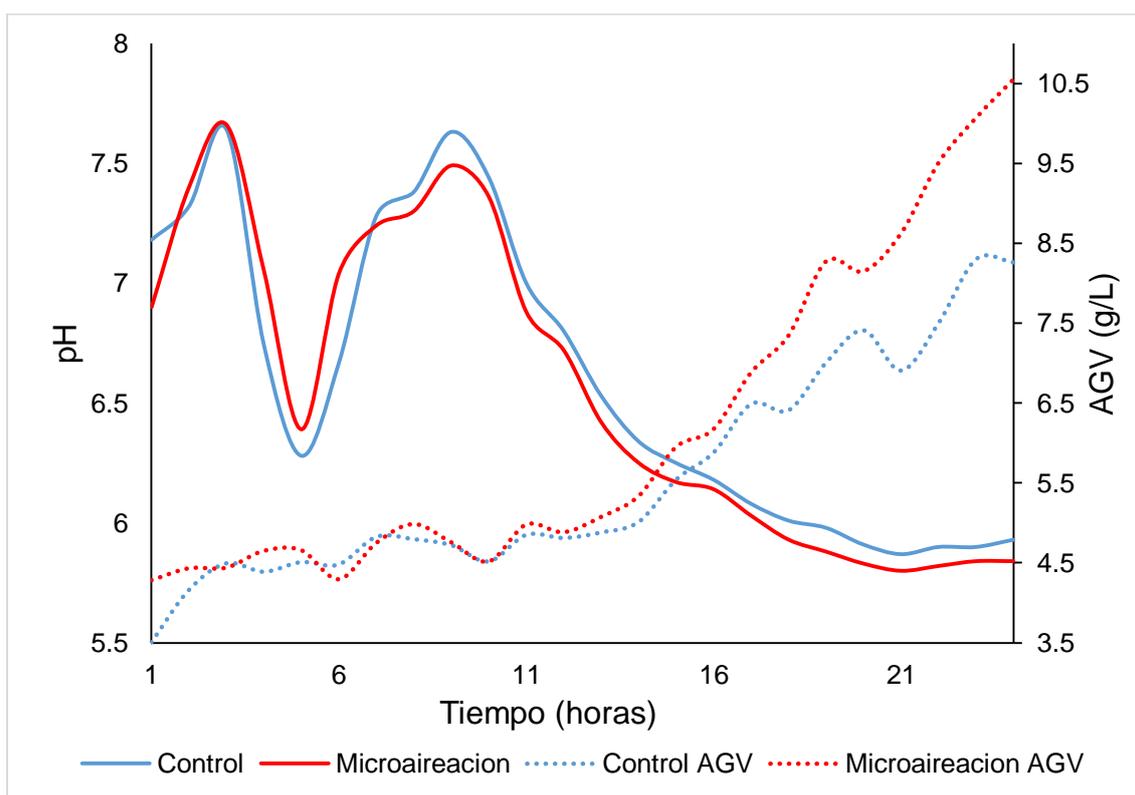


Figura A.1.1 Concentración de AGV y pH en APBR sin microaireación y con microaireación durante 24 horas

El nejayote es un residuo industrial muy variable en sus características fisicoquímicas [26,28,32]. Sus características fisicoquímicas son altamente dependientes tanto del

proceso de nixtamalización como del posterior manejo del propio nejayote [1]. En la figura A.1.2 se observa que la concentración de AGV inicia entre 4 y 4.2 g/L en los reactores. A partir de las 14 y 13 horas de ensayo se superaron los 5 g/L de AGV en RC y RM respectivamente. El incremento de la acidogénesis en RM con respecto a RC se hace más notable a partir de las 18 horas de experimentación. En este momento la diferencia entre RM y RC en la concentración de AGV es de 1 g/L. Al final de la experimentación, las concentraciones de AGV fueron 8.3 y 10.5 g/L para RC y RM respectivamente. Los resultados muestran que la microaireación aumenta un 51 % el proceso de acidogénesis tras 24 horas de ensayo. La figura A.1.2 muestra que el ácido acético compone el 100 % de los AGV al inicio del ensayo, a las 11 horas empezó a producirse ácido butírico. A partir de las 15 horas hasta el final del ensayo se generó el mayor incremento en la concentración de AGV en RC y RM. La concentración de ácido acético pasa de 4 g/L a 6.5 y 7.2 g/L para RC y RM respectivamente. Por otro lado, el ácido butírico producido durante la acidogénesis en RC fue 1.72 g/L, mientras en RM la concentración final de ácido butírico fue 3.43 g/L.

