



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

OBTENCIÓN DE METANO A PARTIR DE AGUAS
RESIDUALES DE MAÍZ (*NEJAYOTE*) MEDIANTE
DOS REACTORES EN SERIE

Tesis que presenta
QFB JOSÉ SILVANO CHALÉ CANUL

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

(MERIDA, YUCATAN A 29 DE ABRIL DEL 2016)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres José Silvano Chalé Euan e Hilda del Carmen Canul Cauich por todo su amor y apoyo.

A mi hermanita María Natividad Chalé Canul por su cariño y comprensión.

A la memoria de mis hermanitos Jose adrián, María Jesús y María del Carmen.

A mi compañera del alma Rubí del Rosario Chable Villacis por apoyarme y estar siempre a mi lado.

A mi directora de tesis Dra. Liliana Alzate Gaviria Escobar por el apoyo y guía durante todo el trayecto de mi tesis.

A mi codirectora de tesis Dra. Galdy Hernández Zarate por su comprensión y ayuda durante el proceso de mi maestría.

Al Centro de investigación Científica de Yucatán A.C. y en especial al departamento de Energía Renovable por haberme permitido cursar la maestría en ciencias en esta unidad y por las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No

Al maestro en Ciencias Jorge Arturo Domínguez Maldonado, técnico de la unidad de Energía Renovable, por sus valiosos consejos durante la experimentación y realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos por su apoyo.

ÍNDICE

Índice.....	I
Listado de tablas.....	III
Listado de figuras	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Introducción.....	1
Capitulo 1. Antecedentes.....	3
1.1. El maíz.....	3
1.1.1. Composición del maíz.....	3
1.2. El proceso de nixtamalización	4
1.2.1. Cambios fisicoquímicos en el maíz debido al proceso de nixtamalización	5
1.2.2. El agua residual del proceso de nixtamalización (nejayote)	6
1.3. Tratamiento del nejayote.....	6
1.4. Aspectos básicos de la digestión anaerobia.....	8
1.4.1. Etapas de la digestión anaerobia	9
1.4.2. Factores que afectan el proceso de la digestión anaerobia.....	16
1.5. Reactores anaerobios de alta tasa	22
1.5.1. Reactor anaerobio de columna empacada (RACE).....	23
1.5.2. Reactor anaerobio de manto de lodos (UASB por sus siglas en inglés).....	25
1.6. Digestión anaerobia en dos etapas	27
1.7. Hipótesis	30
1.8. Objetivos	31
Capitulo 2. Materiales y metodos.....	32
2.1. Obtención del nejayote.....	32

2.1.1. Caracterización del nejayote	32
2.2. Inóculo	32
2.3. Reactores utilizados	33
2.3.1. Ensamble del RACE	33
2.3.2. Ensamble del UASB.....	35
2.4. Acoplamiento de los reactores	36
2.4.1. Fase 1: aclimatación del UASB	36
2.4.2. Fase 2: pruebas preliminares en el RACE	37
2.4.3. Fase 3: acoplamiento del race con el UASB	38
Capitulo 3. Resultados y discusiones.....	40
3.1. Caracterización fisicoquímica del nejayote	40
3.2. Operación de los reactores	41
3.2.1. Aclimatación del UASB	41
3.2.2. Pruebas preliminares en el RACE	44
3.2.3. Acoplamiento de los reactores RACE y UASB	47
3.2.4. Tratamiento del nejayote mediante el proceso anaeróbico en dos fases:.....	55
3.2.5. Características del efluente después del tratamiento en los reactores acoplados.	56
Capitulo 4. Conclusiones	58
Bibliografía.....	59

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición química del grano de maíz.....	4
Tabla 1.2 Características del nejayote según diversos autores.....	6
Tabla 1.3 Clasificación de acuerdo al sustrato y subproductos de algunas especies bacterianas típicas del proceso de hidrólisis	11
Tabla 1.4 Clasificación de acuerdo al sustrato y subproductos de algunos microorganismos acidogénicos.....	12
Tabla 1.5 Clasificación de acuerdo al sustrato y productos de algunos microorganismos acetogénicos	13
Tabla 1.6 Reacciones involucradas en la etapas de acetogénesis, metanogénesis y producción de H ₂ S	14
Tabla 1.7 Clasificación de acuerdo al sustrato y subproductos de las bacterias metanogénicas en los digestores.....	15
Tabla 2.1 Caracterización físico-química del nejayote	32
Tabla 2.2 Proceso de aclimatación para el UASB.....	37
Tabla 2.3 condiciones establecidas en cada experimento para el acoplamiento de RACE con el UASB	38
Tabla 2.4 Parámetros a evaluar en los reactores.....	39
Tabla 3.1 Caracterización físico-química del nejayote	40
Tabla 3.2 Resultados obtenidos en la prueba ANOVA de las pruebas con y sin inoculo..	45
Tabla 3.3 Condiciones iniciales del RACE y día de acoplamiento elegido.	47
Tabla 3.4 Características del efluente y producción de biogás en los RACE de acuerdo al día de acoplamiento	47
Tabla 3.5 Composición de los AGVs totales de los efluentes del race de acuerdo al día de acoplamiento	48
Tabla 3.6 Características obtenidas en el reactor UASB durante las pruebas de acoplamiento	53
Tabla 3.7 Características del efluente resultante en las diferentes pruebas de acoplamiento.	56

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema del proceso de nixtamalización.	5
Figura 1.2 Esquema del proceso de digestión anaerobia.....	10
Figura 1.3 Modelo de un reactor anaerobio de columna empacada.....	23
Figura 1.4 Modelo de un bioreactor UASB.....	26
Figura 2.1 Dimensiones de las secciones y materiales utilizados para el ensamble del RACE	34
Figura 2.2 Ensamble del RACE	34
Figura 2.3 Dimensiones de las secciones y materiales utilizados para el ensamble del UASB	35
Figura 2.4 UASB ensamblado con sistema de calentamiento y recirculación	36
Figura 2.5 Esquema del acoplamiento de los reactores.....	38
Figura 3.1 Aclimatación del reactor UASB	43
Figura 3.2 RACE lleno con nejayote sin inóculo.....	45
Figura 3.3 Resultados obtenidos durante las pruebas preliminares en el RACE.....	46
Figura 3.4 Resultados de pH y AGVs totales obtenidos en el RACE durante las pruebas A1, A2 y A3.....	50
Figura 3.5 Porcentajes de remoción de DQO y ST obtenidos en el RACE durante las pruebas A1, A2 y A3.....	51
Figura 3.6 Porcentaje de H ₂ y CH ₄ obtenidos en el RACE durante las pruebas A1, A2 y A3	52
Figura 3.7 Porcentajes de remoción de DQO y rendimiento de metano obtenidos en el UASB durante los experimento de acoplamiento A1, A2 y A3.....	54
Figura 3.8 Nejayote antes del tratamiento (a) y después del tratamiento (b)	57

RESUMEN

El efecto del tratamiento anaeróbico del Nejayote mediante un sistema de dos fases (hidrólisis-acidogénesis y acetogénesis-metanogénesis) fue investigado por medio de un reactor RACE (reactor anaerobio de columna empacada) acoplado a un UASB (reactor anaerobio de manto de lodos con flujo ascendente por sus siglas en inglés). Los reactores fueron operados en condiciones mesofílicas, con recirculación continua. El RACE fue alimentado una sola vez en modo batch y el UASB mediante pulsos utilizando los efluentes del RACE.

Como primer paso el UASB fue aclimatado durante un periodo de 101 días con una carga orgánica de 1.9 g DQO/L·día, alcanzando una eficiencia de remoción de DQO promedio de 92 ± 1 %, con un contenido de metano en el biogás de 188 ± 6 L de CH_4 /kg DQO_{removido} y una concentración de AGVs (Ácidos Grasos Volátiles) de 280 ± 24 mg/L.

Posteriormente se evaluó el comportamiento del RACE por medio de dos pruebas preliminares con y sin adición de inóculo para determinar el día de acoplamiento de los reactores.

Durante las pruebas de acoplamiento y tratamiento en dos fases se demostró que el mejor resultado fue al acoplar el RACE en el día 8 con el UASB permitiendo el tratamiento en un periodo de 19 días con una remoción de DQO promedio de 97 ± 1 %, un contenido de metano en biogás de 87 ± 6 % que permitió un rendimiento de metano promedio de 293 ± 14 L de CH_4 /kg DQO_{removido}.

El efluente obtenido mostró ser bueno para ser utilizado en riego agrícola de acuerdo a la NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

Estos resultados demostraron que el tratamiento anaeróbico en dos fases es un método eficiente para el tratamiento y obtención de metano a partir de nejayote superando los resultados de investigaciones previas.

ABSTRACT

The effect of an anaerobic treatment of Nejayote through a two-phase system (hydrolysis-acidogenesis and acetogenesis-methanogenesis) by a RACE (Anaerobic packed bed reactor) coupled to a UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) was investigated. The reactors were operated at mesophilic conditions, with continuous recirculation. The RACE was fed once in batch mode and the UASB by pulses using the RACE effluents.

As a first step, the UASB was acclimated for a period of 101 days with an organic load of 1.9 g COD/L·day, reaching an average efficiency of COD removal of $92 \pm 1\%$, the methane content of biogas was 188 ± 6 L CH₄/kg COD_{removed}. And a concentration of VFA (Volatile Fatty Acids) of 280 ± 24 mg/L.

Subsequently, the RACE behavior was evaluated by two preliminary tests: with and without addition of inoculum, to determine the time of reactors coupling.

The best result was to couple the RACE to the UASB at day 8 with allowing a treatment period of 19 days with a COD removal of $97 \pm 1\%$, a methane content in the biogas of $87 \pm 6\%$ resulting in a methane yield of 293 ± 14 L CH₄/kg COD_{removed}.

The effluent can be used in agricultural irrigation because it complies with the NOM-001-ECOL-1996, which establishes the maximum permissible limits of pollutants in wastewater discharges into national waters and property of México.

These results demonstrated that the two-stage anaerobic treatment is an efficient method for the treatment and methane production from Nejayote improving the results of previous investigations.

INTRODUCCIÓN

La producción de masa y harina de maíz para la elaboración de tortillas se efectúa en diversos países tales como Estados Unidos, México, Guatemala y El Salvador, siendo en los tres últimos de mayor importancia, ya que la tortilla es el alimento básico para su población [1].

En México la tortilla de maíz es considerada un alimento de gran importancia económica, social y nutricional (en la antigüedad su producción se realizaba como parte sagrada en rituales por los indígenas mexicanos) [2]. De acuerdo a la SAGARPA, en 2010 el consumo de tortillas en México fue de 6.9 millones de toneladas, lo cual brindó un aporte económico de 72,481 millones de pesos [3]. Su producción se realiza mediante un proceso denominado nixtamalización (método proveniente de la época de los aztecas) el cual consiste en calentar los granos de maíz con agua e hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y dejarlo en reposo durante varias horas normalmente en un tanque [4]. Uno de los principales problemas de este proceso es la generación de grandes cantidades de aguas residuales denominadas Nejayote que presentan temperaturas entre 40 a 70 °C, pH entre 10 y 14 y altas concentraciones de materia orgánica disuelta y en suspensión del orden de los 5 a 50 g/L [5].

La cantidad de aguas residuales generadas en molinos e industrias de fabricación de masa y harina (considerando un uso de 600 toneladas de maíz al día) es en promedio 1,500-2,000 m³ cuya disposición final es, en el mejor de los casos, en una planta de tratamiento, sin embargo la realidad muestra que son dispuestas en ríos, lagos, y suelos, lo que causa serios deterioros ambientales [6, 7].

Para el tratamiento de aguas residuales, los procesos de tipo biológico aerobio y anaerobio son muy utilizados, el proceso aerobio para concentraciones de DQO menores a 1,000 mg/L y el anaerobio para DQO mayores a 4,000 mg/L por lo cual para efluentes de tipo industrial este último es preferible [8].

El proceso anaeróbico puede ser llevado a cabo mediante una variedad de sistemas, entre los que se encuentran los de agitación continua (CSTR por sus siglas en inglés) algunas veces empleados para la digestión de lodos municipales; los reactores de contacto anaerobio utilizados para aguas residuales de procesos industriales que fabrican carne y leche; los de filtro anaerobio de columna empacada que utilizan un material inerte para aumentar la superficie y mejorar la degradación; los reactores anaerobios de manto de

lodos (UASB por sus siglas en inglés); los reactores de columna fluidizada que permiten manipular altas velocidades de recirculación y propiciar la fluidización del lecho y, los reactores de columna expandida entre otros [9].

En las últimas décadas la separación del proceso anaeróbico en dos fases ha sido investigado con el propósito de mejorar tanto la degradación de la materia orgánica como el rendimiento de metano, favoreciendo las fases hidrolítica-acidogénica y finalmente la acetogénica-metanogénica, sin afectarse mutuamente [10].

Debido a las dificultades que conllevan el tratamiento aerobio del nejayote y a un tratamiento prometedor con generación de metano por medio anaerobio, en este trabajo se utilizó un sistema de tratamiento anaerobio de dos etapas utilizando dos reactores (un reactor por cada etapa) para aumentar el control del tratamiento y por ende una mejora en el rendimiento de producción de metano.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

1.1. El maíz

El maíz (*Zea mays L.*) es un cereal que, aunque se ha dicho y escrito mucho acerca de su origen, todavía hay discrepancias respecto a los detalles. Las hipótesis más aceptadas son las de origen andino y la mexicana que indican fue hace unos 7,000 años atrás [11]. Su expansión al resto del mundo se llevó a cabo alrededor del siglo XV cuando los conquistadores europeos lo exportaron. Desde entonces su cultivo y consumo se incrementó ampliamente, ocupando hasta una tercera parte de la dieta del humano, ganado y otros animales [2, 12].

Según la SAGARPA [3] en México el cultivo de maíz es de suma importancia ya que, es el alimento principal de la población. Ocupa hasta un 20 % de la población económicamente activa y tiene un alto valor agrícola. En 2010 se cosecharon 7.1 millones de hectáreas con un rendimiento de 3.1 ton/ha alcanzado una producción anual promedio de 27 millones de toneladas, de las cuales, 6.9 millones se destinaron a la elaboración de tortillas. Un 64 % de la producción se realiza por el método tradicional de nixtamalización y el 36 % restante a través de la industria de la harina. Se calcula que en México el consumo diario por persona de tortilla en las zonas rurales es de 217.9 g; en contraste, en las zonas urbanas dicho indicador es de 155.4 g, con estos datos, se estimó que el consumo de tortilla generó un aporte económico de 72,481 millones de pesos.

1.1.1. Composición del maíz

Según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization, por sus siglas en inglés) [13] el grano de maíz maduro se encuentra estructurado entre 80 y 85 % de endospermo, 10 a 12 % de germen (embrión), 2 a 3 % de aleurona (estructura que une al grano con la espiga) y un 5 a 6 % de pericarpio (cáscara). Su composición química se resume en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Composición química del grano de maíz [13]

Componente químico	Endospermo (%)	Germen (%)	Pericarpio (%)	Aleurona (%)
Proteínas	8.0	18.4	3.7	19
Extracto etéreo (grasa cruda)	0.8	33.2	1.0	ND
Fibra cruda (Hemicelulosa, Celulosa, Lignina)	2.7)	8.8	86.7	ND
Cenizas	0.3	10.5	0.8	ND
Almidón	87.6	8.3	7.3	ND
Azúcar	0.62	10.8	0.34.3	ND

ND, no determinado.

1.2. El proceso de nixtamalización

El término nixtamalización se refiere al proceso de calentamiento y remojo de maíz en una solución de cal o ceniza de madera [5]. El proceso a detalle consiste en: a) calentar el maíz en agua (entre 125 y 160 L por cada 50 kg de maíz) con cal (0.1-5.0 %) a 80 °C por 0.25-3.0 h; b) reposar el licor resultante durante 12-24 h; c) lavar el licor reposado con agua en proporción 1:3 (3 L de agua por kg de maíz), y d) escurrir el exceso de agua. Finalmente, el producto resultante es el nixtamal, el cual se utiliza para la elaboración de masa o harina que pueden ser usadas para la fabricación de tortillas, botanas, panes, tostadas y otros productos, figura 1.1 [14, 15].

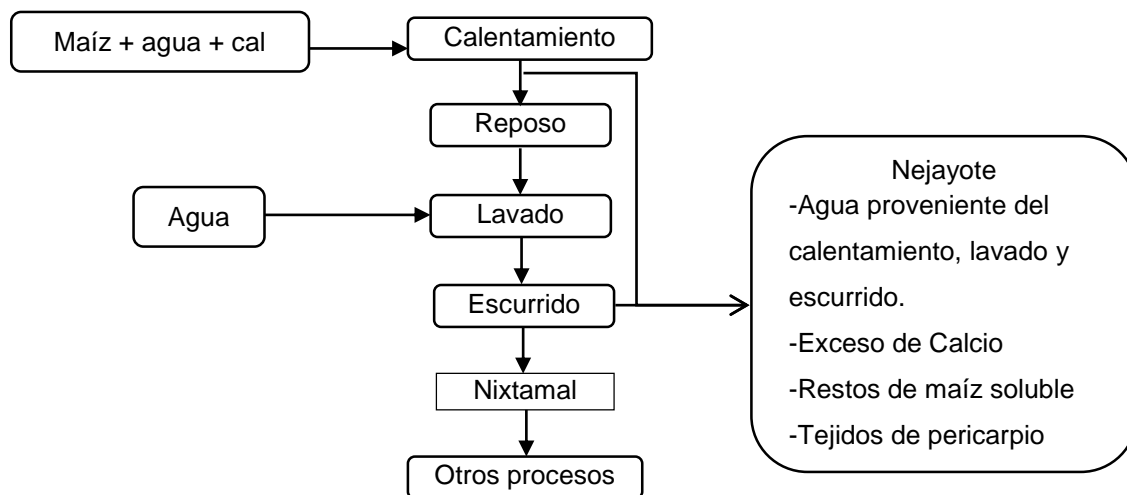


Figura 1.1 Esquema del proceso de nixtamalización [15].

1.2.1. Cambios fisicoquímicos en el maíz debido al proceso de nixtamalización

El proceso de nixtamalización produce cambios físicos, estructurales y químicos que mejoran la calidad nutricional del maíz, sin embargo, también provoca la pérdida de algunos nutrientes [16]. Cabe mencionar que la pérdida de materia ocurrida es influenciada por distintos parámetros tales como el tipo de maíz, la dureza del endospermo, el tipo de cal utilizado, las temperatura de cocción, los tiempos de remojo, temperatura, y fricción durante el lavado [15].

Entre los cambios ocurridos durante el proceso se encuentran: a) solubilización y disolución del tejido del pericarpio (generalmente en la capa del endocarpio) lo cual facilita su remoción física durante el proceso de calentamiento y lavado; b) gelatinización parcial del almidón en el endospermo; c) desnaturalización parcial de las proteínas tanto del endospermo como del germen; d) hidratación del almidón, y e) penetración y absorción del calcio dentro de las matrices del endospermo y el germen que producen el hinchamiento y ablandamiento de los granos, lo cual permite una mayor facilidad en la molienda y generación de masa, producto que consiste en una mezcla de polímeros de almidón (amilosa y amilopectina) intactos y una porción parcialmente gelatinizada [4, 15, 17, 18].

1.2.2. El agua residual del proceso de nixtamalización (Nejayote)

El agua residual generada durante el proceso de nixtamalización es conocida como nejayote. Se encuentra compuesta por un 92 a 94 % de agua y un 6 a 8 % de residuos de maíz, entre los que figuran las partes del pericarpio, endospermo, germen, carotenoides (pigmentos responsables del color amarillo característico del nejayote), y calcio [19]. En la tabla 1.2 se muestran las características del nejayote según diversos autores.

Tabla 1.2 Características del Nejayote según diversos autores

Características	Valores Reportados	Referencias
pH	11.6, 6.2 y 11.0	[20-22]
Densidad (kg/m ³)	1,047.3 y 1,003.5	[21,23]
DQO (mg O ₂ /L)	13,650.0 y 40,058.1	[20,23]
ST (mg/L)	13,310.0	[20]
DBO ₅ (mgO ₂ /L)	7,875.0 y 14,218.7	[23]
AT (mgCaCO ₃ /L)	3,260.0	[20]
Calcio (mg/L)	1,526.1	[23]
Fósforo (mg/L)	27	[20]
N-Kjeldah (mg/L)	118	[20]
Lignina (% b.s.)	0.67	[21]
Proteína (% b.s.)	4.9	[21]

DQO; Demanda Química de Oxígeno, SST; Sólidos Suspendidos Totales, DBO; Demanda Bioquímica de Oxígeno, AT; Alcalinidad Total; b.s., Base Seca.

1.3. Tratamiento del Nejayote

Algunos trabajos han reportado el tratamiento biológico aerobio del nejayote entre los cuales se encuentran:

Martínez [20] evaluó dos sistemas de tipo aerobio; sistema de lodos activados y sistema de cascada aerobio. En el primer sistema utilizó dos tanques, uno de aireación y otro de sedimentación de 17 y 26 L respectivamente, operados a diferentes cargas orgánicas de 0.5, 1.3, 2.2 y 3.0 kg DQO/kg SSV·día. Como resultados obtuvo la remoción orgánica de hasta un 90% al utilizar 0.5 kg DQO/kg SSV·día y TRH (tiempo de retención hidráulica) de 2.5 días, sin embargo, también observó que conforme se aumentaba la carga orgánica la remoción disminuía, alcanzando un 70 % de remoción para la carga orgánica de 3.0 kg

DQO/kg SSV·día. En el segundo sistema utilizó un reactor de 41.5 cm de largo, 3.5 cm de ancho y 17.4 cm de alto, dividido en 70 cámaras de 130 mL y 189 cm² de superficie, el volumen total de trabajo fue 9.1 L. Cada cámara fue provista de burbujas de aire para abastecer de oxígeno y agitación. Se estudiaron tres valores de carga orgánica, 1.3, 3.0 y 5.0 kg DQO/m³·día. La máxima eficiencia obtenida fue de un 68 % con un TRH de 2 días. Sin embargo, mostraron problemas de turbiedad debido a la pobre floculación y sedimentación del lodo.

