



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

**ENSILADO DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:

M. en Ing. Amb. Mario Francisco Castellón Zelaya

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Simón González Martínez - Instituto de Ingeniería

COMITÉ TUTOR:

Dr. Oscar Monroy Hermosillo – Universidad Autónoma Metropolitana
Dr. Iván Moreno Andrade – Instituto de Ingeniería

Ciudad de México, septiembre del 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DESIGNADO

Presidente: Dr. Iván Moreno Andrade
Secretario: Dra. Petia Mijaylova Nacheva
Primer vocal: Dr. Oscar Monroy Hermosillo
Segundo vocal: Dr. Adalberto Noyola Robles
Tercer vocal: Dr. Simón González Martínez

El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutor de la tesis: Dr. Simón González Martínez

Firma

DEDICATORIA

A **Dios** por su infinito amor y misericordia, por ser la mayor fuente de mi fortaleza y darme paz en medio de las dificultades.

*Porque Jehová da la sabiduría,
y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.*

Proverbio bíblico

A mi amada familia:

A mis hijas, **Brissa Xilonem** y **Athziry Marian**, quienes se han convertido en mi mayor fuente de inspiración y de lucha.

A mis padres, **Francisca Zelaya** y **Mario Castellón** por su incansable trabajo y la tenacidad con la que han cumplido el propósito de formarnos y educarnos.

A mis hermanos, **Mario Ulises**, **Lesly**, **Aura** y **Michael**, por el apoyo incondicional de siempre.

A mis **sobrinos**, quienes me alegran aún más la vida.

A la mita **Lilliam**, por haber sido en mi vida el soporte invaluable de amor, fe y lucha. Hasta el cielo, mi abrazo.

También quiero dedicar este trabajo a los estudiantes universitarios asesinados en Nicaragua durante la rebelión cívica que inició el 18 de abril del 2018. Especialmente a **Dodanim Jared Castilblanco Blandón** y **Cruz Alberto Obregón López**, estudiantes de la Universidad Nacional de Ingeniería, mi Alma Mater.

*Gloria eterna a nuestros héroes,
gloria eterna a su valor,
hoy son ejemplo de lucha,
de valía y convicción.*

*Nunca serán olvidados,
su legado es el amor.
La victoria de la patria
se vislumbra entre el horror.*

Jandir Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** y a su **Instituto de Ingeniería (II)** por haberme dado la oportunidad de formarme en tan prestigiosa institución y hacer realidad mi sueño de cursar un doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** de México por la beca otorgada, sin la cual mi estancia en este hermoso país no habría sido posible.

Al **Centro Mexicano para la Innovación en Bioenergía (CEMIE - Bio) - Clúster de Biocombustibles Gaseosos (CBG)**, proyecto 247006, y al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**, proyecto IT101320, por haber aportado la financiación de mi trabajo de tesis.

Al **Dr. Simón González Martínez** por haberme acogido como parte de su grupo de trabajo y por guiarme con dedicación durante todo el proceso de formación doctoral.

Al **Dr. Oscar González Barceló** por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas y a compartir su experiencia y conocimientos.

A los **Doctores Oscar Monroy Hermosillo** e **Iván Moreno Andrade**, quienes, como parte de mi Comité Tutor, semestre a semestre fueron dándome valiosos aportes que sin duda enriquecieron mi trabajo y mi formación.

Al **Dr. Adalberto Noyola Robles** y la **Dra. Petia Mijaylova Nacheva** por aceptar formar parte del jurado calificador en el examen de candidatura y de grado. Sus contribuciones fueron de suma importancia para agregar valor a este trabajo.

Al personal de la **Coordinación de Hidráulica y Ambiental**, y especialmente al personal del **Laboratorio de Ingeniería Ambiental**, quienes siempre estuvieron a disposición para darme apoyo técnico y logístico.