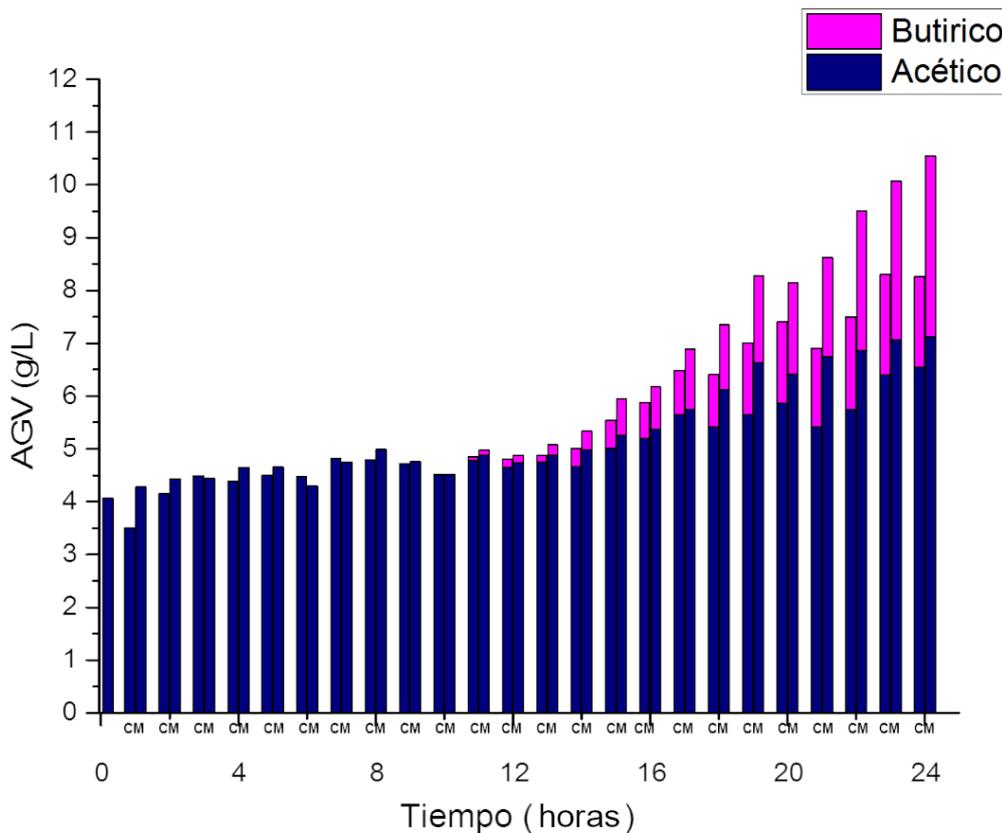


Figura A.1.2 Concentración de los diferentes AGV en APBR sin microaireación (C) y con microaireación (M) durante 24 horas

En las primeras 24 horas la composición de AGV producidos fue de ácido acético y ácido butírico, sin presencia de ácido propiónico. El ácido acético es considerado un precursor directo para la producción de metano [11], la generación del mismo en ambos reactores, sobre todo en RM en el cual se generó 0.7 g/L más que en RC, es beneficiosa para su rápida degradación en el reactor metanogénico, una vez el APBR se conecte al UASB. La transformación de ácido butírico en ácido acético para su posterior conversión en metano es más sencilla que la del ácido propiónico en base a su ΔG [248]. Por lo tanto, la degradación de estos AGV en el reactor metanogénico no supone una gran dificultad al no contar con la presencia de ácido propiónico.

Es interesante conocer que parte de la DQO son AGV, para concretar la eficiencia de la acidogénesis tanto en RC como en RM. La DQO inicial en ambos APBR fue 19.95 g/L y la final 17.92 g/L y 18.12 g/L para RC y RM respectivamente. Al inicio de la experimentación los AGV representaban un 20.44 % del total de la DQO. Una vez transcurridas las 24 horas del ensayo este porcentaje se incrementó al 46.31 % y 57.95 % para RC y RM respectivamente. Este dato corrobora la mejora producida en la hidrólisis y acidogénesis por la aplicación de la microaireación en un residuo complejo como el nejayote.

En la figura A.1.3 se observa las evoluciones del porcentaje de hidrógeno en el biogás y la del potencial de oxidación reducción, y el efecto que tienen las inyecciones de aire en RM.