Pedroza y colaboradores [24] mediante un reactor aerobio biológico rotativo de contacto (RBC por sus siglas en inglés) de 10 secciones con un área total de contacto de 7.09 m² realizaron el tratamiento de nejayote con una carga orgánica de 4,000 mg/L, un TRH de 1.167 días y un caudal de 0.042 m³/día. Obtuvieron una remoción del 50 % de materia orgánica al igual que eliminación de olores.

Salmerón y colaboradores [5] utilizaron cuatro reactores aerobios de burbujas dispuestos en cascada (volúmenes de trabajo de 1.13 L y aireación de 5.2-5.6 L/min) suplementados con (NH₄)₂SO₄ y KH₂PO₄, con un sistema previo de sedimentación, a un pH de 6.0 ± 1, caudal de 16 mL/h y TRH de 8.3 días para el tratamiento de nejayote con una DQO de 28000 mg/L y obtuvieron remociones entre 80 y 87 %.

Respecto al tratamiento del nejayote mediante sistemas anaerobios algunos de los trabajos fueron realizados por:

Martínez [20] utilizó dos procesos: en el primero usó un reactor de contacto anaerobio completamente mezclado de 24 L con tanque de sedimentación en la parte superior, las dos secciones se separaron con un baffle. Este sistema se estudió con cuatro diferentes TRH: 5, 10, 15 y 20 días. Como resultado obtuvieron la falla del sistema, ya que las bacterias no pudieron producir flóculos causando pérdida de biomasa e ineficiencia del sistema. La máxima remoción orgánica que se obtuvo en este proceso fue de 31 % con un TRH de 15 días. En el segundo proceso utilizó un reactor anaerobio de columna empacada (APBR por sus siglas en inglés) cilíndrico de 9 cm de diámetro y 150 cm de alto, volumen de 11.5 L. El empaquetado fue realizado con anillos de plástico de 3.7 cm de diámetro lo cual proporcionó un área superficial de 2.28 m². El sistema fue estudiado con dos TRH de 5 y 9.7 días que

correspondían a cargas orgánicas de 1.3 y 0.21 kg DQO/m³.día respectivamente. Los resultados obtenidos fueron, 91 % de remoción orgánica, producción de 0.647 mL de gas/kg DQO con composición de 58 % de metano y 42 % de CO₂. Igualmente observaron que la alcalinidad entre 2500 a 3200 mg/L de CaCO₃ que tenía el nejayote no fue suficiente para neutralizar la disminución de pH producida por los ácidos grasos volátiles (AGV) por lo que se tuvo que utilizar una solución de NaOH para controlarlo.

Por su parte Civit y colaboradores [25] realizaron el tratamiento del nejayote mediante un sistema de tipo anaerobio que constó de 5 APBR cilíndricos de polimetilmetacrilato (plexiglás®) dispuestos en continuo con volumen de trabajo de 23.5 L empaquetados con 430 anillos de plástico de 35 mm de diámetro cada uno (proporcionaron una superficie de 160 m²). Mantuvieron el sistema a 33 ± 0.5 °C y variaron la carga orgánica en tres etapas: a) etapa 1 (día 1 al 31) carga orgánica de 0.50 kg DQO/m³.día, b) etapa dos (día 32 a 80) con carga orgánica de 0.68 kg DQO/m³.día y etapa 3 (día 81 al 123) con carga orgánica de 1.73 KgDQO/m³.día. Ellos consiguieron una remoción de 90 % de DQO y 60 L/día de producción de metano con un TRH de 15 y 23 días en las etapas 1 y 2 respectivamente, mientras que en la etapa 3 con un TRH de 1 día obtuvieron la acidificación del reactor, una menor remoción (70-80 %) y pérdida en la producción de metano.

1.4. Aspectos básicos de la digestión anaerobia

Según Madsen y colaboradores [26] la digestión anaerobia se puede definir como un proceso microbiológico complejo donde el carbono orgánico presente en la forma de biopolímeros son convertidos a su forma reducida más simple como metano y a su forma más oxidada como dióxido de carbono en ausencia de oxígeno, por su parte, Raposo y colaboradores [27] la definen como un proceso bioquímico tecnológico para el tratamiento de sustratos orgánicos tales como, aguas residuales domésticas e industriales, desechos animales y sustratos sólidos (cultivos energéticos, residuos agrícolas y alimentarios).

En años recientes este proceso ha recibido mayor atención ya que envuelve la degradación y estabilización de materia orgánica compleja en conjunto con la producción de biogás que puede ser utilizado como fuente de energía renovable para reemplazar los combustibles

fósiles y porque presenta ventajas significativas en relación a otros procesos de degradación, entre las que se encuentran: [28-30]

- Costos bajos para el proceso ya que los reactores pueden ser sencillos de armar.
- Alta eficiencia de remoción orgánica en las aguas residuales.
- Poca producción de lodo, por lo cual, los costos de disposición del mismo disminuyen.
- Bajo requerimiento energético en el sistema.
- Recuperación de energía en forma de metano como parte del biogás.
- Bajo requerimiento de espacio.

Según Yi Jin y colaboradores [30] entre las desventajas se encuentran:

- La complejidad del proceso.
- Tiempos de retención largos, debido a la baja tasa de crecimiento de los microorganismos metanógenos y al inóculo utilizado (tipo y cantidad).
- Remoción parcial de patógenos.
- Posible generación de malos olores, esto debido a la generación de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

1.4.1. Etapas de la digestión anaerobia

De acuerdo a Weiland [31] el proceso de digestión anaerobia puede ser dividido en cuatro fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis/deshidrogenación y metanogénesis. Estos pasos individuales de degradación según Angelidaki [32] son llevados a cabo por consorcios microbianos con requerimientos ambientales diferentes y en interrelación sintrófica (figura 1.2) que según Gerardi [33] se encuentran en poblaciones frecuentemente mayores a 10^{16} células/mL, por ejemplo las bacterias sacarolíticas (10^8 células/mL), proteolíticas (10^6 células/mL), lipolíticas (10^5 células/mL) y metanógenas (10^8 células/mL).

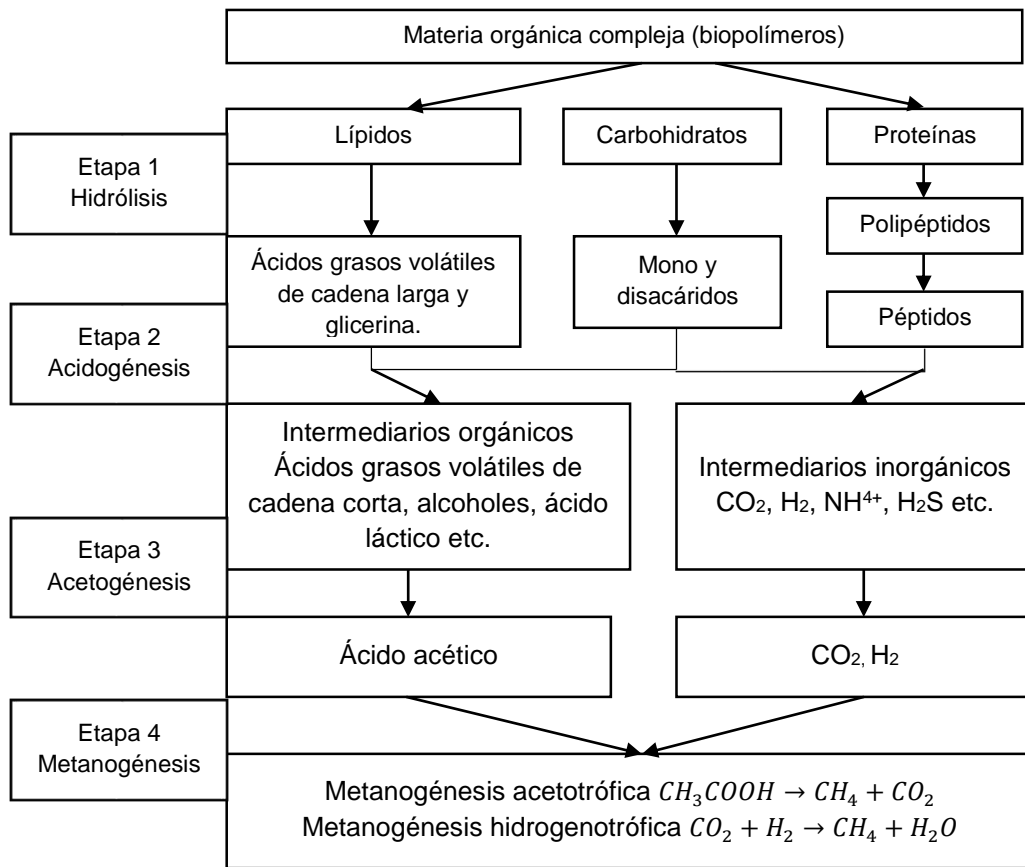


Figura 1.2 Esquema del proceso de digestión anaerobia [26]

- **Hidrólisis**

De acuerdo a Molino [34] es la primera etapa de la digestión anaerobia donde las bacterias fermentativas convierten la materia orgánica compleja (polímeros) a moléculas solubles (monómeros) por acción de enzimas (celulasas, amilasas, proteasas, lipasas) secretadas por los microorganismos. La actividad hidrolítica puede llegar a ser un paso limitante en el proceso de digestión anaerobia por lo que algunos procesos disminuyen esta limitación al aplicar químicos (ácidos y bases) o enzimas que aumentan la degradación. En la tabla 1.3 se observa la clasificación de ciertas bacterias hidrolíticas.

Tabla 1.3 Clasificación de acuerdo al sustrato y subproductos de algunas especies bacterianas típicas del proceso de hidrólisis [29]

Sustratos	Subproductos	Especies típicas	Reacción de Gram	Forma	Movilidad
Proteínas	Aminoácidos, azúcares.	<i>Clostridium</i> sp.	+	Bacilo	M
		<i>Poteus vulgaris</i>	-	Bacilo	M
		<i>Peptococcus</i> sp.	-	Bacilo	M
		<i>Bacteroides</i> sp.	-	Bacilo	N
		<i>Bacillus</i> sp.	+	Bacilo	M
		<i>Vibrio</i> sp.	-	Bacilo	M
Carbohidratos	Azúcares	<i>Clostridium</i> sp.	+	Bacilo	M
		<i>Acetovibrio celluloliticus</i>	-	Bacilo	M
		<i>Staphylococcus</i> sp.	+	Coco	N
Lípidos	Ácidos grasos, alcoholes, aminoácidos. Azúcares	<i>Bacteroides</i> sp.	-	Bacilo	
		<i>Clostridium</i> sp.	+	Bacilo	M
		<i>Micrococcus</i> sp.	+	Coco	N
		<i>Staphylococcus</i> sp.	+	Coco	N
RNA DNA	Purinas, pirimidinas	<i>Bacillus</i> sp.	+	bacilo	M

M, móvil; N, no móvil.

- **Acidogénesis**

En esta etapa las bacterias acidogénicas convierten los productos de la primera fase (hidrólisis) a ácidos orgánicos simples, alcoholes, dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂). Los principales ácidos producidos son el acético (CH₃COOH), propiónico (CH₃CH₂COOH) y butírico (CH₃CH₂CH₂COOH), y por parte de los alcoholes, el etanol (C₂H₅OH) [34].

Según Scheper [35] a las bacterias acidogénicas se le ha dado una considerable atención debido a ventajas que poseen respecto a las metanogénicas tales como, alta tasa de crecimiento (30-40 veces mayor), capacidad de supervivencia en condiciones extremas de pH, temperatura y cargas orgánicas, producción de AGVs en grandes cantidades. En la tabla 1.4 se presenta la clasificación de algunas bacterias acidogénicas.

Tabla 1.4 Clasificación de acuerdo al sustrato y subproductos de algunos microorganismos acidogénicos [29]

Substrato	Subproductos	Especies típicas	Reacción de Gram	Forma	Movilidad
Aminoácidos	Valerato, isovalerato, propiónato, butirato.	<i>Lactobacillus</i> sp.	+	Bacilo	N
		<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilo	M
	Acetato, H ₂ , Ácidos grasos.	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	Coco	N
		<i>Bacillus</i> sp.	+	Bacilo	M
		<i>Pseudomonas</i> sp.	-	Bacilo	M
		<i>Micrococcus</i> sp.	+	Coco	N
		<i>Enterobacterium limosum</i>	+	Bacilo	M
		<i>Clostridium</i> sp.	+	Bacilo	M
Azúcares (monómeros dímeros)	CO ₂ , H ₂ , formato, acetato, butirato.	<i>Eubacterium</i> sp.	+	Bacilo	M
		<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilo	M
	Formato, acetato, etanol, lactato	<i>Bifidobacterium</i> sp.	+	Bacilo	N
		<i>Acetobacterium</i> sp.	-	Elipse	M
Ácidos grasos	Valerato, isovalerato, propiónato, butirato, acetato, H ₂ .	<i>Clostridium</i> sp.	+	Bacilo	M
Alcoholes		<i>Syntropomonas wolfei</i>	-	Bacilo	M

M, móvil; N, no móvil

- **Acetogénesis**

Consiste en la conversión de los ácidos orgánicos simples y alcoholes a acetato, H₂, formiato y CO₂ por parte de las bacterias acetógenas [29].

En esta etapa ocurre un proceso importante denominado relación sintrófica (mutua dependencia de varias especies) entre las acetógenas y las metanógenas hidrogenotróficas, ya que las acetógenas que son susceptibles a altas presiones parciales

de hidrógeno y dependen directamente del consumo del ión por parte de las metanógenas, por lo cual si estas últimas sufren percances, se pueden alcanzar presiones elevadas de hidrógeno que causarían la inhibición de las bacterias acetógenas [35]. Según Pind y colaboradores [36], el proceso de acetogénesis es favorable a concentraciones de hidrógeno menores que 40 nano molar (nM) que corresponden a 6 Pascales (Pa) a 35 °C. En la tabla 1.5 se observa la clasificación de algunos microorganismos acetógenos.

Tabla 1.5 Clasificación de acuerdo al sustrato y productos de algunos microorganismos acetogénicos [29]

Sustrato	Producto	Especie típica	Reacción de Gram	Forma	Movilidad
Butirato	Acetato, formato, H ₂ , CO ₂	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	-	Bacilo	N
		<i>S. fumaroxidans</i>	-	Bacilo	N
Propiónato	Formato, H ₂ , CO ₂	<i>Syntropomonas wolfei</i>	-	Bacilo	M
		<i>Peletomaculum termopropionicum</i>	+	Bacilo	M
		<i>P. schinkii</i>	+	Bacilo	M
	Butirato, acetato	<i>Smithella propionica</i>	-	Bacilo	M
H ₂ , CO ₂	Acetato	<i>Clostridium aceticum</i>	-	Bacilo	M

M, móvil; N, no móvil

- **Metanogénesis**

La formación microbiológica de metano ha sido observada naturalmente en diversos hábitats tales como ciénagas, cuerpos de agua de la siembra de arroz, depósitos bénticos, suelo profundo de océanos, árboles, así como, en el sistema digestivo de rumiantes, cerdos, iguanas, termitas y humanos [9].

De acuerdo a Molino y colaboradores [34] en esta etapa se produce biogás a través de dos posibles rutas: en la primera se utilizan moléculas de ácido acético para generar dióxido de carbono y metano (lo realizan las bacterias metanógenas acetoclásticas), y en la segunda, reducen el dióxido de carbono hacia metano utilizando hidrógeno (metanógenas hidrogenotróficas). De acuerdo a Gerardi y colaboradores [33] de las dos reacciones metanogénicas la hidrogenotrófica es el proceso de mayor efectividad, sin embargo

solamente el 30 % del metano producido ocurre por este medio, debido a la cantidad limitada de H₂ que se produce.

En la tabla 1.6 se visualizan las reacciones acetogénicas, metanogénicas y las productoras de H₂S involucradas en la digestión anaerobia (las reacciones con $\Delta G'_0$ negativas son favorecidas mientras que las positivas necesitan energía para llevarse a cabo). En la tabla 1.7 se presenta la clasificación de acuerdo al sustrato y productos de algunos de los metanógenos involucrados en la digestión anaerobia.

Tabla 1.6 Reacciones involucradas en la etapas de acetogénesis, metanogénesis y producción de H₂S [35]

Reacción	$\Delta G'_0$ [KJ/reacción]
Reacciones acetogénicas sintrófica	
Propionato ⁻ + 3 H ₂ O → Acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+76.1
Butirato ⁻ + 2 H ₂ O → 2 Acetato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	+48.3
Lactato ⁻ + 2 H ₂ O → Acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	-4.2
Etanol + H ₂ O → Acetato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂ O	+9.6
Metanol + 2 H ₂ O → HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+23.5
Reacciones metanogénicas	
4 H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → CH ₄ + H ₂ O	-135.6
Acetato ⁻ + H ₂ O → CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31.0
Metanol → 3/4 CH ₄ + 1/4 HCO ₃ ⁻ + 1/4 H ⁺ + 1/4 H ₂ O	-78.2
Reacciones de reduccion de sulfato	
4 H ₂ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺ → HS ⁻ + 4 H ₂ O	-151.9
Acetato ⁻ + SO ₄ ⁻ → 2 HCO ₃ ⁻ + HS ⁻	-47.6
Propionato ⁻ + 3/4 SO ₄ ⁻ → Acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + 3/4 HS ⁻ + 1/4 H ⁺	-37.7
Butirato ⁻ + 1/2 SO ₄ ⁻ → 2 Acetato ⁻ + 1/2 HS ⁻ + 1/2 H ⁺	-27.8
Lactato ⁻ + 1/2 SO ₄ ⁻ → Acetato ⁻ + HCO ₃ ⁻ + 1/2 HS ⁻ + 1/2 H ⁺	-80.0
Etanol + 1/2 SO ₄ ⁻ → Acetato ⁻ + 1/2 HS ⁻ + 1/2 H ⁺ + H ₂ O	-66.4
Metanol + 3/4 SO ₄ ⁻ + 1/4 H ⁺ → HCO ₃ ⁻ + 3/4 HS ⁻	-90.4
Reacciones homoacetogénicas	
Lactato ⁻ → 1 1/2 Acetato ⁻ + 1/2 H ⁺	-56.6
Eatnol + HCO ₃ ⁻ → 1/2 Acetato ⁻ + H ₂ O + 1/2 H ⁺	-42.6
Metanol + 1/2 HCO ₃ ⁻ → 3/4 Acetato ⁻ + H ₂ O	-55
4 H ₂ + 2 HCO ₃ ⁺ + H ⁺ → Acetato ⁻ + 4 H ₂	-104.6

$\Delta G'_0$, energía libre de Gibbs

Tabla 1.7 Clasificación de acuerdo al sustrato y subproductos de las bacterias metanogénicas en los digestores [29].

Sustrato	Productos	Especies representativas	Condiciones óptimas de crecimiento		Forma	Movilidad	*R. de Gram
			pH	T (°C)			
Acetato	CH ₄ , CO ₂	<i>Methanotrix soehngenii</i>	7.4-7.8	35-40	BV.	N	-
		<i>Methanosaeta concilii</i>	7.1-7.5	35-40	BV.	N	-
		<i>Methanosarcina acetivorans</i>	6.5-7.5	35-40	C.	N	-
H ₂ , CO ₂	CH ₄	<i>Methanobacterium bryantii</i>	6.9-7.2	37-39	B.	N	+
		<i>M. thermoautotrophicum</i>	7.2-7.6	65-70	B.	N	+
		<i>M. alcaliphilum</i>	8.1-9.1	37	B.	N	-
		<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	7.8-8.0	30-37	CB.	N	+
		<i>Methanococcus jannaschii</i>	5.0-7.0	85	Cl.	M	
		<i>Methanolactina paynteri</i>	6.6-7.2	40	Bl.	N	-
		<i>Methanospirillum hungatei</i>		30-37	EV.	M	-
		<i>Methanoplanus endosymbiosus</i>	6.6-7.2	40	DI.	N	-
		<i>M. olentangyi</i>		30-40			
		<i>Methanothermus fervidus</i>	6.5	83	B.	M	+
		Formato, H ₂ , CO ₂	CH ₄ , CO ₂	<i>Methanobacterium formicium</i>	6.6-7.8	37-45	B.
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	7.0			37-39	B.	N	+
<i>M. ruminantium</i>	7.0			37-39	CB.	N	+
<i>Methanococcus voltae</i>	6.5-8.0			35-40	Cl.	M	
<i>M. deltae</i>				37	Cl.	N	
<i>M. maripaludis</i>	6.5-8.0			35-40	Cl.	M	
<i>M. thermolithoautotropichus</i>	6.5-8.0			65	Cl.	M	-
<i>Methanoplanus limicola</i>	7.0			40	P.	M	-
<i>Methanogenium cariaci</i>	6.2-6.6			20-25	Cl.	N	-
<i>M. marisnigri</i>	6.8-7.3			20-25	Cl.	N	-
<i>M. olentangyi</i>				37	Cl.	N	-
<i>M. tatii</i>	7.0			37-40	Cl.	N	-
<i>M. thermophilicum</i>	6.5-7.2			55-60	Cl.	N	-
<i>M. bourgense</i>	6.3-6.8			35-42	Cl.	N	-
<i>Methanocorpusculum aggregans</i>	6.4-7.2			35-37	Cl.	N	-

*R de G, reacción de Gram; T, temperatura; M, móvil; N, no móvil; BV, bacilo con vaina, C, coco; B, bacilo; CB, cocobacilo; Cl, coco irregular; Bl, bacilo irregular; EV, espiral en vaina; DI, disco irregular; P, plato.

1.4.2. Factores que afectan el proceso de la digestión anaerobia.

Las causas comunes de desbalance en el proceso son las sobrecargas orgánicas, la presencia de toxinas y los cambios en la concentración de sustrato, que finalmente repercuten en los rendimientos y composición del biogás, pH, potencial de óxido reducción, remoción de DQO, formación de AGVs y amonio, entre otros [37].

- **Amonio ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)**

Según Chen y colaboradores [38] la acumulación de amonio ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) producido por la degradación proteínica en las aguas residuales, es uno de los principales factores que afectan la función de los digestores anaeróbicos durante el tratamiento residual. Asimismo, la forma libre del amonio ($\text{NH}_3\text{-N}$) es considerada la forma más tóxica debido a su capacidad de atravesar la membrana de las células. De acuerdo a Kroeker [39] concentraciones de 2 g/L de amonio y 60 mg/L amonio libre resultan tóxicas para las bacterias metanogénicas.

Zhang y colaboradores [40] evaluaron el efecto tóxico del amonio para lo cual incubaron 10 g de lodo anaeróbico y 1 g de estiércol de cerdo en 30 mL de buffer Hepes (ácido N-2-hydroxyethylpiperazina-N'-2-etansulfónico).

Posteriormente le adicionaron NH_4Cl para crear concentraciones finales de 0, 3, 7 y 10 g $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$, ajustaron el pH a 7.0 e incubaron a 35 °C en oscuridad. Obtuvieron que la adición de amonio a concentraciones de 3 y 7 g $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$ no afectó la población metanogénica, pero la de 10 g $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$ provocó un marcado decremento y causó la caída del pH a 6.7 por la elevada producción de AGVs. Igualmente observaron que la concentración de amonio libre disminuyó conforme disminuyó el pH.

Por su parte Kuichuan y colaboradores [41] investigaron el efecto del amonio y nitrato en la producción de biogás a partir de residuos de comida. Ellos realizaron dos experimentos en reactores tipo batch de 1 L, mesofílicos, con concentraciones de 0 a 4.5 g de $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$. En el primero se investigó la concentración crítica inhibitoria y en el segundo el impacto de la nitrificación. Obtuvieron que concentraciones de amonio menores a 1.54 g/L no causaron disminución en el rendimiento de metano, pero a concentraciones mayores de 3.78 g/L se

causó un daño severo en la población metanógena. También observaron que concentraciones de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) mayores de 1 g/L causaron inhibición de la producción de metano.

- **Sulfato (SO_4^{2-})**

Las aguas residuales con sulfatos son generadas por muchas industrias alimentarias. Bajo condiciones anaeróbicas las bacterias reductoras de sulfato (SRB por sus siglas en inglés) usan el sulfato como aceptor terminal de electrones para la degradación de algunos compuestos orgánicos e hidrógeno y producción de sulfuro. Este es uno de los principales problemas en el tratamiento anaeróbico [42]. Entre los compuestos que pueden ser completamente o parcialmente degradados a sulfuro por las SRB se encuentran las cadenas ramificadas y cadenas largas de ácidos grasos, etanol y otros alcoholes, ácidos orgánicos, y compuestos aromáticos según menciona Chen y colaboradores [38].

O'Reilly y Emer investigaron [43] el efecto de un influente con diferentes relaciones de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ en la población microbiana de un digestor anaeróbico. Ellos utilizaron un reactor granular expandido a 37°C para tratar agua residual sintética con relaciones de 16:1 (16 g $\text{DQO}/1$ g SO_4^{2-}), 8:1 (8 g $\text{DQO}/1$ g SO_4^{2-}), 4:1 (4 g $\text{DQO}/1$ g SO_4^{2-}), y 2:1 (2 g $\text{DQO}/1$ g SO_4^{2-}), con una carga volumétrica de 6 kg $\text{DQO}/\text{m}^3\cdot\text{día}$. Obtuvieron que a relaciones de 16:1 y 8:1, las metanógenas acetoclásticas e hidrogenotróficas fueron las que dominaron en crecimiento, sin embargo, a relaciones de 4:1 y 2:1 las SRB tuvieron mayor predominancia debido a la formación de ácido propiónico.

Paula y Foresti [44] realizaron un estudio para verificar la toxicidad del sulfuro en un reactor UASB. Utilizaron 2 reactores idénticos de 10.5 L, en el primero se determinaron los parámetros en la ausencia de sulfuro y en el segundo en presencia del mismo a concentraciones de 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 y 500 mg/L. Utilizaron influentes con DQO de 2 g/L y TRH de 15.6 h, por 8 meses. Obtuvieron que a partir de 100 mg/L hubo una marcada inhibición biológica, lo cual, provocó un decremento del 50 % en la remoción orgánica. A concentraciones menores de 50 mg/L no se observó inhibición.

Por su parte O'Flaherty y colaboradores [45] evaluaron el efecto del pH en la cinética de crecimiento y toxicidad por sulfuro en bacterias metanogénicas presentes en lodos anaerobios. Ellos encontraron que los niveles de H₂S inhibitorios para las bacterias metanogénicas empiezan a partir de 250 mg de H₂S/L a pH entre 6.4 y 7.2 y 90 mg de H₂S/L a pH entre 7.7 y 8.0.

- **Calcio (Ca²⁺)**

En una revisión realizada por Chen y colaboradores [38] investigaron que la concentración óptima de calcio para la producción de metano a partir de ácido acético fue de 200 mg/L, la moderadamente inhibitoria entre 2500 y 4000 mg/L, y la totalmente inhibitoria a concentraciones de 8000 mg/L. Igualmente observaron que a concentraciones menores de 120 mg/L se mejora la formación de biopelícula microbianas, y a 100-200 mg/L se beneficia la granulación de lodo en reactores tipo UASB.

Según Raposo y colaboradores [27] valores de CaCO₃ en un rango de 2500 a 5000 ppm proveen una alta capacidad buffer y pueden soportar un incremento de ácidos grasos volátiles sin que se lleve a cabo un cambio brusco del pH.

- **pH**

De acuerdo a Amani y colaboradores [29] el pH óptimo de las bacterias metanogénicas se encuentra entre 6.8 y 7.4 y de las acidogénicas entre 4.0 y 8.5.

Un incremento de pH puede resultar en un aumento de toxicidad debido a la formación elevada de amonio libre [45]. Un ejemplo de ello es la reducción de pH de 7.5 a 7.0 durante la digestión anaerobia termofílica de estiércol de vaca realizado por Zeeman y colaboradores [46] quienes obtuvieron como resultado un incremento en la producción de metano hasta cuatro veces.

Wang y colaboradores [47] evaluaron el efecto del pH en la digestión anaeróbica de residuos alimentarios utilizando dos tipos de inóculos; a) lodo anaeróbico de un reactor

UASB de tratamiento de residuos de vino, y b) lodo anaeróbico de una planta de tratamiento municipal. Utilizaron 8 reactores tipo batch de 500 mL en los cuales colocaron 20 % de inóculo y 80 % de sustrato. Se trabajaron a valores de pH de 4.0, 5.0, 6.0 y no controlado a una temperatura de 30 ± 2 °C y agitación mecánica de 120 rpm. Dichos autores obtuvieron una mejor adaptación y una producción de AGVs de 918 mg/g SSV_{removido} durante la digestión anaerobia a pH 6 con una concentración de 51.3 g DQO/L siendo los ácidos acético y butírico los predominantes.

Strick y colaboradores [48] evaluaron un sistema de control de pH durante la digestión anaerobia de excreta de cerdos, para ello utilizaron un reactor con agitación inoculado con lodo anaerobio operado a una temperatura 60 °C y pH de 7.5. No obstante el sistema falló debido a un aumento de la fracción libre de amonio (NH_3-N) que superó los 600 mg/L, por lo cual, ajustaron el pH a 6.5 lo cual disminuyó la cantidad de amonio libre, sin embargo, los ácidos grasos volátiles aumentaron drásticamente a 22 g/L lo que resultó en el colapso del proceso.

Koster y colaboradores [49] evaluaron la inhibición por azufre en la metanogénesis de acuerdo a varios valores de pH. En su experimento utilizaron matraces con 500 mL de medio basal (1,000 mg/L $NaHCO_3$, 40 mg/L NH_4Cl , 25 mg/L KCl , 11 mg/L $MgCl:6H_2O$, 9 mg/L KH_2PO_4 , 9 mg/L Na_2SO_4 , lodo granular con diámetro entre 1 y 2.5 mm y extracto de levadura) a los cuales se le añadieron entre 0.04 y 0.2 g de SSV por bote de lodo granular y concentraciones de sulfuro de 0, 90, 250 y 850 mg/L variando el pH entre 6 y 8. Observaron que a pH en el rango de 6.4 a 7.2 es necesaria una concentración de 250 mg S/L para causar inhibición mientras que a pH entre 7.8 a 8.0 a partir de 90 mg S/L se inhibe la metanogénesis.

- **Ácidos grasos volátiles (AGV)**

Zhiyang y colaboradores [50] investigaron la influencia de los AGV en la generación de biogás a partir de residuos de cocina. Ellos utilizaron recipientes con volúmenes de reacción de 500 mL a los cuales se les adicionaron cargas orgánicas de 0, 1:70, 1:25, 1:14, 1:10, y 1:8 (ST residuos de cocina:ST lodo anaeróbico). Encontraron que la concentración de ácido acético varió de acuerdo a la carga orgánica 0.1, 2.8, 8.1, 11.3, 17.9 y 17.2 g/L

respectivamente, indicando que las bacterias metanógenas acetoclásticas fueron inhibidas parcialmente a partir de la generación de 1.5 y 2.5 g/L de ácido acético y completamente a concentraciones de 5.8 y 6.9 g/L.

Pind y colaboradores [51] utilizaron dos reactores termofílicos (55 °C) de agitación continua de 4.5 L con un volumen activo de 3.5 L, alimentados cada 6 h con estiércol de ganado con una carga promedio de 4.45 gSV/L al día, pH de 7.5 ± 1 . Se alimentaron con 33.3 mM de acetato, 27 mM de propiónato, 22.7 mM de *n*-butirato/iso-butirato y 19.6 mM de *n*-valerato/iso-valerato y, se utilizó un TRH de 15 días. Ellos encontraron que las concentraciones de acetato, propiónato, butirato y valerato utilizadas, no produjeron cambios bruscos de pH y el acetato mejoró el rendimiento de metano de 208 a 226 mL de CH₄ por g SV/día.

- **Temperatura**

Una revisión de Amani y colaboradores [29] menciona que, la estabilidad de diferentes especies microbianas a los cambios de temperatura, dependen de la termo estabilidad de sus proteínas intracelulares por lo cual, varias investigaciones recomiendan fluctuaciones de temperatura no mayores a 3 °C por día. De acuerdo a la revisión de Chen [38] las aguas residuales con concentraciones elevadas de amonio son más fácilmente inhibidas y menos estables a temperaturas termofílicas que a mesofílicas.

De acuerdo a Raposo y colaboradores [27], la temperatura de operación en la digestión anaerobia pueden clasificarse como: termofílica (45-60 °C), mesofílica (20-45 °C) y psicofílica (menor a 20 °C).

Bravo y colaboradores [52] investigaron el efecto de la temperatura en la hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis en digestión anaerobia mesofílica. Ellos realizaron experimentos batch utilizando matraces con volúmenes totales de 100, 200 y 250 mL para cada ensayo. Adicionaron almidón (0-3.0 g/L), glucosa (0.1-1.0 g/L) y ácido acético (0.1-25.0 g/L) para los ensayos de hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis respectivamente. Probaron distintas temperaturas para los diferentes ensayos: hidrólisis (12, 22, 30, 37 y 45 °C), acidogénesis (12, 22, 30, 37, 42 y 45 °C) y metanogénesis (12, 25, 37 y 45 °C).

Utilizaron bicarbonato de sodio (1 g/g DQO) como solución reguladora. El inóculo provino de un digester de aguas residuales y se adicionó a razón de 1.03 ± 0.14 g SSV/L. Obtuvieron una máxima degradación: para la hidrólisis a 37 °C, para la acidogénesis entre 30 y 45 °C, y para la metanogénesis entre los 30 y 35 °C por lo que ellos concluyeron que estas temperaturas son las óptimas para las diferentes etapas, y también mencionaron que variaciones de ± 5 °C ocasionan decrementos de hasta un 50% en las eficiencias.

Kiyohara y colaboradores [53] compararon la digestión de lodos a temperatura termofílica y mesofílica utilizando lodo sin tratar que fueron filtrados en malla (4 mm) antes de introducirlo en los reactores. El inóculo anaerobio se obtuvo de un digester mesofílico de tratamiento de aguas residuales. Se realizaron dos experimentos: a) se utilizaron reactores completamente mezclados a 36 (mesofílico) y 55 °C (termofílico) y se mantuvieron tiempos de retención de sólidos (TRS) de 2.5, 5, 10, 20 y 40 días para evaluar la digestión en continuo; b) para evaluar un sistema batch se usaron matraces a los cuales se le adicionaron 60 mL de inóculo y 20 mL de lodo sin tratar, se incubaron a 36 y 55 °C con agitación continua a 80 rpm. Obtuvieron como resultados: a) con un TRS de 20 días, mayor eficiencia de remoción de lodo sin tratar de 53.3 y 27.4 % para los procesos termofílico y mesofílico respectivamente; b) la concentración de amonio ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) y TRS se incrementaron en ambos procesos, de 553 a 1340 mg/L y de 2.5 a 40 días para las condiciones mesofílica, de 409 a 705 mg/L y, de 2.5 a 40 días para la condición termofílica.

- **Tiempo de retención hidráulica**

Amani y colaboradores [29] mencionan que el TRH varía de acuerdo al sistema utilizado y detalles del proceso tales como temperatura, composición del residuo y tecnología (tipo de reactor). También indican que, para permitir condiciones estables en el proceso de digestión anaerobia se requiere el doble del TRH respecto a la tasa de crecimiento de los microorganismos metanógenos.

Kim y colaboradores [54] investigaron los efectos del TRH y la temperatura en un proceso de digestión anaerobia de residuos alimentarios. Diseñaron un digester anaeróbico cilíndrico (200 mm diámetro x 350 mm de altura) con un volumen total de 11 L, equipado

con válvulas de muestreo. Dividieron el sistema en tres etapas: a) hidrólisis/acidogénesis; b) acidogénesis, y c) metanogénesis. El sustrato proporcionado consistió en comida rápida (supermercado). El efluente de la etapa acidogénica sirvió de sustrato para la metanogénesis. Como inóculo en el reactor de metanogénesis se utilizó una mezcla de bacterias metanogénicas aisladas de una planta de tratamientos de aceites y estiércol. Al reactor de acidogénesis se le colocaron bacterias del género *Clostridium*. El pH, las concentraciones de DQO, amonio y la relación C/N del sustrato fueron de 4.5, 17,000 mg/L, 380 mg/L y 15.8 respectivamente. Manejaron el funcionamiento a TRH de 8, 10 y 12 días, así como a temperaturas entre 40, 45, 50 y 55 °C. Obtuvieron que: a) mientras mayor TRH, mayor la eficiencia de remoción, y producción de biogás independientemente de la temperatura; b) con TRH de 12 días la eficiencia de remoción se incrementa hasta un 50 %, en tanto con TRH de 8 días el pH disminuye causando un decremento en la remoción, y producción de biogás, c) obtuvieron una remoción máxima del 83 % a 45 y 50 °C; d) a temperaturas menores de 40 y mayores de 55 °C el proceso disminuye su eficiencia.

- **Nutrientes y elementos traza**

Según una revisión realizada por Amani y colaboradores [29] el nitrógeno y fósforo en sus formas solubles como amonio (NH_4^+) y fosfato (HPO_4^-) son nutrientes requeridos por los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia. De acuerdo a Speece [9] concentraciones entre 50 y 200 mg/L de amonio, 10mg/L de fosfatos son los adecuados y elementos traza de micronutrientes en la forma de cloruros: FeCl_2 1 mg/L, CoCl_2 0.1 mg/L, NiCl_2 0.1 mg/L, y ZnCl_2 0.1 mg/L ya que actúan como cofactores enzimáticos. Por otra parte, Scherer y Sahn [55] mencionan que el sulfuro es necesario a concentraciones entre 1 y 25 mg/L.

1.5. Reactores anaerobios de alta tasa

Los procesos de digestión anaerobia para la producción de biometano se basan en el concepto de retención de biomasa viable al inmovilizar el lodo bacteriano. Entre los métodos utilizados se encuentran [56]:

- Formación de agregados de lodos en combinación con la separación de gas. Realizado en reactores de manto de lodos.
- Uso de materiales de soporte para mejorar la retención y fijación bacteriana en los reactores. Realizado en reactores anaerobios de columna empacada

1.5.1. Reactor anaerobio de columna empacada (RACE)

Se caracteriza por tener un medio empaquetado utilizado para aumentar la superficie de contacto que por ende provee una mayor superficie de crecimiento microbiano y evita el “lavado” (arrastre de las bacterias por el flujo provocando su salida del reactor) de las mismas, mejorando finalmente los rendimientos del sistema (figura 1.3). La capa de microorganismos es conocida como biopelícula. [37].

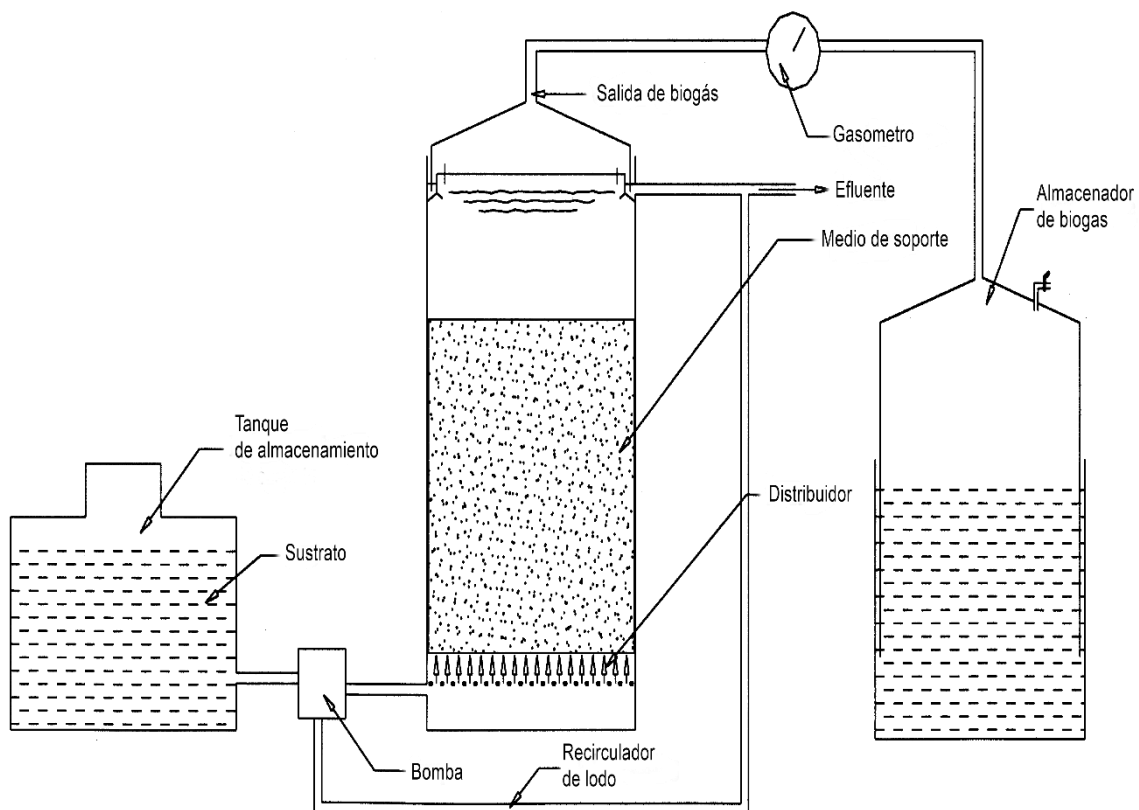


Figura 1.3 Modelo de un reactor anaerobio de columna empacada [56]

Moayyed [57] evaluó un sistema para mejorar la remoción orgánica y de nutrientes mediante un reactor de columna empacada de alta tasa (volumen 4 L, de plexiglás) para el tratamiento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales. Fue empacado con tereftalato de polietileno (PET) y operado a una temperatura de trabajo de 20 °C. Para el desarrollo de la biopelícula utilizaron un flujo de agua residual sintética compuesta de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (124 mg/L), NaHCO_3 (286 mg/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (71 mg/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (29 mg/L), KH_2PO_4 (79 mg/L) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg/L) por 60 días. Se obtuvo un alto grado de retención biológica en el empaque y la remoción de 0.515 kg DQO/m³-día de materia orgánica en un TRH de 8 h.

Rangaraj y colaboradores [58] evaluaron la importancia de las dimensiones del material de empaque utilizando tres reactores de columna empacada de plexiglás (10 L) con dimensiones de (10 cm de altura y 12.5 cm diámetro), equipados con chaquetas para mantener la temperatura a 35 °C, y un plato perforado inferior utilizado para distribuir uniformemente el efluente en el reactor. También se utilizó una bomba peristáltica para la inyección del influente y recirculación (caudal 10 L/h, velocidad entre 0.8 y 0.9 m/h). Como empaque utilizaron anillos de polietileno con dimensiones diferentes para cada reactor: a) 9 mm diámetro (d) x 7 mm alto (h), 800 m²/m³ área superficial (as); b) 35 mm (d) x 29 mm (h), 320 m²/m³ (as); c) 45 mm (d) x 35 mm (h), 320 m²/m³ (as). Se adicionó 1 L de lodo anaeróbico proveniente de un reactor en funcionamiento y nutrientes con una relación de DQO/N/P de 400/7/1. Concluyeron que el reactor (a) con el área superficial mayor, fue mejor al soportar cargas orgánicas entre 22 y 42 kg DQO/m³-día con una eficiencia de remoción del 80 %. El soporte favoreció la retención de sólidos lo cual aportó mayor retención de los microorganismos.