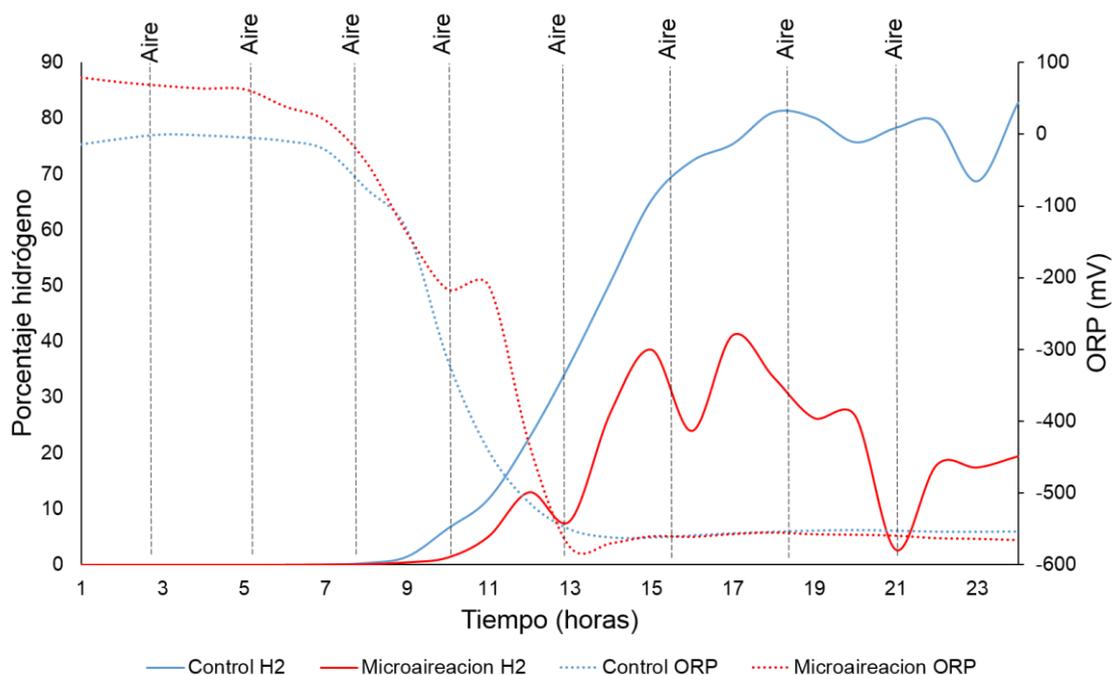


Figura A.1.3 Porcentaje de hidrógeno en la composición del biogás y potencial de oxidación reducción (ORP) en los APBR con y sin microaireación durante el ensayo de 24 horas

El potencial de oxidación reducción se mantiene en RM en valores más elevados que en RC durante las primeras 12 horas, antes de que se empiecen a producir los AGV. La adición de oxígeno provoca un aumento del potencial de oxidación reducción debido al ORP específico del oxígeno/agua [223], manteniendo un ambiente microaerobio. El comienzo de las fases hidrolítica y acidogénica provoca una disminución del potencial de oxidación reducción a valores inferiores a -550 mV en RC y RM. La concentración de hidrógeno en RC aumentó a partir de las 9 horas de experimentación, coincidiendo con el incremento en la generación de AGV. A las 14 horas de experimentación el porcentaje de hidrógeno en RC es superior al 50 % alcanzando el 80 % a las 18 horas. En cambio, la concentración del hidrógeno en RM se ve influenciada por las inyecciones de aire, la cual nunca alcanza el 40 %. A las 21 horas de experimentación, la inyección de aire coincide con la medición de hidrógeno en el cromatógrafo. En este punto la concentración de hidrógeno registrada por el análisis cromatográfico es 2.7 %, siendo un 26 % una hora antes. El oxígeno introducido en el reactor reacciona inmediatamente con el hidrógeno formando H_2O_2 , $\cdot OH$ y H_2O [10], reduciendo la concentración del hidrógeno generado por los procesos de hidrólisis y acidogénesis.