Scoma [59] evaluó el efecto del TRH para la producción de ácidos grasos volátiles e hidrógeno durante la digestión acidogénica de aguas residuales de almazara (mecanismo para obtener aceite de oliva) utilizando un reactor de columna empacada de vidrio (volumen 0.796 L, 40 cm de altura y 5 cm de diámetro, empacado con cubos de cerámica de 25 x 25 y 18 mm). Se utilizó un inóculo precharacterizado para la generación de ácidos grasos volátiles a 35 °C y pH 7 y se adicionaron al 10 % v/v en el reactor. Se evaluaron 4 TRH 7, 5, 3 y 1 día, a concentraciones de 5.54, 7.76, 12.93 y 38.79 g/L día. Observaron que, mientras mayor sea el TRH menor es la cantidad de hidrógeno y ácidos grasos producidos.

Obtuvieron una producción de 10 g/L de ácidos grasos volátiles siendo el butírico el de mayor proporción seguido del acético, así como, una producción de hidrógeno de 7 L/m³ por hora a TRH de 1 día.

Leite y colaboradores [60], utilizaron un reactor de columna empacada (volumen 2480 mL, diámetro 50 mm) para la producción de hidrógeno y ácidos grasos volátiles. El sustrato utilizado fue agua residual sintética y como material de soporte utilizaron granos de arcilla esféricas (entre 4.8 y 6.3 mm diámetro). El inóculo fue obtenido de fermentación natural de agua sintética, posteriormente se recircularon 2 L en el reactor durante una semana para generar la biopelícula. Se varió la carga orgánica de 24 a 192 kg/m³-día, y alcalinidad (0, 1000 y 2000 mg/L de bicarbonato de sodio), temperatura 30 ± 1 °C. Obtuvieron una producción de 2037 ± 350 mg/L de AGVs al añadirle una concentración de glucosa de 4000 mg/L prevaleciendo el ácido acético y butírico, y 1.81 mol de H₂ por mol de glucosa.

1.5.2. Reactor anaerobio de manto de lodos (UASB por sus siglas en inglés)

Consiste en un flujo ascendente de agua residual que pasa a través de una columna densa de lodos que contiene una alta actividad microbiana. El proceso se basa en el desarrollo de gránulos densos (diámetros de 1-4 mm) formados por la inmovilización misma de las bacterias anaeróbicas, factor considerado como esencial para un funcionamiento exitoso [30] (figura 1.4). De acuerdo a una revisión de Habeeb y colaboradores se recomienda utilizar cargas orgánicas entre 2 y 4.5 kg DQO/m³-día, pH de 7, velocidad de flujo ascendente entre 0.5 y 1.5 m/h, alcalinidad entre 250 y 950 mg/L de CaCO₃ para obtener buena calidad de crecimiento de gránulos, e igualmente la adición de entre 80 y 150 mg/L de Ca²⁺ y 300 mg de hierro para acelerar y mejorar el proceso de granulación [61].

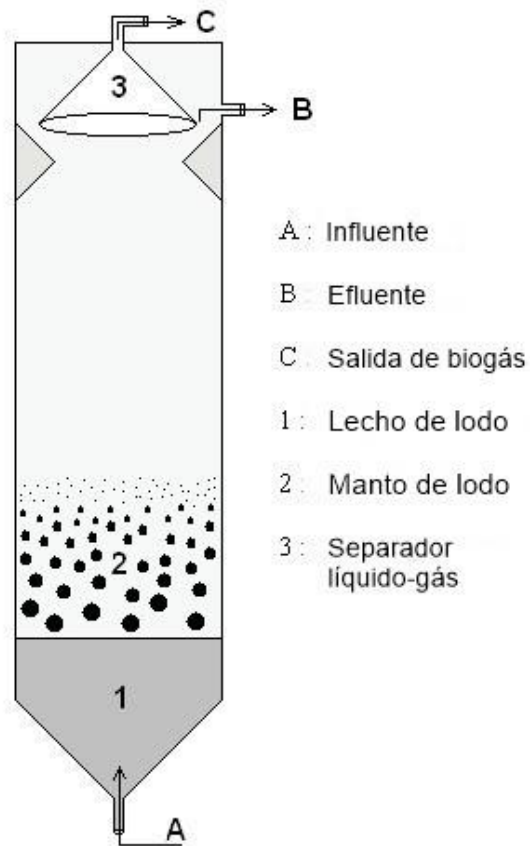


Figura 1.4 Modelo de un bioreactor UASB [61]

Entre las ventajas del sistema UASB respecto a otros reactores son: a) disponibilidad de lodo granular y floculento; b) no requiere medio de soporte; c) alto contenido de biomasa; d) provee de TRH cortos (< 1 día); e) produce burbujas de gas que proveen agitación; e) soporta cargas orgánicas de hasta 30 kg DQO/m³·día. Entre sus desventajas se encuentran: a) susceptibilidad a la temperatura y cambios bruscos de carga orgánica; b) lavado de las células, flotación y desintegración del lodo granular; c) provoca concentraciones de sulfato elevadas [62, 63].

Vlyssides y colaboradores [64] investigaron como afecta el hierro en la granulación bacteriana en un UASB. Operaron dos reactores de 20 L de volumen de plexiglás a 35 °C, TRH de 1 día alimentado con concentraciones entre 1,500 y 11,000 mg/L de agua residual sintética como sustrato, uno de los reactores (R1) fue suplementado con hierro (Fe²⁺/DQO 0.01 g/g) en tanto que el segundo no (R2). Ellos obtuvieron un incremento del 40 % del

tamaño granular del lodo bacteriano en el R1, en tanto que en el R2 no se registró el incremento. Este aumento de tamaño granular causó que en el R1 se observara una mejor remoción de materia orgánica de 97 % mientras que en el R2 fue del 85 % en promedio al utilizar cargas orgánicas de 3 g DQO/L·día.

Mijalova y colaboradores [65] evaluaron el tratamiento de aguas residuales domésticas en un sistema UASB (15 L de volumen de trabajo, 0.15 m diámetro interno, 1.30 m de altura de las cuales 0.80 m fue para la columna de lodo) con separador cónico invertido de gas-sólido-líquido. Se aplicaron cargas orgánicas entre 4, 7, 10 y 15 kg DQO/m³·día, TRH 0.88, 0.71, 0.44 y 0.30 h y velocidades de flujo ascendente (V_{up}) de 0.050, 0.062, 0.1 y 0.146 m/h respectivamente. Para eliminar sólidos suspendidos realizaron coagulación con 60 mg/L de sulfato de aluminio. El reactor se inoculó con 15 L de lodo granular y se estabilizó por 90 días utilizando agua residual doméstica (entre 1 y 4 kg DQO/m³·día). Se trabajó a pH de 7.4 y temperatura ambiente (entre 19.7 y 27.3 °C). Obtuvieron remoción de DQO del 90% y máxima producción de metano de 0.095 m³/día utilizando 15 kg DQO/m³·día de carga orgánica.

Esparza y colaboradores [66], evaluaron la afectación de la carga orgánica en la digestión anaerobia de aguas residuales industriales del cereal utilizando un UASB de 24 L. Se operó con un TRH de 5.2 h a temperatura ambiente de la región de Toluca, México (0-22 °C). Se proporcionaron cargas orgánicas de 3.88, 5.71 y 7.54 kg DQO/m³·día (se realizó al influir concentraciones de DQO de 841, 1245 y 1647 mg/L). El pH y alcalinidad se mantuvieron en un valor entre 7.2 y 900 mg/L como bicarbonato, respectivamente. Necesitaron un año para la estabilización del reactor, que al final les proporcionó una eficiencia de remoción entre 82-92 % en todas las cargas orgánicas utilizadas de 3.88, 5.71 y 7.54 kg DQO/m³·día.

1.6. Digestión anaerobia en dos etapas

De acuerdo a Demirel y colaboradores [67], las ventajas de la digestión anaerobia en dos fases son:

- Permite la selección y el enriquecimiento de las diferentes bacterias en cada digestor.

- Optimiza las condiciones del grupo hidrolítico-acidogénico al igual que el grupo acetogénico-metanogénico.
- Aumenta la producción de metabolitos acidogénicos (ácido acético) para proporcionárselo a los microorganismos acetogénicos y metanógenos.
- Reduce el volumen total del reactor.
- Mejora la estabilidad debido a la naturaleza heterogénea de la población bacteriana lo cual ayuda a disminuir las fluctuaciones de carga orgánica en períodos cortos de TRH.

Solmaz y colaboradores [68], investigaron el efecto de la recirculación en un sistema semicontinuo de dos fases de la digestión anaerobia. Utilizaron dos sustratos, celulosa y almidón; un reactor de agitación completa (SCTR) de 14.5 cm de diámetro y 18.5 cm de alto, volumen 3 L para la etapa acidogénica (temperatura trabajo 55 °C) y un reactor UASB (diámetro 6.4 cm y altura 70 cm, volumen 2.25 L) para la fase metanogénica (temperatura de trabajo 34 °C) ambos construidos de polimetilmetacrilato. El reactor SCTR fue inoculado con 2.5 L de lodo anaerobio (incubado 3 días a 55 °C) proveniente de una planta de tratamiento y 0.5 L de solución nutritiva (relación de C:N:P:S de 500:20:5:3), y el UASB con 1.3 L de lodo granular. Se evaluaron dos sistemas de trabajo, en el primero se recirculó el efluente del UASB hacia el SCTR (sistema cerrado) y en el segundo no (sistema abierto). Para separar la materia particulada del efluente del SCTR y evitar su entrada al UASB, se colocó un sedimentador (100 mL). Las cargas orgánicas evaluadas fueron entre 2 a 20 g SV/L día. Obtuvieron: a) acumulación de AGV hasta de 8 g/L en el reactor SCTR; b) el pH del sistema cerrado se estabilizó en 6 para el SCTR y 8 para el UASB, y c) mayor estabilidad en el sistema cerrado con cargas orgánicas de 8 g SV/L·día (8,000 mg/L de DQO) con remoción del 45.6 % a TRH de 1.5 días.

Ince [10] evaluó un sistema de dos fases utilizando dos reactores acoplados. El primer reactor (reactor de pre acidificación) fue completamente mezclado (90 rpm), el segundo reactor (reactor de metanogénesis) fue de filtro anaeróbico con flujo ascendente (UFAF por sus siglas en inglés). Los dos reactores fueron manufacturados en PVC (cloruro de polivinilo) con volúmenes de 10 L para el primero y 31 L para el segundo (cilíndrico de 1 m de alto y 20 cm de diámetro con tres platos a 5 cm de distancia uno de otro con anillos de PVC como empaquetado). Ambos reactores contaron con un termostato y un sistema de

baño maría por recirculación para mantener la temperatura entre 33 y 36 °C, y la dosificación de NaOH 1M para conservar el pH entre 5.5 y 6.0 para el primer reactor y entre 7.0 y 7.5 para el segundo. Se ingresó al reactor de pre acidificación una carga orgánica de 12 kg DQO/m³·día que aumentó hasta 23 kg DQO/m³·día, se mantuvo la temperatura entre 34 y 36 °C y el pH entre 5.7 y 5.8. El efluente del reactor de pre acidificación se colocó en un recipiente de 5 L para el ajuste de pH antes de ingresarlo al de metanogénesis. Obtuvieron para todo el sistema: a) eficiencia de remoción del primer reactor entre 10 y 40 % con producción de metano entre 0 a 0.15 m³ CH₄/kg DQO_{removido}; b) generación de 1350 mg/L de AGVs con predominancia de ácido acético, propiónico y *n*-valérico; c) el reactor de pre acidificación operó con cargas orgánicas de hasta 23 kg DQO/m³·día con un TRH de 0.5 días; d) después del acoplamiento obtuvieron remociones de DQO entre 90 y 95 % a TRH de 2 días operando con cargas orgánicas de 7 kg DQO/m³·día.

Guang y colaboradores [69], evaluaron la eficiencia de un sistema de dos fases para la digestión aeróbica de lodos pretratados utilizando reactores completamente mezclados (SCTR), de vidrio procesado. Para la fase de acidogénesis (volumen de 9 L) se utilizó un inóculo que constó de bacterias fermentadoras de etanol previamente aclimatadas y para la etapa metanogénica (volumen de 31.5 L), un lodo anaerobio de una planta de tratamiento. Para el control de las temperaturas se utilizó la recirculación con baño maría para mantener la temperatura (35 ± 1 °C). Todo el sistema se mantuvo con un TRH de 16.2 días y una carga orgánica entre 0.98 y 3.13 kg SV/m³·día. El pH se mantuvo entre 4 y 4.5 en la acidogénesis y entre 6.8 y 7.2 para la metanogénesis. Obtuvieron: a) remoción entre 59.4 y 61.6 % al operar con carga orgánica de 0.98 kg SV/m³·día; b) remoción del 57.3 % al operar con 3.13 kg SV/m³·día, y c) producción de 0.018 L H₂/g SV (2.3 L/día) en la etapa acidogénica y 15 L/día de metano en la segunda fase.

1.7. HIPÓTESIS

La digestión anaerobia en dos etapas del nejayote utilizando un RACE acoplado a un UASB generará condiciones que permitan mejorar el control del proceso anaeróbico reduciendo las cargas orgánicas y produciendo un mayor rendimiento de metano que el tratamiento con un RACE sin acoplar.

1.8. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el desempeño del proceso de digestión anaerobia midiendo la remoción orgánica y el rendimiento de producción de metano en un sistema de dos fases que consta de un RACE (reactor anaerobio de columna empacada) acoplado a un UASB (reactor anaerobio de manto de lodos con flujo ascendente) durante el tratamiento de nejayote.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar físico-químicamente el nejayote y los efluentes resultantes del proceso de digestión anaerobia.
- Estimar los parámetros operacionales de remoción de DQO, producción de AGVs, y contenido de metano en el biogás en el RACE, antes del acoplamiento con el UASB.
- Determinar el efecto del pH y AGVs en la degradación anaerobia en dos etapas del nejayote.
- Evaluar el rendimiento de remoción orgánica y producción de metano de los biorreactores.

CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Obtención del nejayote

Se obtuvieron muestras de nejayote provenientes de la empresa Harinera Yucatán S.A de C.V Grupo Maseca (GRUMA). Estas muestras fueron transportadas en bidones de 25 L de policarbonato de alta densidad y fueron conservadas en un cuarto frío a -4 °C de acuerdo al método 1060 de colección y preservación de muestras [70]

2.1.1. Caracterización del nejayote

Para la caracterización físico-química del nejayote se utilizaron los métodos descritos en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Caracterización físico-química del nejayote

Medición	Método
Temperatura	Método Hach sension 156/54650-18
pH	Método Hach sension 156/54650-Sección 3
Conductividad	Método Hach sension 156/54650-Sección 4
Solidos Suspendidos Totales (SST)	Método 2540, Standard Methods 2005
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Colorímetro Hach DRB-890/8000
N _T	Colorímetro Hach DRB-890/10072
N-NH ₃	Colorímetro Hach DRB-890/10031
PO ₄ ³⁻	Colorímetro Hach DRB-890/8190
SO ₄ ²⁻	Colorímetro Hach DRB-890/8151
S ²⁻	Colorímetro Hach DRB-890/8131
AGVs	Cromatografía de gases

N_T, nitrógeno total; N-NH₃, amonio libre; PO₄³⁻, fosfato; SO₄²⁻, sulfato; S²⁻, sulfuro

2.2. Inóculo

Se utilizó 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, azúcar 5 g/L, y agua de la llave 1,000 mL de acuerdo a lo descrito por Poggi y colaboradores [71].

2.3. Reactores utilizados

Se emplearon dos reactores en serie: reactor anaerobio de columna empacada (RACE) acoplado a un reactor anaerobio de manto de lodos con flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés). Los dos reactores tienen la finalidad de manipular las 4 fases de la digestión anaerobia en dos etapas, como sigue: El RACE fue empleado para realizar la etapa acidogénica (hidrólisis y acidogénesis), y el UASB para la etapa metanógena (acetogénesis y metanogénesis).

2.3.1. Ensamble del RACE

El RACE consistió de un reactor cilíndrico con altura de 44 cm y diámetro interno 10.16 cm obteniendo un volumen total de 3.567 L; se construyeron por duplicado.

Se utilizó material inerte para el empacado que constó de 355 anillos de plástico de PVC con diámetro de 1.27 cm y 1 cm de altura, lo que proporcionó una superficie de contacto total de 0.228 m².

Como soporte del empacado, a 4 cm de altura de la base del reactor se colocó un plato de acrílico con agujeros de 8 mm de diámetro y una malla metálica de acero inoxidable con tejido asargado circular con diámetro de 10.14 cm y luz de malla de 1.2 mm para permitir la distribución y retención de sólidos, respectivamente.

Para la aspersion se colocó un rociador de bruma de una sola cabeza con caudal ajustable marca Orbit® (figuras 2.1 y 2.2).

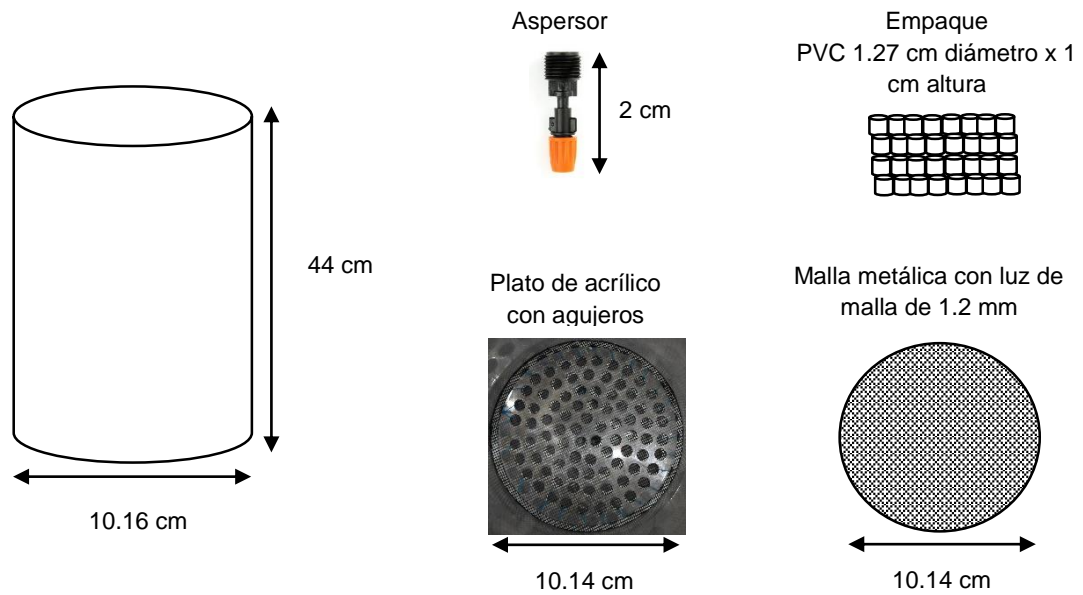


Figura 2.1 Dimensiones de las secciones y materiales utilizados para el ensamble del RACE

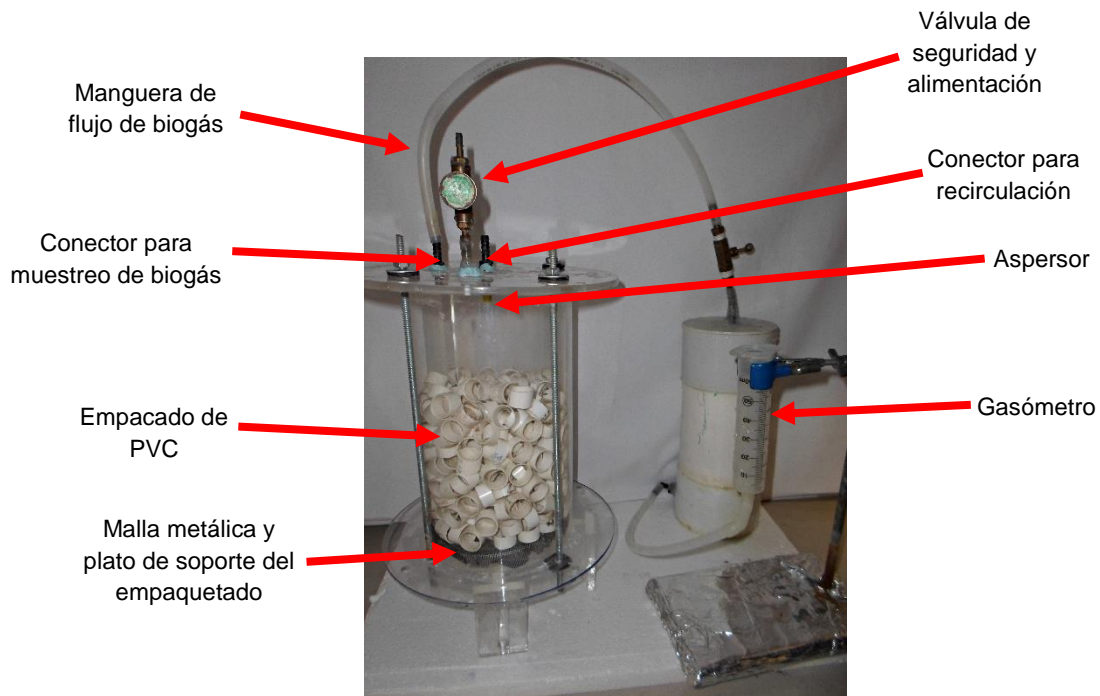


Figura 2.2 Ensamble del RACE

2.3.2. Ensamble del UASB

El UASB se ensambló con PVC obteniéndose un volumen total de 2.78 L.

Se colocaron dos reductores de diámetro de PVC para facilitar la granulación y sedimentación del inóculo.

El sistema de calentamiento fue por transferencia de calor a través de una manguera de polietileno de alta densidad enrollada alrededor del reactor y conectada a un baño recirculador Lauda Alpha RA8.

Se colocó un sistema de enchaquetado de polietileno espumado y fibra de poliéster para evitar la pérdida de calor, figuras 2.3 y 2.4.

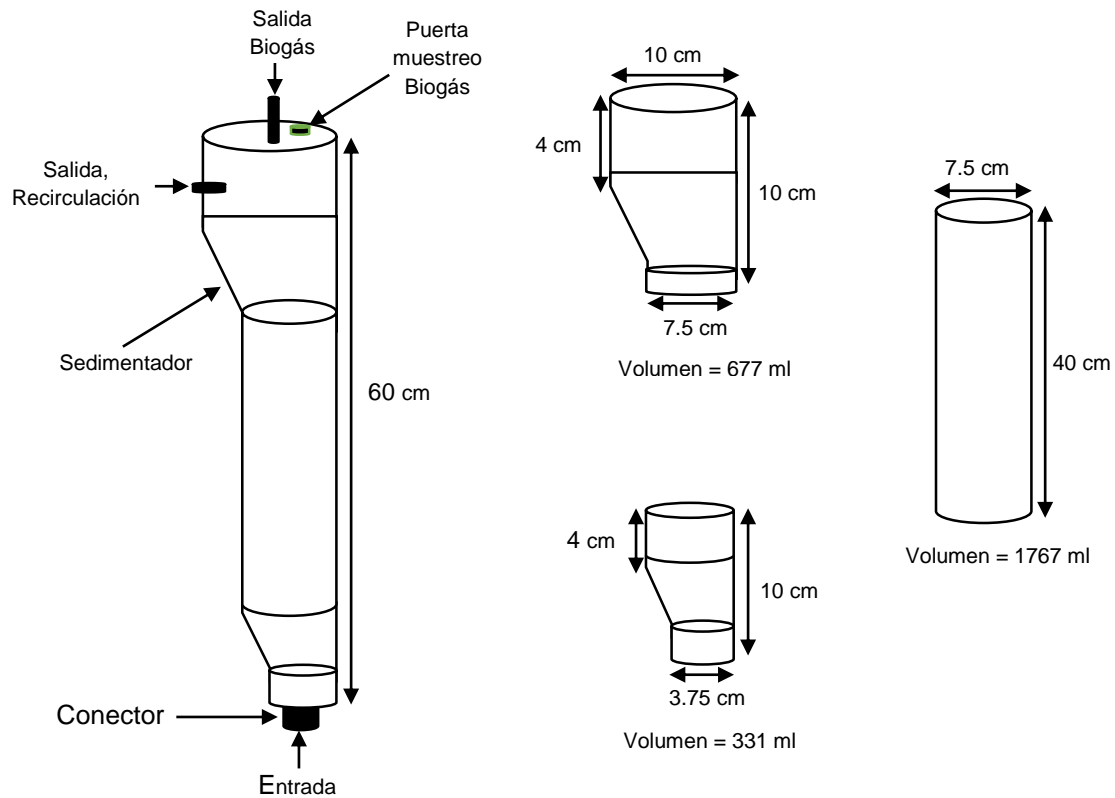


Figura 2.3 Dimensiones de las secciones y materiales utilizados para el ensamble del UASB

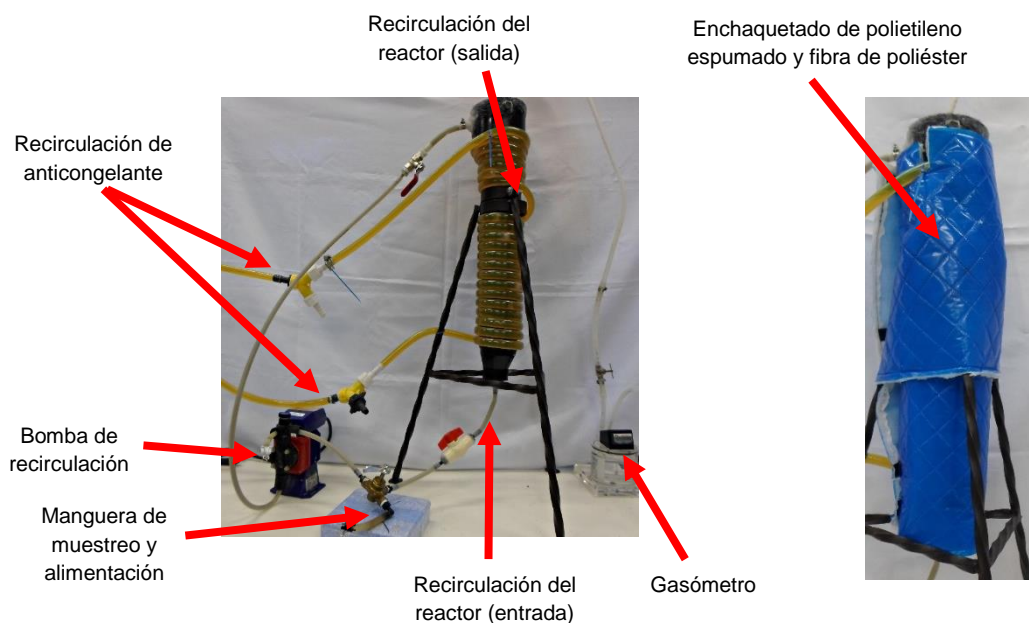


Figura 2.4 UASB ensamblado con sistema de calentamiento y recirculación

2.4. Acoplamiento de los reactores

El acoplamiento de los reactores se realizó en 3 fases:

2.4.1. Fase 1: Aclimatación del UASB

Durante la fase de aclimatación, el UASB estuvo bajo las condiciones de temperatura de 37 °C, pH entre 6.8 y 7.4 de acuerdo a Amani y colaboradores [29], y con velocidad de flujo ascendente (V_{up}) = 0.9 m/h de acuerdo a Hina [72]. Estos autores sugieren mantener estos parámetros para un buen arranque y funcionamiento del reactor.

El UASB se llenó con inóculo mixto, se comenzó la recirculación y se procedió con la aclimatación en modo semicontinuo alimentándolo con agua residual sintética (ARS) con cargas orgánicas en aumento de 0.39 a 1.9 g DQO/L·día, de acuerdo a la tabla 2.2. Durante todo el proceso se monitorearon los parámetros de pH, concentración de AGVs totales, remoción de la DQO y contenido de metano en biogás a diario.

La toma de decisión de cuando el UASB ha alcanzado la estabilidad a determinada carga orgánica durante la aclimatación se realizó de acuerdo a lo establecido por Alzate y colaboradores [73] quienes indican que la estabilidad de la puesta en marcha se da cuando

los parámetros de AGVs totales sean ≤ 1500 mg/L, la remoción de DQO sea ≥ 50 % y el contenido de metano en biogás haya alcanzado un porcentaje ≥ 50 %. También por lo mencionado por Azbar y colaboradores [74] quienes utilizaron como parámetro de estabilización la obtención de una variación menor al 10 % por cinco días consecutivos en remoción de DQO, concentración de AGVs y contenido de metano en biogás.

Composición del ARS (en g/l): sacarosa (4,0); ácido acético glacial (0,5); NH_4Cl (1,0); K_2HPO_4 (0,2); NaHCO_3 (1,0); Na_2CO_3 (1,0); y 1,0 ml/l de trazas de metales [75].

Tabla 2.2 Proceso de aclimatación para el UASB

TRH (días)	Carga orgánica (g DQO/L·día)
12.2	0.39
11.8	1.2
9.4	1.9

TRH, tiempo de retención hidráulica; DQO, demanda química de oxígeno

2.4.2. Fase 2: pruebas preliminares en el RACE

Se realizaron dos pruebas iniciales en modo batch para encontrar los días específicos en los cuales los valores de concentración de AGVs, remoción de materia orgánica y porcentaje de metano CH_4 son ideales para el acoplamiento de los reactores.

Como parámetro de referencia de condicionamiento para elegir los días de acoplamiento de los reactores, se utilizó el tiempo promedio en el que el RACE alcanzó una concentración de AGV ≤ 2.5 g/L y una remoción de DQO y ST ≥ 20 % de acuerdo a lo mencionado por Zhiyang y colaboradores [50].

La primera prueba de degradación del nejayote se realizó sin adición de inóculo para lo cual el RACE se llenó con 3 L de nejayote para evaluar si existen microorganismos propios del nejayote que puedan generar las condiciones establecidas previamente para el acoplamiento.

La segunda prueba se efectuó con adición de inóculo. En este caso el RACE se llenó con nejayote (2.7 L) y una mezcla de inóculo mixto (0.3 L) a razón del 11.1 % del volumen total.

2.4.3. Fase 3: Acoplamiento del RACE con el UASB

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante las pruebas preliminares que se discutirán más adelante, se realizaron tres experimentos de acoplamiento del RACE con el UASB con 2 variantes que son el día de acoplamiento y la DQO del nejayote tal como se indica en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Condiciones establecidas en cada experimento para el acoplamiento de RACE con el UASB

Experimento	DQO de inicio	Día del acoplamiento
A1	22 g/L	12
A2	22 g/L	8
A3	29 g/L	8

A1, experimento de acoplamiento 1; A2, experimento de acoplamiento 2; A3, experimento de acoplamiento 3

Durante el acoplamiento, para cada experimento el efluente proveniente del RACE se igualó a la carga orgánica máxima de aclimatación del UASB de 1.9 g DQO/L día, previamente a ser introducido al UASB, variando el flujo de entrada en este último.

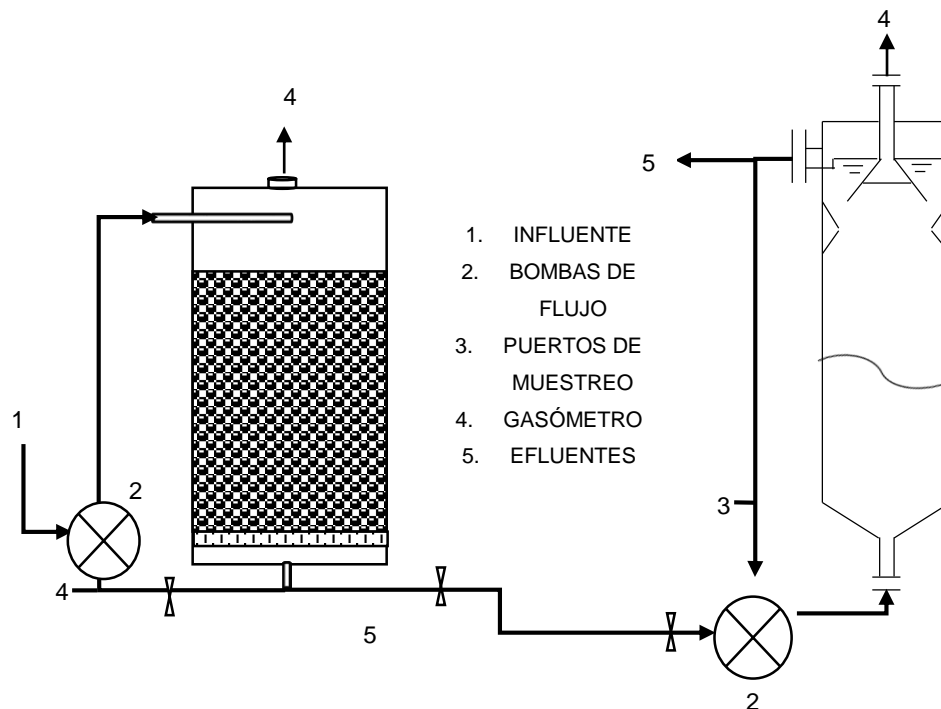


Figura 2.5 Esquema del acoplamiento de los reactores

Parámetros de control evaluados en los reactores (tabla 2.4).

Tabla 2.4 Parámetros evaluados en los reactores

Análisis	Frecuencia	Método
Flujo de biogás	Diario	Gasómetro*
Caracterización de biogás	Diario	Cromatografía de gases
Temperatura	Diario	Método Hach sension
pH	Diario	156/54650-18
ST	Diario	Método 2540, Standard Methods 2005
DQO	Diario	Colorímetro Hach DRB-890/8000
N_T	Tres veces por semana	Colorímetro Hach DRB-890/10072
N-NH₃	Tres veces por semana	Colorímetro Hach DRB-890/10031
PO₄³⁻	Tres veces por semana	Colorímetro Hach DRB-890/8190
SO₄²⁻	Tres veces por semana	Colorímetro Hach DRB-890/8151
S²⁻	Tres veces por semana	Colorímetro Hach DRB-890/8131
AGVs	Diario	Titulación [76] Cromatografía de gases [77]

ST, sólidos totales; DQO, demanda química de oxígeno; N_T, nitrógeno total; N-NH₃, nitrógeno amoniacal libre, PO₄³⁻, fosfato; SO₄²⁻, sulfato; S²⁻ sulfuro; AGVs, ácidos grasos volátiles.

El volumen de gas generado por el RACE se midió mediante una variante del método alemán DIN 38 414 (S8) basado en el desplazamiento de solución salina acidificada. Al generarse el biogás se produce un espacio equivalente al volumen de solución desplazada, la cual puede ser medida [78].

Para la medición del biogás en el UASB se utilizó un miligas counter MGC-1.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización fisicoquímica del nejayote

Las características del nejayote obtenidas y comparadas con otros estudios se muestran en la tabla 3.1.

En este estudio se observó que el nejayote presenta un pH alcalino de 9.0 ± 0.6 y una DQO de 18.4 ± 4.3 g/L resultados parecidos a lo reportado por otros autores (figura 3.1). Según Nogueira y colaboradores [79] el pH elevado se debe a la presencia de residuos de hidróxido de calcio y la DQO a los restos de almidón y pericarpio. Por otra parte la cantidad de sólidos totales 25 ± 5 g/L fue mayor a lo reportado en la literatura, lo cual podría ser atribuido a la diferencia entre los procesos de nixtamalización y el origen de la muestra [80].

Tabla 3.1 Caracterización físico-química del Nejayote

Parámetro	Resultados	Resultados de otros autores (Ver tabla 1.2)
pH	9 ± 0.6	11.6, 6.2 y 11.0 [20-22]
ST (mg/L)	$25,000 \pm 500.0$	13,310.0 [20]
DQO (mg/L)	$18,400 \pm 4,300.0$	13,650.0 y 40,058.1 [20,23]
DBO (mg/L)	$5,800 \pm 1,300.0$	7,875.0 y 14,218.7 [23]
N _T (mg/L)	209 ± 7.0	118.0 [30]
N-NH ₃ (mg/L)	2 ± 1.0	NE
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	7.6 ± 0.6	27.0 [30]
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	13 ± 1.0	NE

N_t, nitrógeno total; N-NH₃, nitrógeno libre, PO₄³⁻, fosfato; SO₄²⁻, sulfato; AGV, ácidos grasos volátiles. NE, No encontrado

El nitrógeno total y libre resultaron ser superiores en este estudio, con valores de 209 ± 7 mg/L y 2 ± 1 mg/L, respectivamente. De acuerdo a otros autores, concentraciones de nitrógeno total entre 1.7-14 g/L y nitrógeno libre mayores de 150-250 mg/L inhiben la metanogénesis en un 50 % [38, 81]. Las concentraciones de N_T y $N-NH_3$ pueden variar de acuerdo al sustrato, concentración de inóculo, condiciones de aclimatación y parámetros del reactor tales como temperatura y pH [82].

De igual forma en este estudio el sulfato resultó en 13 ± 1 mg/L, lo cual aporta una relación de DQO/ SO_4^{2-} mayor de 1000:1 mientras que el fosfato fue menor a lo reportado en otros trabajos. Según la literatura relaciones de DQO/ SO_4^{2-} mayores a 8/1 y concentraciones de 10 mg/L de fosfatos son benéficos para la digestión anaerobia, por lo cual, la presencia de estos dos componentes en el nejayote no representó ningún riesgo de toxicidad en las condiciones de este trabajo. [43, 83].

3.2. Operación de los reactores

3.2.1. Aclimatación del UASB

En estudios anteriores se indica que la efectividad y estabilidad en la aclimatación de un reactor depende fuertemente del periodo de arranque debido al efecto de parámetros físicos, químicos y biológicos que perturban la disponibilidad y crecimiento de los microorganismos en el inóculo [63], por lo cual, diversos autores han adoptado criterios para declarar que el periodo de arranque y la estabilidad durante la aclimatación se han completado. Sung y Tao [84] asumieron que el monitoreo de AGVs, remoción de DQO y producción de biogás no deben variar más del 5 % por 5 días consecutivos. En tanto que Azbar y colaboradores [73] utilizaron una variación menor al 10 % y Álvarez y colaboradores [85] indican que se necesita un periodo mínimo equivalente a dos veces el TRH de estabilidad de los distintos parámetros para que sea funcional.

En este trabajo se consideró como aclimatación estable del UASB cuando el reactor mantuvo los parámetros de AGVs; remoción de DQO y contenido de metano en biogás con una variación menor al 10 % durante 5 días consecutivos hasta alcanzar una carga orgánica de 1.9 g DQO/L·día. Para evitar la intoxicación y posible acidificación del mismo se optó por aumentar la carga orgánica en tres periodos, 0.39, 1.2 y 1.9 g DQO/L·día.

En la literatura se menciona que durante el periodo de aclimatación se genera un balance entre las poblaciones de microorganismos acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos, sin embargo la velocidad de crecimiento para cada uno es diferente siendo las metanogénicas quienes requieren un periodo entre 30 y 40 veces mayor, por lo cual este periodo depende del crecimiento de estas últimas [29, 86, 87]. También se menciona que factores como el inóculo y una elevada carga orgánica pueden causar acumulación de intermediarios tales como AGVs ya que el proceso de formación de metano es más lento mientras la acidogénesis y acetogénesis son más rápidas [88, 89].

Durante el primer periodo (0.39 g DQO/L·día) se determinó que el tiempo para alcanzar la estabilización fue de 20 días obteniéndose una producción promedio de AGVs de 280 ± 24 mg/L, una remoción de DQO de 92 ± 3 % y una proporción de gas metano del 59 ± 2 %. Mientras que en el segundo periodo (1.2 g DQO/L·día) se tardó 40 días con una producción de AGVs de 408 ± 30 mg/L, remoción de DQO de 90 ± 3 % y contenido de metano igual a 59 ± 2 %. Por último, el tercer periodo (1.9 g DQO/L·día) demoró 41 días, teniendo una producción de AGVs de 282 ± 26 mg/L, remoción de DQO = igual a 92 ± 1 % y contenido de metano en biogás de 59 ± 2 %. Logrando de este modo el arranque y estabilización del reactor UASB con una carga orgánica de 1.9 g DQO/L·día en un total de 101 días, como se muestra en la figura 3.1.

Igualmente se observó que al aumentar la carga orgánica de 0.39 a 1.2 g DQO/L·día del periodo 1 al 2, el reactor UASB sufrió un aumento en la concentración de AGVs totales, así como un decremento en la remoción de DQO y producción de biogás entre los días 20 y 38 lo cual coincide con lo mencionado en la literatura ya que al aumentar la carga orgánica, aumentó la cantidad de sustrato que fue degradado a AGVs con mayor rapidez mientras que la remoción de DQO y generación de metano se vieron disminuidas. Sin embargo, a partir del día 50 se observó que la concentración de AGVs disminuye mientras que la remoción de DQO y contenido de metano aumentan, lo cual indica que las bacterias metanogénicas se aclimataron a la carga orgánica de 1.2 g DQO/L·día.

Por otra parte, el aumento de la carga orgánica en el periodo 2 al 3 de 1.2 a 1.9 g DQO/L·día no causó alteraciones mayores en la concentración de AGVs, remoción de DQO y contenido de metano lo cual indica que se ha alcanzado un balance favorable entre las poblaciones de microorganismos involucrados lo cual le proporciona versatilidad al reactor UASB para el tratamiento a mayores cargas orgánicas sin verse seriamente afectado.