Anexo II Recuperación UASB control y UASB DIET

AGV, alcalinidad y pH

Los principales indicadores para saber si un reactor sea recuperado son la concentración de AGV, el pH y la relación AGV/alcalinidad presente en el reactor [180]. En la figura A.2.1 se muestra el proceso de degradación de los AGV, el incremento de la alcalinidad y la evolución del pH durante el periodo de recuperación del UASB control y UASB DIET. El UASB control se consideró recuperado el día 58, presentando concentración de AGV de 1.5 g/L, pH 7.75, alcalinidad 4.5 g/L y una relación AGV/alcalinidad de 0.33. En cambio, la recuperación del UASB DIET se produjo a los 30 días. El UASB DIET presentaba una concentración de AGV de 1.5 g/L, pH 7.99, alcalinidad 4.8 g CaCO₃/L y una relación de AGV/alcalinidad de 0.33. Según la literatura, un reactor está recuperado y en buenas condiciones operativas cuando los AGV son igual o inferiores a 1.5 g/L y la relación AGV/alcalinidad es menor a 0.5 [95,171]. El reactor control mostraba una concentración de AGV de 5.6 g/L, alcalinidad 3.3 g CaCO₃/L, pH 7.37 y relación AGV/alcalinidad de 1.73 a los 30 días, cuando el UASB DIET estaba ya recuperado. El adiconamiento de CAG redujo el tiempo de recuperación del UASB de 58 a 30 días, siendo este prácticamente la mitad de tiempo necesario para considerar el reactor recuperado. Dang y colaboradores [150] reportaron una disminución del periodo de recuperación de 14 días entre el reactor DIET y el reactor control. El proceso de degradación de AGV es diferente para cada AGV, guardando siempre ciertas similitudes entre ellos. El propionato solo puede ser degradado por la asociación sintrófica entre bacterias. En una relación sintrófica la distancia entre las bacterias es un factor clave. El rendimiento en la oxidación del propionato es más efectivo cuanto menor sea la distancia entre las bacterias participantes en el proceso. Esto es debido a que el flujo de moléculas de hidrogeno transportadoras de electrones es mayor al encontrarse las bacterias más próximas [249]. El inóculo del UASB control puede presentar problemas de distancia entre bacterias, ya que no se trata de un fango granulado en el cual la distancia entre las bacterias es corta por la formación de gránulos. En el reactor UASB DIET esta problemática es solucionada con la biopelícula formada en el CAG. En el UASB DIET el CAG actua como medio transportador de electrones, el flujo de electrones es mucho más efectivo entre las bacterias fermentativas oxidantes de propionato y las arqueas reductoras de dióxido de carbono. Esta mejora en la relación sintrófica necesaria para degradar propionato, es una de las razones de la diferencia en el tiempo de degradación de los AGV entre el UASB control y el UASB DIET.

Otro factor a tener en cuenta es el crecimiento de los microorganismos encargados de degradar el propionato, estas bacterias degradadoras de propionato tienen el crecimiento más lento entre las bacterias degradadoras de AGV [250]. La cantidad de biomasa inicial en los reactores de este estudio fue baja (4.77 kg SSV/m³), al tener una densidad baja de microorganismos y estos presentar un crecimiento lento, provoca una recuperación más lenta en el UASB control.

La presión parcial de hidrógeno es otro factor clave en la acumulación de ácido propiónico. Es esencial mantener una baja presión parcial de hidrógeno a través de las metanogénicas consumidoras de hidrógeno [243]. Un balance entre los microorganismos productores de hidrógeno y los consumidores de hidrógeno es totalmente necesario para mantener la presión parcial de hidrógeno en condiciones óptimas para la oxidación del ácido propiónico. Cuando el sistema no está balanceado, la presión parcial de hidrógeno se incrementa dando lugar a la acumulación de ácido propiónico. En la figura A.2.1 se observa una concentración inicial de AGV 2 g/L superior en el UASB control que en el UASB DIET, siendo la presión parcial de hidrógeno una de las posibles razones de la mayor acumulación de AGV durante el periodo final de alimentación de ambos UASB. En el caso del UASB DIET, la degradación de ácido propiónico no la realizan principalmente bacterias hidrogenotróficas, en este caso la transferencia de electrones es directa sin moléculas de hidrógeno como mediadoras.

Ha sido demostrado que DIET es termodinámicamente más favorable que IHT [143]. Los valores de energía libre de Gibbs en la degradación del propionato son 72.7 kJ/mol y -26.4kJ/mol para IHT y DIET respectivamente a 37 °C y pH 7 [231]. El UASB DIET cambia la vía de transporte de electrones de IHT a DIET posibilitando un incremento en la oxidación del propionato y con ello disminuyendo los AGV totales de forma más rápida, como se observa en este estudio.

Existen dos principales vías por las que se puede desarrollar la metanogénesis; metanogénesis acetoclástica y metanogénesis hidrogenotrófica [251]. Las arqueas metanogénicas acetoclásticas son más sensibles a la acumulación de ácido acético, esto es debido a que las metanogénicas hidrogenotróficas pueden estabilizar el proceso de digestión anaerobia consumiendo H⁺ [252]. *Methanosaeta* y *Methanosarcina* son las metanogénicas acetoclásticas con la capacidad de emplear acetato como sustrato en la producción de metano. Adicionalmente, *Methanosaeta* es la arquea metanogénica más abundante en la Tierra [243]. Esto coincide con el análisis de comunidades de microorganismos realizado a partir de las muestras del ensayo BMP con CAG. En ese ensayo se utilizó el mismo inóculo que el introducido en los reactores UASB control y UASB DIET. *Methanosaeta* fue detectada como la arquea más abundante tanto en el lodo (78 %) como en la biopelícula del CAG (89 %). El incremento en la concentración

de AGV en UASB control, unido a la mayor sensibilidad al ácido acético de las arqueas acetoclásticas (*Methanosaeta*) [252] presentes en el UASB control, es otro factor que ha retrasado la recuperación del reactor control.

DIET se produce por la relación sintrófica entre bacterias exoelectrogénicas y arquea electrotróficas [23]. *Methanosaeta* ha sido ampliamente reportada arquea electrotrófica en la reducción de dióxido de carbono a metano [24]. En la biopelícula formada en el CAG del reactor UASB DIET, *Methanosaeta* tiene un cambio de rol y pasa de ser una arquea consumidora de acetato a una arquea electrotrófica participante en DIET. Por otra parte, mientras en el UASB control *Methanosaeta* tiene problemas de inhibición por la acumulación de ácido acético, esta misma en el reactor UASB DIET no tiene problemas de inhibición al cambiar su rol. En la figura A.2.1 se puede observar un descenso continuo de los AGV hasta llegar a 0, lo que indica un buen funcionamiento del consorcio de microorganismos desarrollados en el CAG.

Remoción DQO

En la figura A.2.2 se observa la concentración de DQO a la salida de los reactores durante el periodo de recuperación.

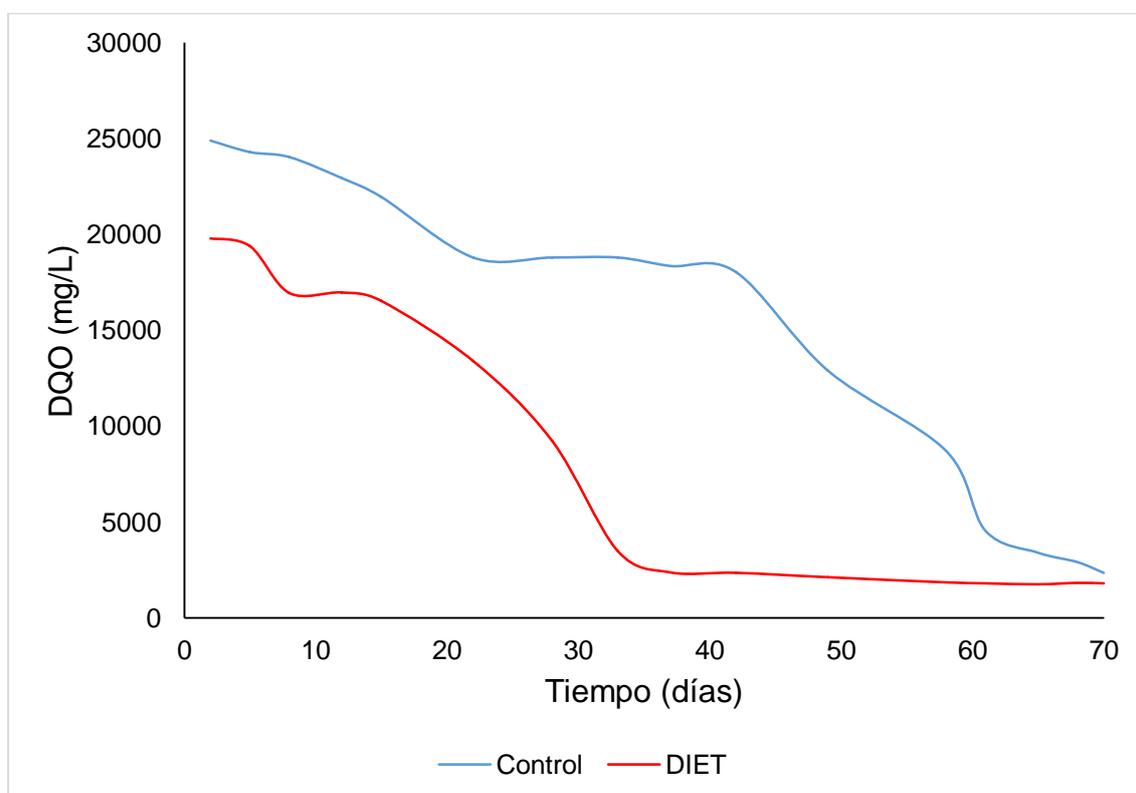


Figura A.2.2 Concentración de DQO en UASB control y UASB DIET en la fase de recuperación