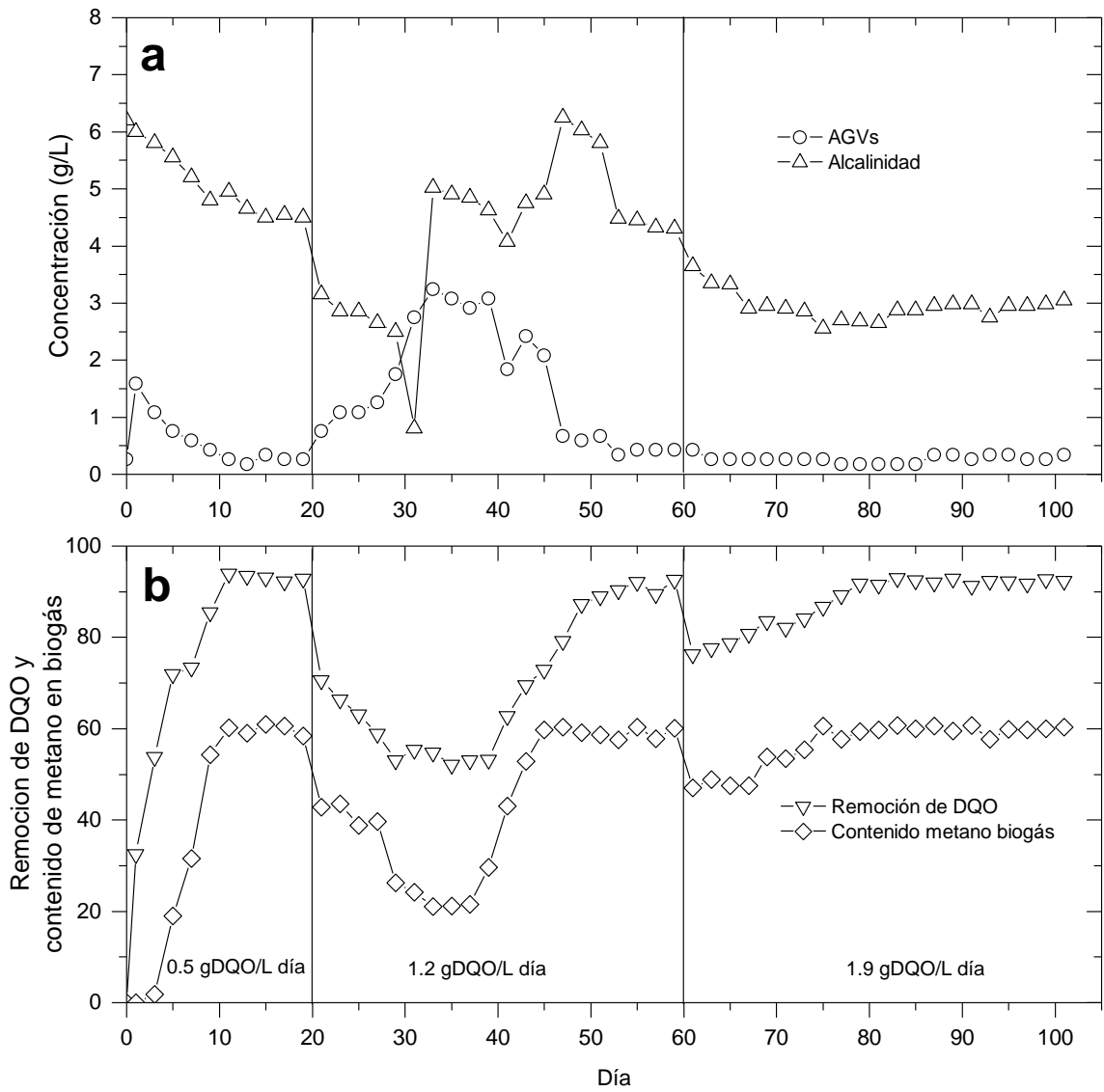


Figura 3.1 Aclimatación del reactor UASB. a) Concentración de AGVs en g/L y alcalinidad en g/L de CaCO_3 , b) porcentajes de remoción de DQO y contenido de metano en el biogás.

3.2.2. Pruebas preliminares en el RACE

Pruebas sin y con adición de inóculo:

Durante las pruebas sin inóculo, se observó una remoción máxima promedio de DQO de 20 ± 0.2 %, una producción de hidrógeno en biogás durante los primeros 7 días de 23 ± 9 %, la generación de $3,413 \pm 10$ mg/L de AGVs totales y la caída del pH hasta valores de 4.5 ± 0.05 (figura 3.3). El comportamiento de estos parámetros durante las pruebas es indicio de actividad hidrolítica. González y colaboradores [90] encontraron que el Nejayote es capaz de albergar bacterias de las especies *Bacillus flexus* las cuales a pH en el rango de 5-8.5 son capaces de hidrolizar y fermentar almidón, xilanos, proteínas y ésteres de ácidos fenólicos lo cual puede explicar el aumento de AGVs y el decaimiento del pH.

Por otra parte, el RACE operado con inóculo, mostró remociones de DQO de 34 ± 1 %, contenido de metano en biogás igual a 9 ± 0.8 %, AGVs totales de $1,980 \pm 35$ mg/L y porcentajes de hidrógeno en biogás de 30 ± 18 % durante los primeros 7 días, así como disminución del pH a 5.5 ± 0.05 (figura 3.3). Los resultados de esta prueba concuerdan con lo mencionado por Wang [47] quien observó que a pH 5, al adicionar inóculo no aumenta la producción de AGVs sino que disminuye debido al uso de los mismos para la producción de biogás. Igualmente coinciden con lo reportado por Poggi Varaldo [70] quien evaluó 4 tipos de inóculos mixtos preparados con diferentes proporciones de estiércol de vaca, lodo de agua residual y suelo para la codigestión de lodos de papel, encontrando que el inóculo conformado por 2/3 de estiércol de vaca y 1/3 de suelo proveían un mejor régimen de estabilización del pH ya que aportaron alcalinidad a su sistema a la vez que indujeron la producción de metano.

Para validar la existencia de diferencias significativas entre las dos pruebas (con y sin inóculo) se realizó la prueba estadística ANOVA para cada parámetro. Como resultado se obtuvieron diferencias significativas para los parámetros de pH, AGVs, remoción de DQO y producción de metano entre las pruebas con y sin inóculo. Mientras que la producción de hidrógeno resultó no ser significativamente diferente para las dos pruebas comparadas (tabla 3.2).

Tabla 3.2 Resultados obtenidos en la prueba ANOVA de las pruebas con y sin inóculo.

	Parámetros				
	pH	AGVs	Remoción de DQO	Producción de hidrógeno	Producción de metano
F. de prueba	10.8	25.4	43.9	6.1	194.3
F. Critica	7.08	7.08	7.08	7.08	7.08

$\alpha = 0.01$; Valores mayores a la F. Critica se consideran significativamente diferentes; Valores menores a la F. critica se consideran no significativamente diferentes.

De igual forma en ambas pruebas (con y sin inóculo) se observó acumulación de sólidos sobre la malla de acero y en el soporte, pero en ninguno de los casos se observó taponamiento ni obstrucción del flujo (figura 3.2).

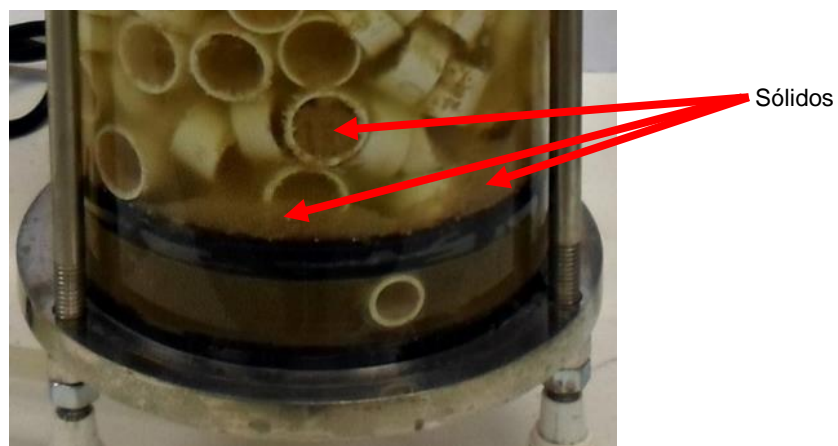


Figura 3.2 RACE lleno con Nejayote sin inóculo

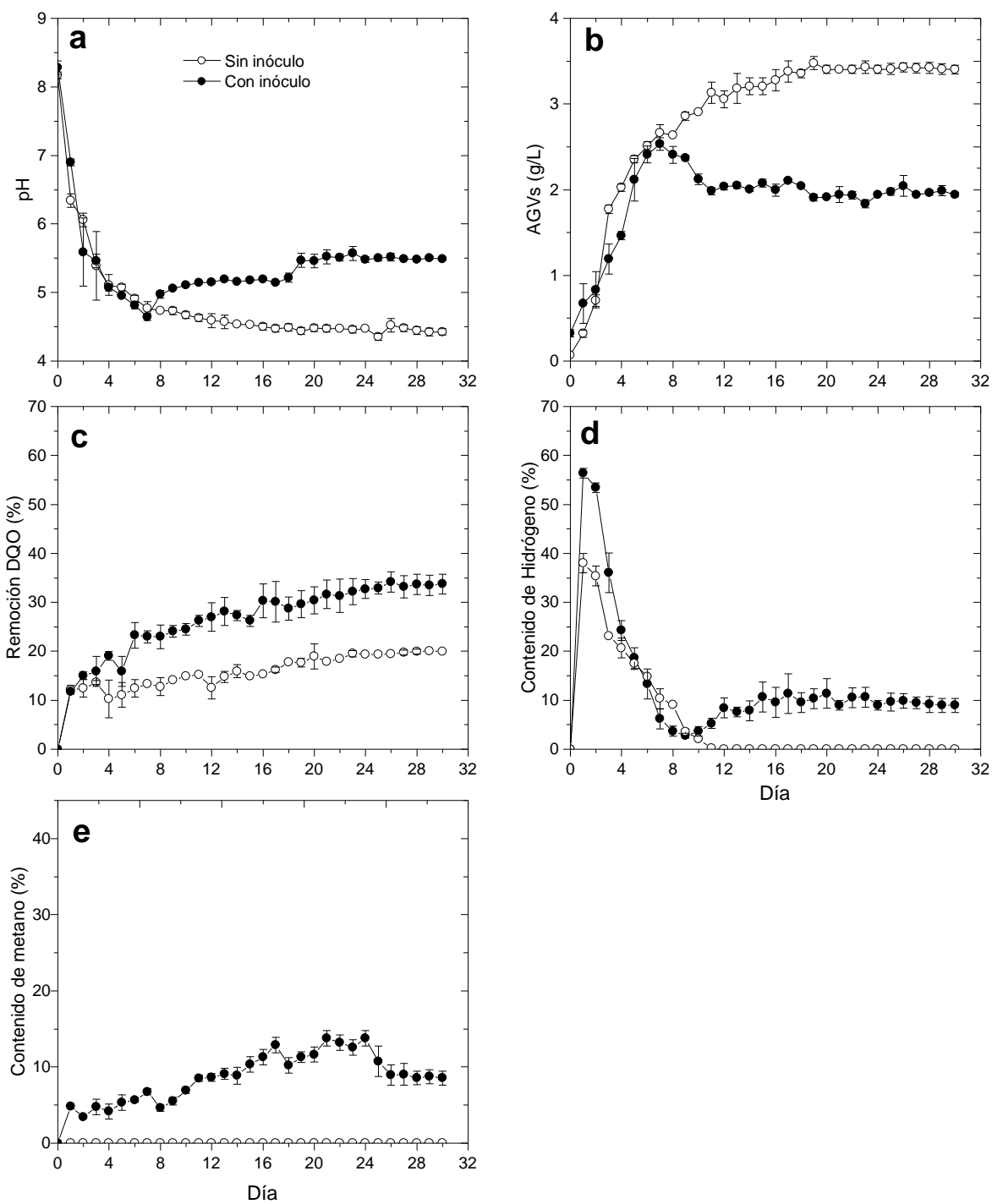


Figura 3.3 Resultados obtenidos durante las pruebas preliminares en el RACE. a) pH; b) concentración de AGVs totales en g/L; c) porcentaje de remoción de DQO; d) porcentaje de hidrógeno en biogás; e) porcentaje de metano en biogás.

3.2.3. Acoplamiento de los reactores RACE Y UASB

Durante el periodo precedente al acoplamiento se observó que los reactores RACE utilizados en cada prueba de acoplamiento A1, A2 y A3 denominados R1, R2 y R3 respectivamente, mostraron un comportamiento similar al observado durante las pruebas preliminares con inóculo y teniendo en cuenta que la acidificación de los reactores es una de las mayores causas de deterioro de los sistemas de digestión anaeróbica debido a la acumulación de AGVs [91] se eligió el día del acoplamiento cuando el RACE alcanzó una concentración de AGVs ≤ 2.5 g/L y una remoción de DQO y ST ≥ 20 % de acuerdo a lo mencionado por Zhiyang y colaboradores [50].

Los días de acoplamiento elegidos se muestran en la tabla 3.3 y los resultados de las características de los efluentes incluyendo DQO, ST y AGVs en la tabla 3.4.

Tabla 3.3 Condiciones iniciales del RACE y día de acoplamiento elegido.

	Concentración de la DQO inicial del nejayote en el RACE (mg/L)	Concentración de ST inicial del nejayote en el RACE (mg/L)	Día para el acoplamiento del RACE + UASB
A1	22,000	21,300	12 días después de la puesta en marcha del RACE
A2	22,000	21,800	8 días después de la puesta en marcha del RACE
A3	29,000	27,600	8 días después de la puesta en marcha del RACE

a1, acoplamiento 1; A2, acoplamiento 2; A3, acoplamiento 3; RACE, Reactor anaerobio de columna empacada; UASB, Reactor anaerobio de manto de lodos.

Tabla 3.4 Características del efluente y producción de biogás en los RACE de acuerdo al día de acoplamiento

Prueba	Reactor RACE	pH	AGVs total (mg/L)	DQO (mg/L)	ST (mg/L)	H ₂ (%)	CH ₄ (%)
A1	R1	5.2 \pm 0.2	2,087 \pm 67	15,370 \pm 390	14,050 \pm 216	1 \pm 0.26	15.6 \pm 3.4
A2	R2	4.9 \pm 0.1	2,130 \pm 130	16,500 \pm 400	15,880 \pm 450	5.8 \pm 1.5	5.4 \pm 0.3
A3	R3	4.8 \pm 0.1	2,410 \pm 210	22,350 \pm 450	18,700 \pm 420	4 \pm 3.4	3.4 \pm 1.4

A1-día 12, Acoplamiento 1 correspondiente al día 12 primera prueba; A2-día 8, Acoplamiento 2 correspondiente al día 8 segunda prueba A3-día 8, acoplamiento 3 correspondiente al día 8 tercera prueba; R1, RACE 1; R2, RACE 2; R3, RACE 3.

Los resultados previos al acoplamiento en el RACE muestran que las concentraciones de AGVs totales, DQO y ST en los efluentes de los reactores R1, R2 y R3 fueron diferentes entre uno y otro debido a dos factores; el primero fue el menor tiempo de espera antes del acoplamiento, 12 días para la prueba A1 y 8 días para las pruebas A2 y A3, lo cual permitió que en la prueba A1 se tuviera mayor tiempo de estabilización del sistema y por ende mayor producción de metano y remoción de DQO y ST (figuras 3.4 y 3.5); el segundo factor fue la concentración inicial del Nejayote siendo 22,000 mg/L para las pruebas A1 y A2, y 29,000 mg/L para la prueba A3 lo cual repercutió en una mayor producción de AGVs totales, una menor remoción de DQO y ST, así como, disminución del contenido de metano en esta última prueba. (tabla 3.4 y figuras 3.4, 3.5 y 3.6) Estos datos concuerdan con la literatura, en la cual, se menciona que mientras mayor sea la concentración de DQO del agua residual y menor el tiempo de tratamiento en un sistema de digestión anaeróbico, se favorece la acidificación y disminución de pH lo cual, afecta negativamente a los microorganismos involucrados en el proceso, causando pérdida en la eficiencia de remoción y la posible falla del sistema [92, 93].

Tabla 3.5 Composición de los AGVs totales de los efluentes del RACE de acuerdo al día de acoplamiento

Prueba	Reactor RACE	Ácido acético (mg/L)	Ácido propiónico (mg/L)	Ácido butírico (mg/L)
A1	R1	1303 ± 64	262 ± 18	784 ± 72
A2	R2	1184 ± 121	226 ± 17	946 ± 26
A3	R3	1267 ± 188	259 ± 46	1143 ± 34

A1-día 12, Acoplamiento 1 correspondiente al día 12 primera prueba; A2-día 8, Acoplamiento 2 correspondiente al día 8 segunda prueba A3-día 8, acoplamiento 3 correspondiente al día 8 tercera prueba; R1, RACE 1; R2, RACE 2; R3, RACE 3.

Otro de los resultados obtenidos fue la producción de hidrógeno durante los primeros 7 días (figura 3.6), siendo mayor en la prueba A3 probablemente debido a la mayor concentración de Nejayote utilizado. Cabe mencionar que la producción de este elemento también fue observada en las pruebas preliminares sin y con inóculo (figura 3.3e). En la literatura se menciona una gran variedad de microorganismos capaces de producir H₂ siendo las principales durante la digestión anaerobia las arqueas de los géneros *Clostridium*, *Ruminococcus* y las metilotróficas [94]. También se mencionan las bacterias de tipo aeróbico entre las que se encuentra *Bacillus licheniformes* [95, 96]. Anteriormente se mencionó que, González y colaboradores [89] aislaron del Nejayote bacterias que

pertenecen a la especie *Bacillus flexus*, por lo cual no se puede descartar la idea que pudiera existir otra especie de este género u otro microorganismo procedente del Nejayote capaz de producir H₂.

Por otra parte, los resultados posteriores al acoplamiento muestran un aumento gradual del pH (figura 3.4) en los reactores acidogénicos R1, R2 y R3 debido a la recirculación de los efluentes del reactor metanogénico UASB a estos últimos durante cada experimento. De acuerdo a la literatura la recirculación de efluentes de un reactor metanogénico a un reactor acidogénico en un sistema de dos fases, le confiere a este último mayor cantidad de inóculo y alcalinidad lo cual estabiliza el sistema [68, 97].

También se observó una mayor remoción de AGVs totales, DQO, ST y producción de metano (figuras 3.4, 3.5, 3.6) concordando con lo mencionado en la literatura sobre la mejora en remoción de DQO, ST y AGVs al realizar el tratamiento de diferentes residuos mediante un sistema en dos fases [98-100].

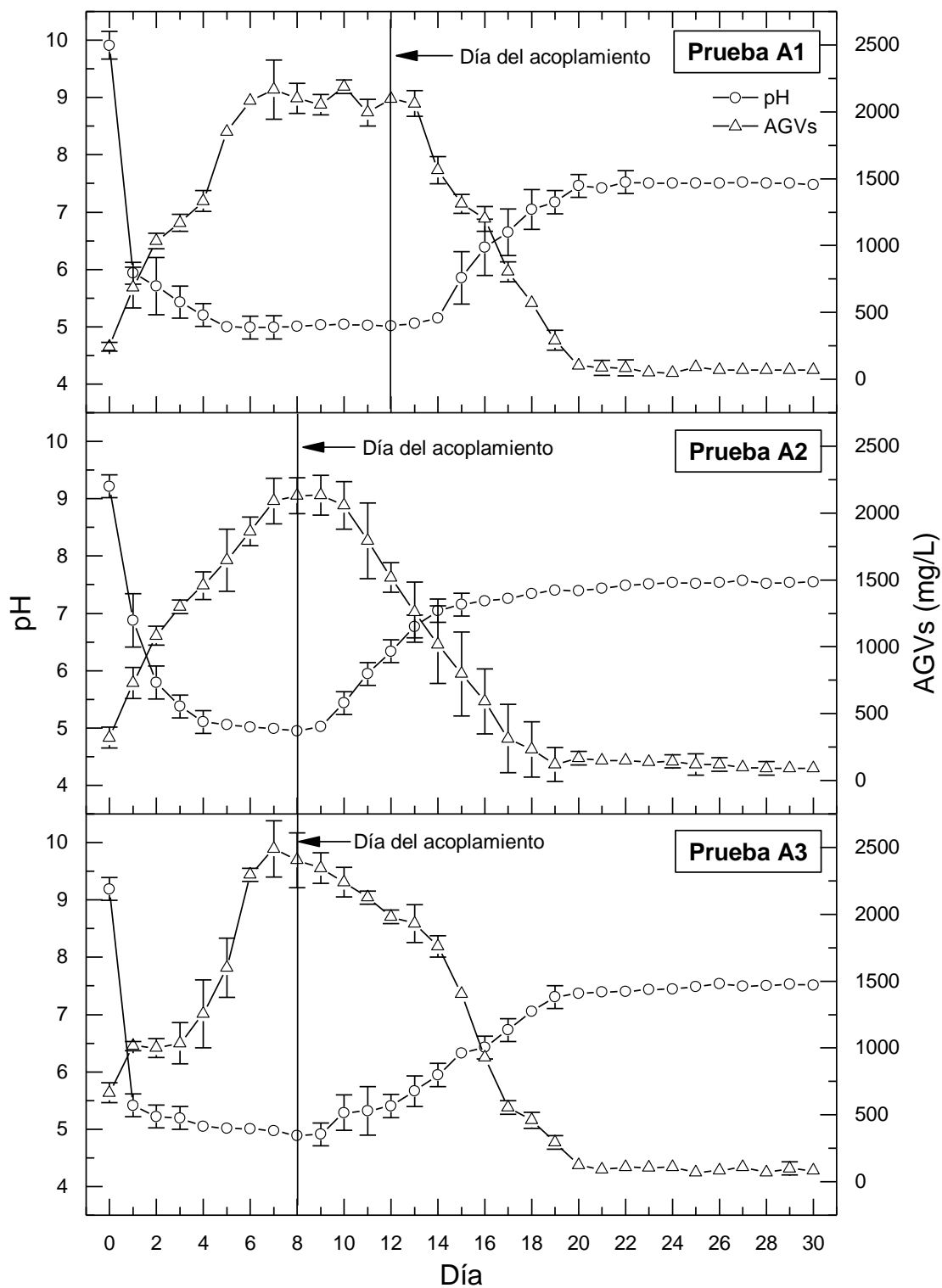


Figura 3.4 Resultados de pH y AGVs totales obtenidos en el RACE durante las pruebas A1, A2 y A3. La línea demarca el día del acoplamiento del RACE con el UASB.