La DQO en el UASB DIET desciende de forma constante hasta valores en torno a 2.2 g/L, manteniéndose constante en esos valores desde el día 37. Por el contrario, la DQO en el UASB control tuvo concentraciones superiores a 18 g/L hasta el día 42. El día 49 de experimentación se registró un descenso drástico en la concentración de DQO, pasando de 18 g/L a 12.9 g/L en 7 días. La diferencia en el rendimiento de remoción de DQO entre los reactores se debe a las ventajas mencionadas anteriormente en la degradación de AGV, al promocionarse el DIET a través del CAG y el consorcio de microorganismos desarrollados en el mismo. El día 70 de experimentación se registraron DQO similares tanto el reactor UASB DIET como en el reactor control, 1.8 g/L y 2.3 g/L respectivamente.

Nitrógeno total y fosfatos

La concentración de nitrógeno total y fosfatos se muestra en la figura A.2.3. Los valores de fosfatos son superiores, en los primeros 20 días, en el UASB control que en el UASB DIET. A partir del día 20 la concentración de fosfatos permanece constante en torno a 200 mg/L en ambos UASB.

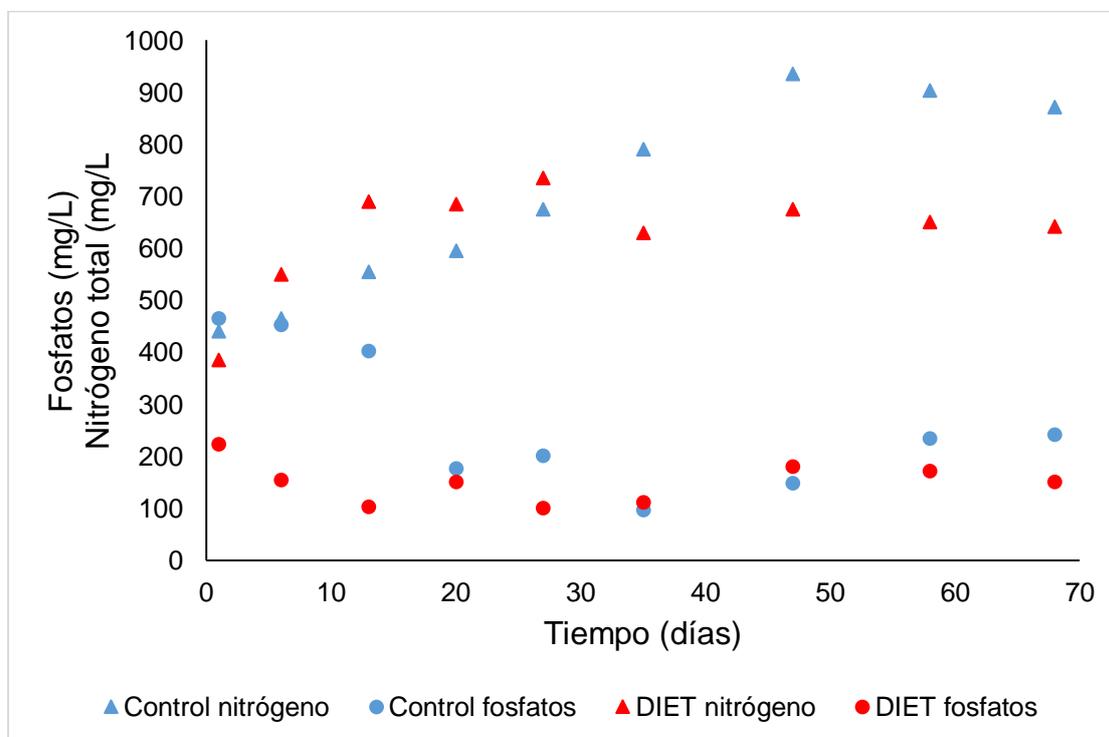


Figura A.2.3 Concentración de DQO en UASB control y UASB DIET en la fase de recuperación