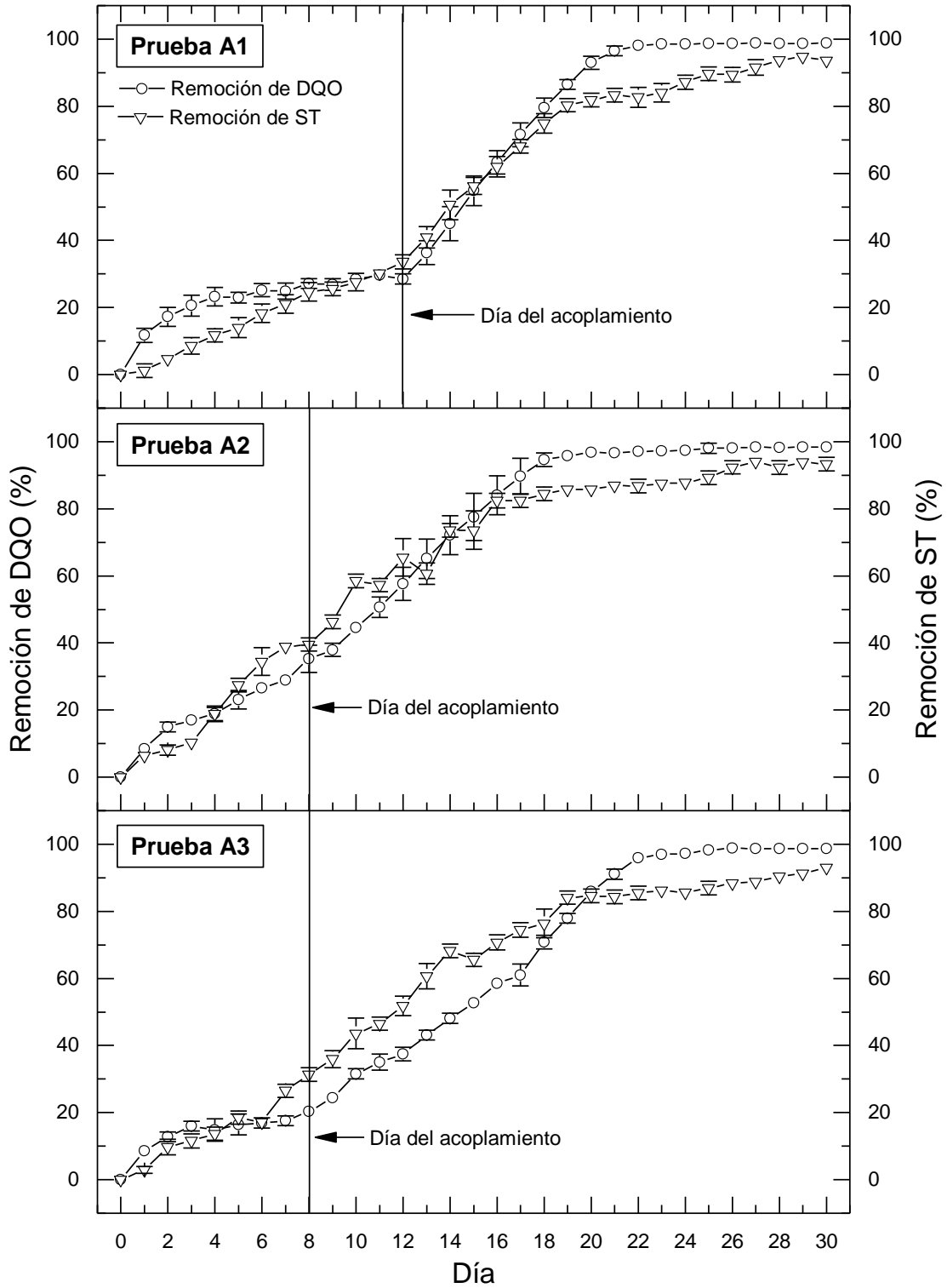


Figura 3.5 Porcentajes de remoción de DQO y ST obtenidos en el RACE durante las pruebas a1, a2 y a3. La línea demarca el día del acoplamiento del RACE con el UASB.

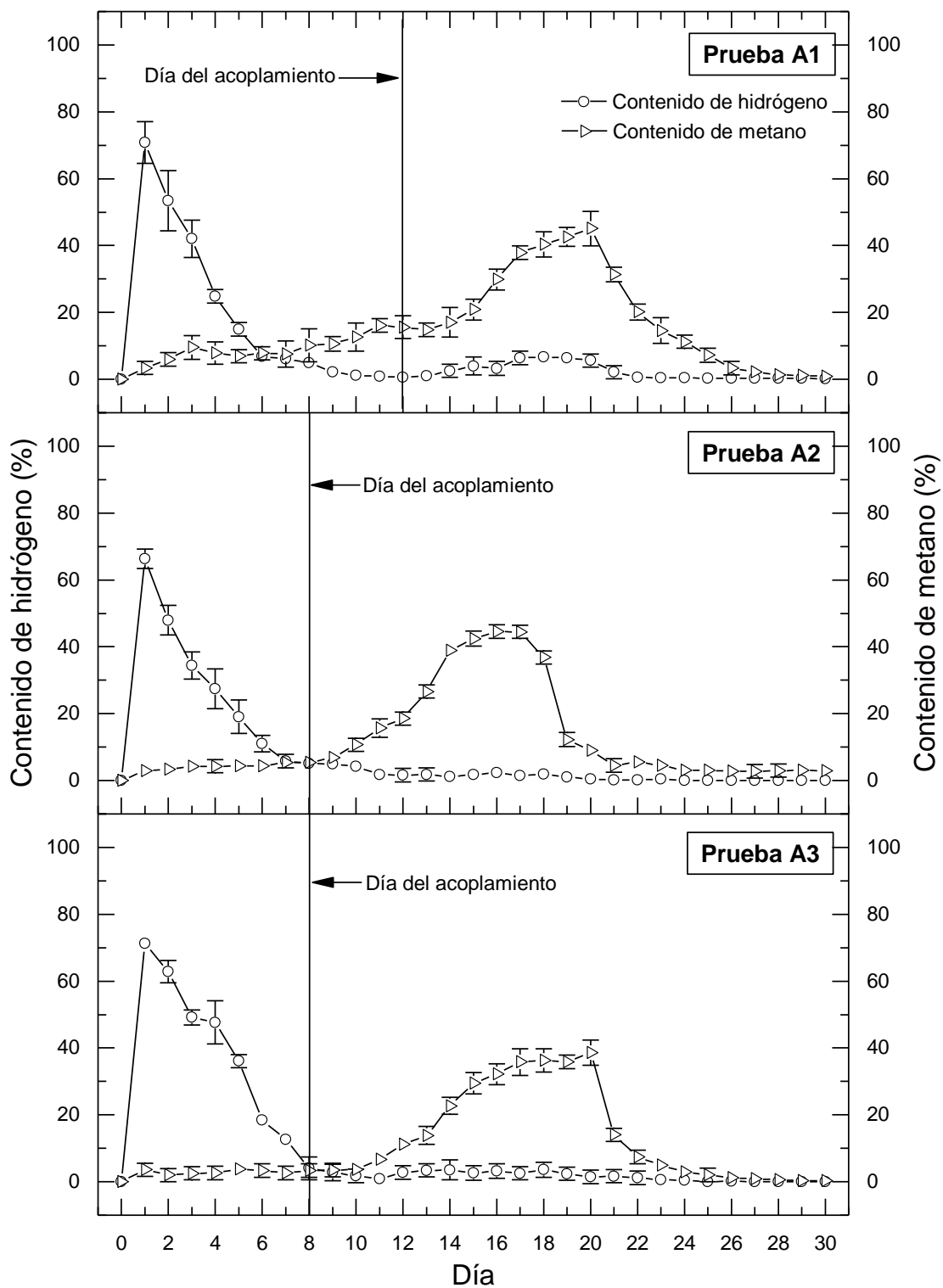


Figura 3.6 Porcentaje de H₂ y CH₄ obtenidos en el RACE durante las pruebas A1, A2 y A3. La línea demarca el día del acoplamiento del RACE con el UASB.

Por su parte el reactor UASB (metanogénico) durante y después del acoplamiento se observó que las tres pruebas A1, A2 y A3 produjeron resultados similares (tabla 3.6). La prueba A1 mostró mayor remoción y rendimiento de metano, seguido por la prueba A2 y por último la A3.

Tabla 3.6 Características obtenidas en el reactor UASB durante las pruebas de acoplamiento

	pH	AGVs totales (mg/L)	Remoción de DQO (%)	CH ₄ (%)	Rendimiento de metano (L CH ₄ /Kg DQO _{removido})
UASBA1	7.4 ± 0.1	274 ± 18	98 ± 1	86 ± 6	295 ± 30
UASBA2	7.35 ± 0.08	290 ± 21	97 ± 1	87 ± 6	293 ± 14
UASBA3	7.36 ± 0.13	280 ± 19	97 ± 1	87 ± 5	283 ± 20

Los resultados obtenidos en el UASB también muestran que este reactor no se vio afectado de forma negativa por los efluentes de los reactores R1, R2 y R3 que fueron introducidos en el mismo sino que mantuvo estabilidad durante todos los periodos de tratamiento en el que estuvo involucrado (figura 3.7) La estabilidad se atribuye a la aclimatación previa del reactor y a la versatilidad de los reactores tipo UASB en soportar cargas orgánicas elevadas y producir rendimientos de metano superiores [63, 101]

La separación del proceso anaeróbico en dos fases también influyó en la versatilidad de la remoción y la producción de biogás. Al producir la mayor cantidad de hidrógeno durante la fase hidrolítica-acidogénica, se disminuyó el riesgo de generar inhibición de las bacterias metanogénicas por presiones elevadas de H₂ o por formación de sulfuro de hidrógeno. De igual forma en esta misma fase en los reactores RACE R1, R2 y R3 se obtuvieron efluentes hidrolizados, ricos en AGVs, con menor concentración de ST, los cuales al ser dosificados en el UASB proporcionaron los sustratos de las bacterias acetogénas-metanogénas, lo cual, concuerda con lo reportado por otros autores quienes, al separar el proceso, de tratamiento anaeróbico en dos fases para el tratamiento de aguas residuales diferentes al nejayote, obtienen un mejor control del proceso junto con mayor generación de hidrógeno y metano en comparación con un sistema de una fase [100, 102, 103]

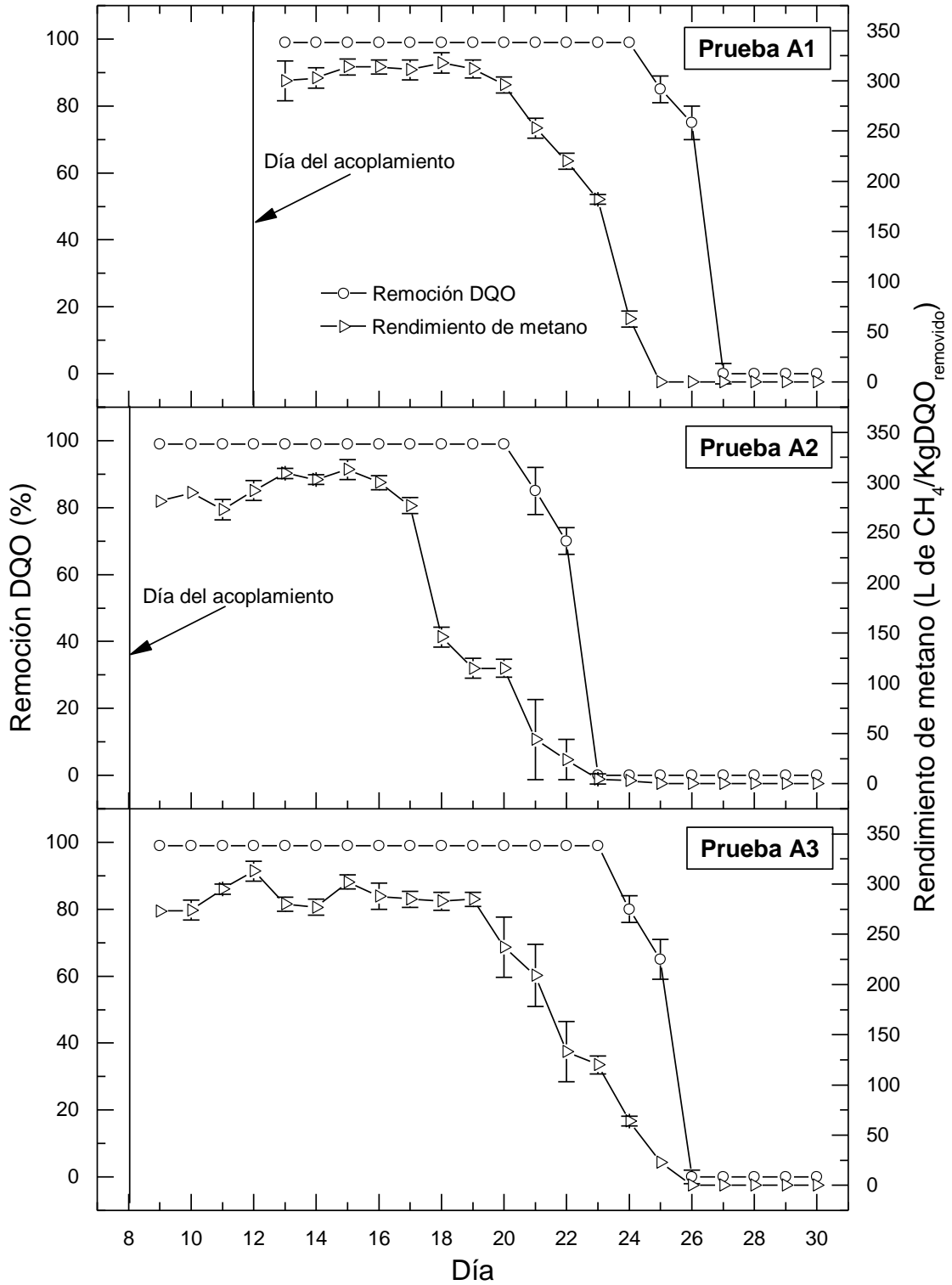


Figura 3.7 Porcentajes de remoción de DQO y rendimiento de metano obtenidos en el UASB durante los experimento de acoplamiento A1, A2 y A3.

3.2.4. Tratamiento del Nejayote mediante el proceso anaeróbico en dos fases

Según los resultados obtenidos, el tiempo de duración del tratamiento (experimento fue de 21 días para la prueba A1 (acoplamiento en el día 12, concentración inicial de nejayote de 22 g/L), 19 días para la prueba A2 (acoplamiento en el día 8, concentración inicial del nejayote de 22 g/L) y 24 días para la prueba A3 (acoplamiento en día 8, concentración inicial de Nejayote de 29 g/L) siendo el mejor resultado la prueba A2 ya que se realizó en menor tiempo.

Civit y colaboradores [25], realizaron en un periodo de 15 y 23 días el tratamiento de nejayote clarificado (sólidos removidos) mediante 5 reactores empacados dispuestos en cascada, logrando obtener remociones del 92.6-94.8 y 93.5-96.1 % al utilizar cargas orgánicas de 0.68 y 0.5 g DQO/L·día respectivamente, mientras que en esta investigación el mejor resultado fue en un periodo de 19 días, con remociones mayores al 97 % utilizando una carga orgánica de 1.9 g DQO/L·día de nejayote no clarificado.

Por su parte Martínez [20] obtuvieron el tratamiento de nejayote clarificado en 5 y 9.7 días utilizando concentraciones de DQO de 2,200 y 6,500 mg/L respectivamente obteniendo remociones de DQO del 91 % y porcentajes de metano en biogás de 58 % mientras que en este estudio, el tiempo de tratamiento fue mayor pero utilizando nejayote no clarificado con DQO de 22,000 y 29,000 mg/L, obteniendo remociones mayores y una producción de metano en porcentaje superior al 80 % en el reactor acetogénico-metanogénico (UASB), así como producción de hidrógeno durante los primeros 7 días.

Al comparar los resultados se observa que el acoplamiento del RACE con el UASB separando las fases acidogénica y metanogénica, brindó mejores resultados que un sistema de una sola fase. Al igual que otras investigaciones, al separar el proceso anaeróbico se mejoran los procesos de hidrólisis y metanogénesis, lo cual favorece el tratamiento de diferentes aguas residuales en un periodo menor de tiempo y utilizando cargas orgánicas mayores [104, 105].

3.2.5. Características del efluente después del tratamiento en los reactores acoplados.

En la tabla 3.4 se observan los resultados de las características del efluente al finalizar el tratamiento del Nejayote en las diferentes condiciones de acoplamiento A1, A2 y A3.

Tabla 3.7 Características del efluente resultante en las diferentes pruebas de acoplamiento.

Parámetro	Resultados			NOM 001-ECOL-1996
	A1	A2	A3	Uso riego agrícola (A)
pH	7.5 ± 0.01	7.55 ± 0.01	7.45 ± 0.01	Entre 5 y 10
ST (mg/L)	2,250 ± 300	2,500 ± 300	2,800 ± 400	N. A.
Materia Flotante	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
DQO (mg/L)	360 ± 30	580 ± 35	790 ± 40	N. A.
DBO ₅	160 ± 13	242 ± 15	340 ± 14	N. A.
N _T (mg/L)	150 ± 20	120 ± 25	200 ± 20	N. A.
N-NH ₃ (mg/L)	10 ± 1.2	8.4 ± 0.6	12.2 ± 0.7	N. A.
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	5.4 ± 1.1	5.7 ± 0.3	5.2 ± 0.9	N. A.
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	5.8 ± 0.8	4.8 ± 1.1	5.6 ± 0.7	N. A.

ST, sólidos totales; DQO, demanda química de oxígeno; N_t, nitrógeno total; N-NH₃, nitrógeno libre, PO₄³⁻, fosfato; SO₄²⁻, sulfato; N.A., No aplica.

Los resultados se pueden comparar con lo que exige la NOM-001-ECOL-1996, obteniendo que el sistema aquí implementado resulta en efluentes (figura 3.8) que cumplen esta norma para uso en riego agrícola (A), no obstante, existe la presencia de sólidos totales pertenecientes a los residuos del inóculo del reactor UASB los cuales que pudieran ser eliminados mediante un sistema de sedimentación posterior ya que precipitan fácilmente y también es necesario determinar la contaminación por parásitos a través de cuantificar los huevos de helminto que se establecen en los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

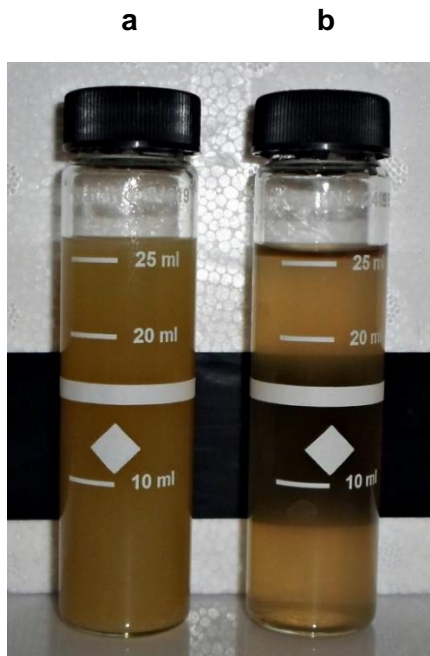


Figura 3.8 Nejayote antes del tratamiento (a) y después del tratamiento (b)

CAPITULO 4.

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo el mejor resultado del tratamiento en dos fases produjo biogás con porcentaje de metano de $87 \pm 6 \%$ y rendimiento de metano de 293 ± 14 L de $\text{CH}_4/\text{Kg DQO}_{\text{removido}}$ por lo cual se consideró que el sistema es eficaz para la producción de metano.
- El acoplamiento del RACE con el UASB para el tratamiento del Nejayote demostró alta eficiencia en la remoción de DQO y ST mayores al 97 y 90 %, respectivamente.
- El tratamiento en dos etapas del nejayote mediante el proceso anaeróbico en dos etapas se realizó en un tiempo de 19 días, que resulta menor en comparación a los tratamientos en una sola fase.
- Las bacterias metanogénicas posiblemente no fueron afectadas por la acumulación de AGVs, ya que el proceso hidrolítico fue independiente al metanogénico lo cual indica que la separación de las fases para el tratamiento de aguas residuales podría ser buena estrategia.
- Los valores de pH, DBO_5 , ST del efluente cumplen con los requisitos de la NOM-001-ECOL-1996 para descargas de aguas residuales en bienes nacionales (para uso en riego agrícola A).
- El sistema aquí estudiado empleando un inóculo mixto no especializado es prometedor como una alternativa de tratamiento para el nejayote.

BIBLIOGRAFIA

1. Krause V M; Tucker K L; Kuhnlein H V; Lopez P C Y; Ruz M; Solomons N W, Rural–Urban Variation In Limed Maize Use And Tortilla Consumption By Women In Guatemala. *Ecology Of Food And Nutrition*. 28(4), 279-288 1992.
2. Terrance G G; Gregory W B, A Preliminary Look At The Globalization Of The Tortilla In Mexico. *Advances In Consumed Research*. 30, 135-141, 2003.
3. Sagarpa, Análisis De La Cadena De Valor Maíz-Tortilla: Situacion Actual Y Factores De Competencia Local. 1-35, 2012.
4. Morad M M; Iskander F Y; Rooney L W; Earp C F, Physicochemical Properties Of Alkali-Cooked Corn Using Traditional And Presoaking Procedures. *Cereal Chemistry*. 63(3), 255–259, 1986.
5. Salmeron A; Rodriguez M; Pineda S; Cristiani U; Juárez R; Ruiz O; Galíndez M, Aerobic Treatment Of Maize-Processing Wastewater (Nejayote) In A Single-Stream Multi-Stage Bioreactor. *Journal Environmental Engineering And Science*. 2, 401-406, 2003.
6. Durán M C; Hartmann L, Recycling Of Corn Processing Wastes. Final Project Report. *Universidad Nacional Autonoma De México*. 1987.
7. Serna O; Gómez M H; Rooney L W, Technology, Chemistry And Nutritional Value Of Alkaline-Cooked Corn Products. *Advances In Cereal Science And Technology*. 10, 243-307, 1990.
8. Chan Y J; Chong M F; Chung L L; Hassell D G, A Review On Anaerobic-Aerobic Treatment Of Industrial And Municipal Wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 155, 1-18, 2009
9. Speece R E, Anaerobic Biotechnology For Industrial Wastewater Treatment. *Environmental Science Technology*. 17(9), 416a-427a, 1983.
10. Ince O, Performance Of A Two-Phase Anaerobic Digestion System When Treating Dairy Wastewater. *Water Research*. 32(9), 2707-2713, 1998.
11. Estaller J E; Tikot R H; Benz B F. *Histories Of Maize*. 2006, 2-50.
12. Bonavia D, *Maize: Origin, Domestication, And Its Role In The Development Of Culture*. Press Cambridge University, 2013, 1-115.
13. FAO, Maize In Human Nutrition: Types Of Maize. *Organization Food And Agricultural*. Rome Italy, 2010.

14. Medina N; Millán C; Lizardi J; Rascon C; Marquez E; López M, Maize Processing Waste Water Arabinoxylans: Gelling Capability And Cross-Linking Content. *Food Chemistry*. 115, 1286-1290, 2009.
15. Rosentrater K A, A Review Of Corn Masa Processing Residues: Generation, Properties, And Potential Utilization. *Waste Management*. 26, 284-292, 2006.
16. C. Gómez Aldapa; F. Martínez Bustos; C.J.D. Figueroa; F. Ordorica, A Comparison Of The Quality Of Whole Corn Tortillas Made From Instant Corn Flour By Traditional Or Extrusion Processing. *International Journal Of Food Science And Technology*. 34, 391-399, 1999.
17. Gomez M H; Lee J K; Mcdonough M C; Waniska R D; Rooney L W, Corn Starch Changes During Tortilla And Tortilla Chip Processing. *Cereal Chemistry*. 69(3), 275-279, 1992.
18. Gomez M H; Mcdonough M C; Rooney L W; Waniska R D, Changes In Corn And Sorghum During Nixtamalization And Tortilla Baking. *Journal Of Food Science*. 54(2), 330-336, 1989.
19. Velazco M; Angulo O; Vazquez C D L; Arroyo L A; Monroy R J A, Effect Of Dried Solids Of Nejayote Of Broiler Growth. *Poultry Science*. 76, 1531-1534, 1997.
20. Martinez G S, Biological Treatability Of The Wastewaters From The Alkaline Cooking Of Maize (Indian Corn). *Environmental Technology Letters*. 5(8), 365-372, 1984.
21. Rosentrater K A; Flores R A; Richard T L; Bern C J, Physical And Nutritional Properties Of Corn Masa Byproduct Streams. *Applied Engineering In Agriculture*. 15(5), 515-523, 1999.
22. Ibarra M H; Gallardo N Y; Torres P I; Ramírez W B, Effect Of Processing Conditions On Instrumental Evaluation Of Nixtamal Hardness Of Corn. *Journal Of Texture Studies*. 39, 252-266, 2008.
23. Valderrama B C; Gutiérrez C E; Contreras P M; Rojas M I; Mosquera J C; Rojas M A; Beristain F; Rodríguez G M E, Constant Pressure Filtration Of Lime Water (Nejayote) Used To Cook Kernels In Maize Processing. *Journal Of Food Engineering*. 110, 478-486, 2013.
24. Pedroza B R; Durán B C, Rbc Characteristics For Nejayote Aerobic Treatment. *Environmental Technology Letters*. 8, 579-588, 1987.

25. Civit E; Durán B C; Engelmann G; González S; Hartmann L, Anaerobic Treatment Of Maize Processing Waste Water (Nejayote) In A Packed Bed Reactor Cascade. *Environmental Technology Letters*. 5 (1-11), 89-96, 1984.
26. Madsen M; Holm N J B; Esbensen H K, Monitoring Of Anaerobic Digestion Process: A Review Perspective. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*. 14, 3141-3155, 2011.
27. Raposo F; Rubia M A; Fernández C V; Borja R, 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, 2011.
28. Ghosh S; Pohland F G, Kinetics Of Substrate Assimilation And Product Formation In Anaerobic Digestion. *Journal Of The Water Pollution Control Federation*. 46, 748-759, 1973.
29. Amani T; Nosrati M; Sreekrishnam T R, Anaerobic Digestion From The Viewpoint Of Microbiological, Chemical, And Operational Aspects - A Review. *Environmental Review*. 18, 255-278, 2010.
30. Yi Jin C; Lim Chung C M F; Hassell D G, A Review On Anaerobic-Aerobic Treatment Of Industrial And Municipal Wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 155, 1-18, 2009.
31. Weiland P, Biogas Production: Current State And Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85, 849-860, 2010.
32. Angelidaki I; Ellegaard L; Ahring B K, A Mathematical Model For Dynamic Simulation Of Anaerobic Digestion Of Complex Substrates: Focusing On Ammonia Inhibition. *Biotechnology And Bioengineering*. 42, 159-166, 1993.
33. Gerardi M H, *The Microbiology Of Anaerobic Digesters*. *Wastewater Microbiology*, John Wiley And Sons, New Jersey, 1, 2003, 77-135.
34. Molino A; Nanna F; Ding Y; Bikson B; Braccio G, Biomethane Production By Anaerobic Digestion Of Organic Waste. *Fuel*. 103, 1003-1009, 2013.
35. Scheper T, *Biomethanation I. Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer, Germany, 2003, 1, 1-95.
36. Pind F P; Angelidaki I; Ahring K B; Stamatelatou K; Lyberatos G, Monitoring And Control Of Anaerobic Reactors. *Advances In Biochemical Engineering*. 82, 137-179, 2003.
37. Singh S P; Prerna P, Review Of Recent Advances In Anaerobic Packed-Bed Biogas Reactors. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*. 13, 1569-1575, 2009.
38. Chen Y; Cheng J J; Creamer K S, Inhibition Of Anaerobic Digestion Process: A Review. *Bioresource Technology*. 99, 4044-4064, 2008.

39. Kroecker E J; Schulte D D; Sparling A B; Lapp H M, Anaerobic Treatment Process Stability. *Journal Of The Water Pollution Control Federation*. 51, 718-727, 1979.
40. Zhang C; Yuan Q; Lu Y, Inhibitory Effects Of Ammonia On Methanogen Mcra Transcripts In Anaerobic Digester Sludge. *Fems Microbiology Ecology*. 87, 368-377, 2014.
41. Kuichuan S; Xiang C; Jinming P; Rolf K; Yi W; Yibin Y, Effect Of Ammonia And Nitrate On Biogas Production From Food Waste Via Anaerobic Digestion. *Biosystems Engineering*. 116, 205-212, 2013.
42. Hulshoff W L; Pol N L; Lens P; Stams A J M; Lettinga G, Anaerobic Treatment Of Sulphate Rich Wastewaters. *Biodegradation*. 9, 213-224, 1998.
43. O'reilly C; Colleran E, Effect Of Influent Cod/So₄²⁻ Ratios On Mesophilic Anaerobic Reactor Biomass Populations: Physico-Chemical And Microbiological Properties. *Fems Microbiology Ecology*. 56, 141-153, 2006.
44. Paula Jr D R.; Foresti E, Sulfide Toxicity Kinetics Of A Uasb Reactor. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*. 26 (4), 669-675, 2009.
45. O'flaherty V; Mahony T; O'kenedy R; Colleran E, Effect Of Ph On Growth Kinetics And Sulphide Toxicity Thresholds Of A Range Of Methanogenic, Syntrophic And Sulphate Reducing Bacteria. *Process Biochemistry*. 33 (5), 555-569, 1998.
46. Zeeman G; Wiegant W M; Koster T M E; Lettinga G, The Influence Of The Total Ammonia Concentration On The Thermophilic Digestion Of Cow Manure. *Agricultural Wastes*. 14, 19-35, 1985.
47. Wang K; Yin J; Shen D; Li N, Anaerobic Digestion Of Food Waste For Volatile Fatty Acids (Vfas) Production With Different Types Of Inoculum: Effect Of Ph. *Bioresource Technology*. 161, 395-401, 2014.
48. Strik D P B; Domnanovich A M; Holubar P, A Ph-Based Control Of Ammonia In Biogas During Anaerobic Digestion Of Artificial Pig Manure And Maize Silage. *Process Biochemistry*. 41, 1235-1238, 2006.
49. Koster I W; Rinzema A; De Vegt A L; Lettinga G, Sulfide Inhibition Of The Methanogenic Activity Of Granular Sludge At Various Ph Levels. *Water Research*. 20, 1561-1567, 1986.
50. Zhiyang X; Mingxing Z; Hengfeng M; Zhenxing H; Shumei G; Wenquan R, In Situ Volatile Fatty Acids Influence Biogas Generation From Kitchen Wastes By Anaerobic Digestion. *Bioresource Technology*. 163, 186-192, 2014.

51. Pind F P; Angelidaki I; Ahring K B, Dynamics Of The Anaerobic Process: Effects Of Volatile Fatty Acids. *Biotechnology And Bioengineering*. 82 (7), 191-801, 2003.
52. Bravo A D; Retamal C; Carballa M; Filippi G R; Chamy R, Influence Of Temperature On The Hydrolysis, Acidogenesis And Methanogenesis In Mesophilic Anaerobic Digestion: Parameter Identification And Modeling Application. *Water Science And Technology*. 60.1, 9-17, 2009.
53. Kiyohara T; Miyahara T; Mizuno O; Noike T; Ono K, A Comparative Study Of Thermophilic And Mesophilic Sludge Digestion. *Water And Environmental Journal*. 14, 150-154, 2000.
54. Kim K J; Rock O B; Nam C Y; Wook K S, Effects Of Temperature And Hydraulic Retention Time On Anaerobic Digestion Of Food Waste. *Journal Of Biochemistry And Bioengineering*. 102 (4), 328-332, 2006.
55. Scherer P; Sahm H, Influence Of Sulfur-Containing-Compounds On The Growth Of Methanosarcina Barkeri In A Defined Medium. *European Journal Of Applied Microbiology And Biotechnology*. 12, 28-35, 1981.
56. Rajeshwari K V; Balakrishnan M; Kansal A; Lata K; V.V.N. Kishore, State-Of-The-Art Of Anaerobic Digestion Technology For Industrial Wastewater Treatment. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*. 4, 135-156, 2000.
57. Moayye S, Enhancing The Removal Of Organic Matter And Nutrient From Wastewater By Using The Packed Bed Biological Reactor. *Journal Of Environmental Protection*. 5, 232-239, 2014.
58. Rangaraj G; Rajagopal R; Thanikal J V; Ramanujam R A; Torrijos M, Anaerobic Treatment Of Winery Wastewater In Fixed Bed Reactors. *Bioprocess Biosyst Eng*. 33, 619-628, 2010.
59. Scoma A; Bertin L; Fava F, Effect Of Hydraulic Retention Time On Biohydrogen And Volatile Fatty Acids Production During Acidogenic Digestion Of Dephenolized Olive Mill Wastewaters. *Biomass And Bioenergy*. 48, 51-58, 2013.
60. Leite A C J; Fernandes S B; Pozzi E; Barboza M; Zaiat M, Application Of An Anaerobic Packed-Bed Bioreactor For The Production Of Hydrogen And Organic Acids. *International Journal Of Hydrogen Energy*. 33, 579-586, 2008.
61. Habeeb S A; Aziz B A L; Lattif A B; Zawawi B D; Zulkifli B A, A Review On Granules Initiation And Development Inside Uasb Reactor And The Main Factors Affecting Granules Formation Process. *Energy And Environment*. 2 (2), 311-320, 2011.

62. A.L Muhammad A L; Rumana G; Zularisam A W; A. Anwar, Integrated Application Of Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor For The Treatment Of Wastewaters. *Water Research*. 45, 4683-4699, 2011.
63. Chong S; Kanti Sen T; Kayaalp A; Ang H M, The Performance Enhancements Of Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Uasb) Reactors For Domestic Sludge Treatment E A State-Of-The-Art Review. *Water Research*. 46, 3434-3470, 2012.
64. Vlyssides A; Barampouti E M; Mai S, Granulation Mechanism Of A Uasb Reactor Supplemented With Iron. *Anaerobe*. 14 (5), 275-279, 2008.
65. Mijalova N P; Reyes P M; Lomelí S E A, Treatment Of Slaughterhouse Wastewater In Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *Water Science And Technology*. 877-844, 2011.
66. Esparza M S; Solís M C; Hernández T J J, Anaerobic Treatment Of A Medium Strength Industrial Wastewater At low-Temperature And Short Hydraulic Retention Time: A Pilot-Scale Experience. *Water Science And Technology*. 64.8, 1629-1635, 2011.
67. Yenigün B; Demirel O, Two-Phase Anaerobic Digestion Processes: A Review. *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology*. 77, 743–755, 2002.
68. Solmaz A; Karthik R; Azam J; Mohammad J, The Effect Of Effluent Recirculation In A Semi-Continuous Two-Stage Anaerobic Digestion System. *Energies*. 6, 2966-2981, 2013.
69. Guang L; Jing L; Xiangkui H, Efficiencies Of Mesophilic Two-Phase Anaerobic Digestion Of Pretreated Surplus Sludge. *International Journal Of Environmental Science And Development*. 4 (5), 576-581, 2013.
70. Method 1060, Manual Of Standar Methods, 1995, P. 1-23
71. Poggi V H M; Valdes L; Esparza G F; Fernandez V G, Solid Substrate Anaerobic Co-Digestion Of Paper Mill Sludge, Biosolids, And Municipal Solid Waste. *Water Science And Technology*. 35 (2-3), 197-204, 1997.
72. Hina R; Nasir A; Farhat A; Iftikhar H B; Abdullah Y; Shafaqat A; Tahira Y; Muhammad R, Start-Up Of UASB Reactors Treating Municipal Wastewater And Effect Of Temperature/Sludge Age And Hydraulic Retention Time (Hrt) On Its Performance. *Arabian Journal Of Chemistry*, 2014.
73. Alzate G L M; Hernández A P; Nevárez M V G; Rinderknecht S N; Poggi V H M, Comparación De Dos Sistemas Anaerobios Acoplados Para La Biometanización De La Fracción Orgánica De Residuos Sólidos Urbanos. *Interciencia*. 28 (8), 436-442, 2003.

74. Azbar N; Ursillo P; Speece R E, Effect Of Process Configuration And Substrate Complexity On The Performance Of Anaerobic Processes. *Water Research*. 35 (3), 817-829, 2001.
75. Estrada V C; Macarie H; Takayuki K M; Rodríguez V R; Poggi V H M, Resistencia A La Exposición Al Oxígeno De Lodos Anaerobios Suspendedos. *Interciencia*. 26 (11), 547-553, 2001.
76. Jobling P B J; Thai S M; Fritz T; Esteves S R; Dinsdale S R; Guwy A J, An Improved Titration Model Reducing Over Estimation Of Total Volatile Fatty Acids In Anaerobic Digestion Of Energy Crop, Animal Slurry And Food Waste. *Water Research*. 61, 162-170, 2014.
77. Nontando T M; Titus A M M; Bhekie B M; Maggy M, Determination Of Volatile Fatty Acids In Wastewater By Solvent Extraction And Gas Chromatography. *Physics And Chemistry Of The Earth*. 67-69, 86-92, 2014.
78. Drosig B; Braun R; Bochmann G, *Analysis And Characterisation Of Biogas Feedstocks, In The Biogas Handbook Science, Production And Applications*, Woodhead Publishing Series In Energy, Oxford Cambridge Philadelphia New Delhi, 2013.
79. Nogueira T H; Lara E H; García A M A; Monroy R J A, Drying Kinetics And Sorption Isotherms Of The Nejayote. *Drying Technology*. 22 (9), 2173-2182, 2004.
80. Gutiérrez U J A; Rojas G C; García L S; Serna S O, Phytochemical Analysis Of Wastewater (Nejayote) Obtained After Lime-Cooking Of Different Types Of Maize Kernels Processed Into Masa For Tortillas. *Journal Of Cereal Science*. 52, 410-416, 2010.
81. Wilson C A; Novak J; Takacs I; Wett B; Murthy S, The Kinetics Of Process Dependent Ammonia Inhibition Of Methanogenesis From Acetic Acid. *Water Research*. 46, 6247-6256, 2012.
82. Angelidaki I; Ahring B K, Anaerobic Thermophilic Digestion Of Manure At Different Ammonia Loads: Effect Of Temperature. *Water Research*. 28 (3), 727-731, 1994.
83. Speece R E, *Anaerobic Biotechnology For Industrial Wastewater*, Press Archae, Nashville, Tn., 1996
84. Tao S; Sung Y L, Ammonia Inhibition On Thermophilic Anaerobic Digestion. *Chemosphere*. 53, 43-52, 2003.
85. Alvarez R; Villca S; Lidén G, Biogas Production From Llama And Cow Manure At High Altitude. *Biomass And Bioenergy*. 30, 66-75, 2006.

86. Masse D I; Masse L; Verville A; Bilodeau S, The Start-Up Of Anaerobic Sequencing Batch Reactors At 20 °C And 25 °C For The treatment Of Slaughterhouse Wastewater. *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology*. 76, 393-400, 2001.
87. Akuzawa M; Hori T; Haruta S; Ueno Y; Ishii M; Igarashi Y, Distinctive Responses Of Metabolically Active Microbiota To Acidification In A Thermophilic Anaerobic Digester. *Microbial Ecology*. 61, 595-605, 2011.
88. Griffin M E; McMahon K D; Mackie R I; Raskin L, Methanogenic Population Dynamics During Start-Up Of Anaerobic Digesters Treating Municipal Solid Waste And Biosolids. *Biotechnology And Bioengineering*. 57, 342-355, 1988.
89. Ahring B K; Sandberg M; Angelidaki I, Volatile Fatty Acids As Indicators Of Process Imbalance In Anaerobic Digestors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 43, 559-565, 1995.
90. Sanchez G. M; Blanco G A; Escalante A; Valladares A G; Olvera C; Parra Y R, Isolation And Characterization Of New Facultative Alkaliphilic *Bacillus Flexus* Strains From Maize Processing Waste Water (Nejayote). *Letters In Applied Microbiology*. 52, 413-419, 2011.
91. Ahring B K, Methanogenesis In Thermophilic Biogas Reactors. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 67, 91-102, 1995.
92. Rincón B; Borja R; González J M; Portillo M C; Sáiz Jiménez C, Influence Of Organic Loading Rate And Hydraulic Retention Time On The Performance, Stability And Microbial Communities Of One-Stage Anaerobic Digestion Of Two-Phase Olive Mill Solid Residue. *Biochemical Engineering Journal*. 40, 253-261, 2008.
93. Mao C; Feng Y; Wang X; Ren G, Review On Research Achievements Of Biogas From Anaerobic Digestion. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*. 45, 540-555, 2015.
94. Nandi R; Sengupta S, Microbial Production Of Hydrogen: An Overview. *Critical Reviews In Microbiology*. 24 (1), 61-84, 1998.
95. Kalia V C; Jain S R; Kumar A; Joshi A P, Fermentation Of Biowaste To H₂ By *Bacillus Licheniformis*. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*. 10, 224, 1994.
96. Kumar A; Jain S R; Sharma C B; Joshi A P; Kalia V C, Increased H₂ Production By Immobilized Microorganisms. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*. 11, 156, 1995.

97. Guardia P Y; Rodríguez P S; Jiménez H J; Sánchez G V; Morgan S M; Noyola A, *Effect Of The Recycle On The Two-Phase Anaerobic Digestion Process Treating Coffee Wet Wastewater*, Mexico D.F, 2010.
98. Dogan E; Demirer G N, Biogas Generation By Two-Phase Anaerobic Digestion Of Organic Fraction Of Municipal Solid Waste. *Journal Of Renewable And Sustainable Energy*. 4, 131, 2012.
99. Zuo Z; Wub S; Zhang W; Dong R, Performance Of Two-Stage Vegetable Waste Anaerobic Digestion Depending On Varying Recirculation Rates. *Bioresource Technology*. 162, 266–272, 2014.
100. Nathoa C; Sirisukpoca U; Pisutpaisal N, Production Of Hydrogen And Methane From Banana Peel By Two Phase Anaerobic Fermentation. *Energy Procedia*. 50, 702–710, 2014.
101. Parawira W; Murto M; Zvauya R; Mattiasson B, Comparative Performance Of A Uasb Reactor And An Anaerobic Packed-Bed Reactor When Treating Potato Waste Leachate. *Renewable Energy*. 31, 893-903, 2006.
102. Ueno Y; Tatara M; Fukui H; Makiuchi T; Goto M; Sode K, Production Of Hydrogen And Methane From Organic Solid Wastes By Phase-Separation Of Anaerobic Process. *Bioresource Technology*. 98, 1861-1865, 2007.
103. Cooney M; Maynard N; Cannizzaro C; Benemann J, Two-Phase Anaerobic Digestion For Production Of Hydrogen–Methane Mixtures. *Bioresource Technology*. 98, 2641-2651, 2007.
104. Shuizhou K; Zhou S; Fang H H P, Applications Of Two-Phase Anaerobic Degradation In Industrial Wastewater Treatment. *International Journal Environment And Pollution*, 23 (1), 65-80, 2005.
105. Cota N C B; Carrillo R J; Davila V G; Alatraste M F; Razo F E, Continuous Hydrogen And Methane Production In A Two-Stage Cheese Whey Fermentation System. *Water Science And Technology*. 64.2, 367-374, 2011.