La concentración de nitrógeno total se mantiene entre valores de 385 y 735 mg/L en UASB DIET. Por el contrario, el nitrógeno total está aumentando continuamente en el UASB control, hasta alcanzar 935 mg/L el día 47 de experimentación. La literatura recomienda concentraciones de nitrógeno total entre 200 y 1,000 mg/L para el buen funcionamiento del reactor [181], estando la concentración del UASB control cerca del límite superior recomendado. Los materiales de carbono han sido reportados con capacidad para absorber amonio, en concreto CAG puede reducir la concentración de amonio en el interior del reactor reduciendo la toxicidad del mismo [253]. Este efecto del CAG, unido a un mayor consumo de los nutrientes en UASB DIET, al tener una cinética más rápida el consorcio microbiano, provocan que el valor de nitrógeno total no fuera tan elevado como en el UASB control.

Rendimiento de metano

El segundo día de experimentación se añadieron 5 gramos de bicarbonato de sodio a al UASB control y al UASB DIET. Este hecho produjo un efecto beneficioso en ambos UASB. La generación de metano comenzó a partir del tercer día. En el UASB control el rendimiento de metano fue $0.08 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día})$, en cambio en el UASB DIET alcanzó un valor de $0.45 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día})$ (figura A.2.4). Desde el cuarto día de monitoreo en el UASB control no hubo ningún registro de producción de metano, la cual volvió a comenzar el día 12. En contraste, el rendimiento de metano en el UASB DIET fue siempre superior a $0.1 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día})$. En el día 30 de experimentación el rendimiento de metano en el UASB DIET alcanzó el valor de $0.52 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día})$, mientras el UASB control no superó $0.28 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día})$ en todo el ensayo. El rendimiento de metano decreció en UASB DIET a partir del día 30 al empezar a agotarse la fuente de carbono disponible en el mismo. En la figura A.2.4 se observa que el UASB control incrementa su rendimiento de metano a partir del día 42 alcanzando su máximo el día 56, siendo este $0.37 \text{ L CH}_4/(\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día})$. La evolución del contenido de metano del biogás en los reactores se puede observar en la figura A.2.5. El porcentaje de metano en el UASB DIET fue superior al 60 % desde el segundo día, con un promedio a lo largo de los primeros 50 días del 78.49 % llegando su concentración máxima a valores superiores al 90 % de metano.

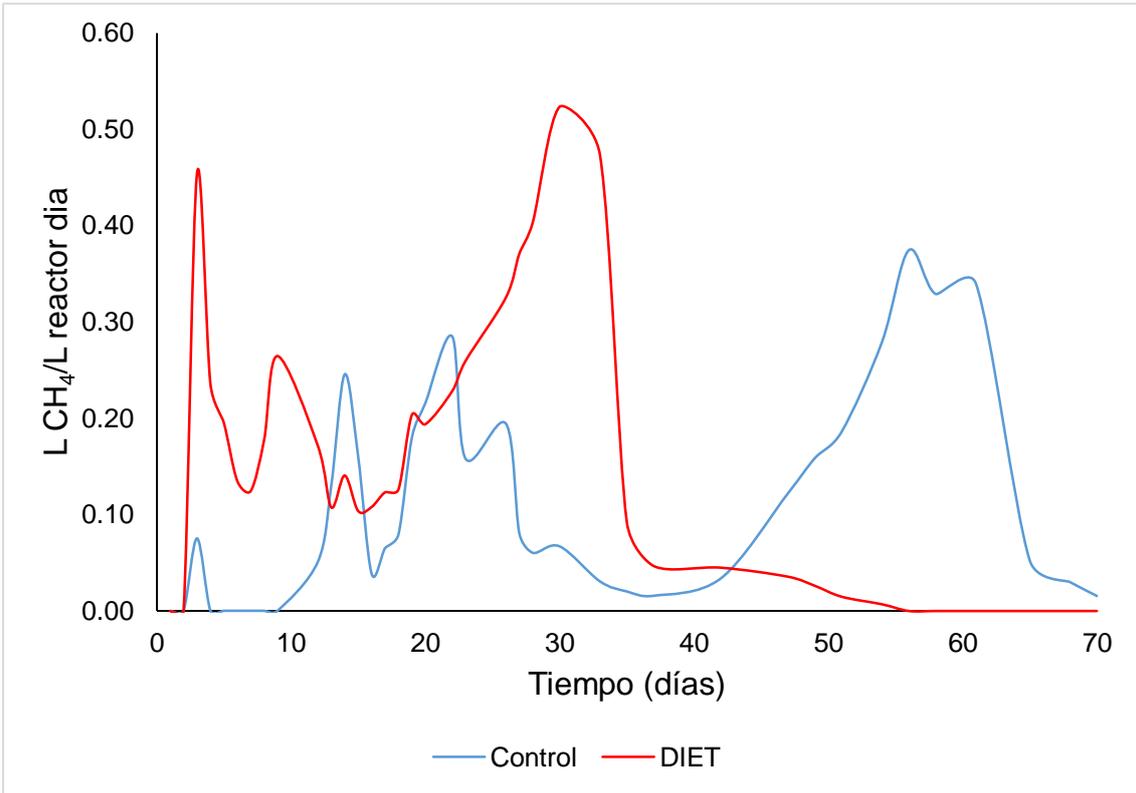


Figura A.2.4 Rendimiento de metano en UASB control y UASB DIET en la fase de recuperación

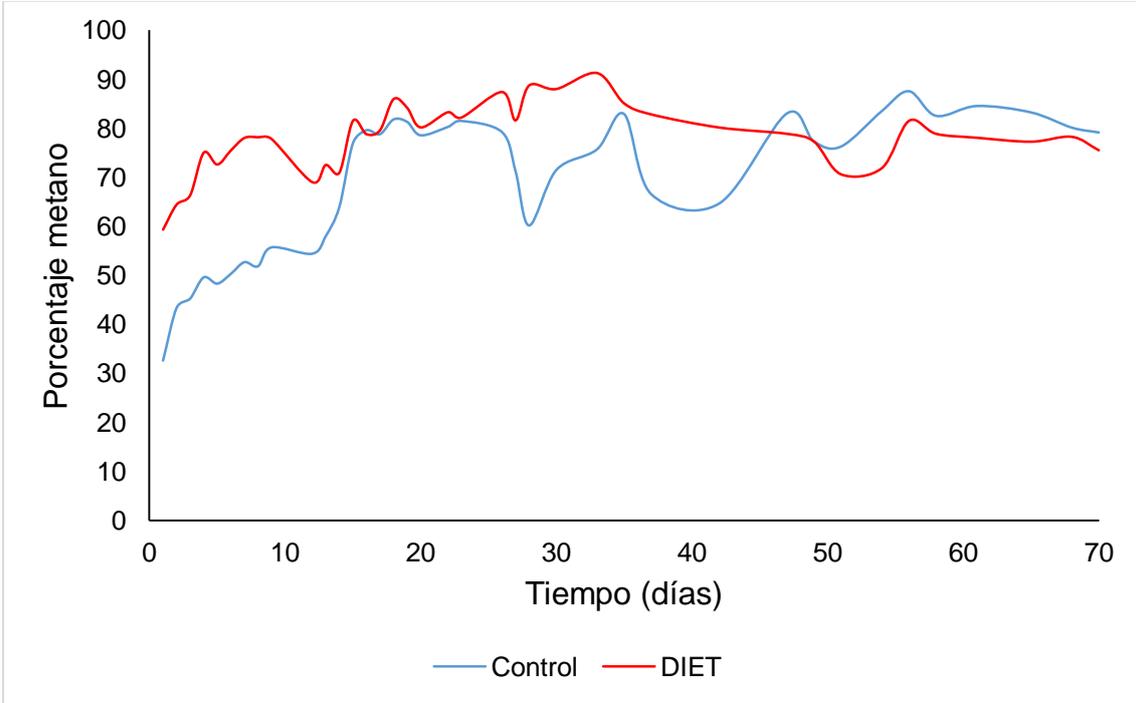


Figura A.2.5 Concentración de metano en UASB control y UASB DIET en la fase recuperación

Por el contrario, el contenido en metano del UASB control no sobrepaso el 60 % hasta el día 14 de monitoreo. La concentración media de metano del UASB control fue 65.86 % en los primeros 50 días; aproximadamente un 13 % inferior al UASB DIET. Este incremento en la concentración de metano es debido a una mayor reducción de dióxido de carbono a metano, por el aumento en la eficiencia de recuperación de los electrones cuando el transporte de estos se produce a través de DIET [122]. A partir del día 50 el rendimiento de metano en UASB DIET es nulo, por lo tanto, las concentraciones de metano no son comparables. La concentración de metano en el reactor UASB control alcanza valores en torno al 80 % desde el día 47.