Al **M. C. Francisco Rojo Callejas**, de la Facultad de Química y al **Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios (GIPA)**, liderado por el Dr. Adalberto Noyola Robles, del Instituto de Ingeniería, por haberme colaborado muchas veces y de distintas formas para el desarrollo exitoso de este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS..... | 1 |
| 2.1 Características de la FORSU | 2 |
| 2.1.1 Características físicas | 2 |
| 2.1.2 Características químicas | 3 |
| 2.1.3 Composición bromatológica | 4 |
| 2.2 Biodegradabilidad de la FORSU | 4 |
| 3. ENSILADO | 6 |
| 3.1 Bioquímica del ensilado | 6 |
| 3.2 Microbiología del ensilado..... | 8 |
| 3.2.1 Bacterias del ácido láctico..... | 9 |
| 3.2.2 Enterobacterias | 9 |
| 3.2.3 Levaduras | 10 |
| 3.2.4 Clostridios | 10 |
| 3.2.5 Bacterias del ácido propiónico | 11 |
| 3.2.6 Bacterias del ácido acético | 12 |
| 3.3 Condiciones para el ensilado | 12 |
| 3.3.1 Características del sustrato | 12 |
| 3.3.2 Tamaño de la partícula | 13 |
| 3.3.3 Densidad..... | 13 |
| 3.3.4 Humedad | 13 |
| 3.3.5 Temperatura | 14 |
| 3.3.6 Uso de aditivos | 14 |
| 3.4 Parámetros de efectividad del ensilado | 15 |
| 3.4.1 pH..... | 15 |
| 3.4.2 Pérdidas de materia orgánica..... | 15 |
| 3.4.3 Producción de biogás | 16 |
| 4. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE FORSU..... | 17 |
| 4.1 Bioquímica de la digestión anaerobia..... | 17 |
| 4.2 Termodinámica de la digestión anaerobia | 19 |
| 4.3 Tipos de reactores anaerobios..... | 19 |
| 4.4 Parámetros operacionales..... | 22 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.4.1 | Características del sustrato | 22 |
| 4.4.2 | Humedad | 23 |
| 4.4.3 | Temperatura | 23 |
| 4.4.4 | Inóculo..... | 24 |
| 4.4.5 | Tiempo de retención hidráulica..... | 25 |
| 4.4.6 | Tiempo de retención de sólidos..... | 25 |
| 4.5 | Parámetros de control del proceso..... | 25 |
| 4.5.1 | pH..... | 26 |
| 4.5.2 | Alcalinidad y capacidad búfer..... | 26 |
| 4.5.3 | Inhibidores..... | 26 |
| 4.5.4 | Producción y composición del biogás..... | 27 |
| 4.6 | Cinética de la digestión anaerobia | 27 |
| 5. | METODOLOGÍA | 29 |
| 5.1 | Muestreo y caracterización de la FORSU..... | 29 |
| 5.1.1 | Recolección y almacenamiento..... | 30 |
| 5.1.2 | Caracterización de la FORSU | 31 |
| 5.2 | Fermentación de FORSU..... | 31 |
| 5.3 | Ensilado..... | 32 |
| 5.3.1 | Preparación de muestras..... | 32 |
| 5.3.2 | Condiciones de ensilado..... | 32 |
| 5.3.3 | Parámetros de monitoreo..... | 33 |
| 5.3.4 | Prueba de potencial bioquímico de metano..... | 34 |
| 5.4 | Aclimatación y producción de inóculos..... | 34 |
| 5.5 | Metanización de FORSU ensilada | 35 |
| 5.6 | Análisis estadístico..... | 36 |
| 5.7 | Modelación cinética..... | 36 |
| 5.8 | Métodos analíticos..... | 37 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 38 |
| 6.1 | Caracterización de la FORSU..... | 38 |
| 6.1.1 | Caracterización fisicoquímica | 38 |
| 6.1.2 | Biodegradabilidad | 39 |
| 6.2 | Fermentación de FORSU..... | 40 |
| 6.3 | Ensilado..... | 41 |
| 6.3.1 | Hidrólisis | 41 |
| 6.3.2 | Fermentación..... | 42 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6.3.3 | Pérdida de materia orgánica | 54 |
| 6.3.4 | Potencial bioquímico de metano de los ensilados | 55 |
| 6.4 | Aclimatación y producción de inóculos | 56 |
| 6.4.1 | Aclimatación del digestato a 20 °C | 57 |
| 6.4.2 | Aclimatación de digestato a 35 °C | 59 |
| 6.4.3 | Aclimatación de digestato a 55 °C | 61 |
| 6.4.4 | Características de digestatos aclimatados..... | 63 |
| 6.5 | Metanización de la FORSU ensilada | 64 |
| 6.5.1 | Metanización a 20 °C | 64 |
| 6.5.2 | Metanización a 35 °C | 69 |
| 6.5.3 | Metanización a 55 °C | 71 |
| 6.5.4 | Análisis comparativo de las condiciones de metanización..... | 73 |
| 7. | CONCLUSIONES..... | 80 |
| 8. | REFERENCIAS | 82 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Número | Título | Página |
|---------------|---|---------------|
| 2.1 | Características químicas de la FORSU | 4 |
| 3.1 | Metabolismo de carbohidratos durante el ensilado | 8 |
| 3.2 | Distribución típica de poblaciones microbianas iniciales en el ensilado | 9 |
| 3.3 | Principales características de clostridios predominantes en ensilados | 11 |
| 3.4 | Valor de pH estables y actividad de agua (a_w) en ensilados según la concentración de sólidos | 14 |
| 3.5 | Pérdidas de materia orgánica y energía según rutas de fermentación | 15 |
| 4.1 | Estequiometría y cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG°) para algunas reacciones acetogénicas en condiciones estándares. | 19 |
| 4.2 | Ventajas y desventajas de los sistemas de digestión anaerobia seca y húmeda | 20 |
| 4.3 | Tecnologías de digestión anaerobia seca | 21 |
| 5.1 | Arreglo experimental para la prueba de metanización para cada una de las temperaturas seleccionadas (20, 35 y 55 °C) | 36 |
| 5.2 | Métodos analíticos | 37 |
| 6.1 | Características de la FORSU de la Ciudad de México | 38 |
| 6.2 | Carbohidratos solubles en agua (CSA) antes y después del ensilado | 45 |
| 6.3 | Constantes de velocidad de producción de metabolitos totales | 47 |
| 6.4 | Valores de $\ln K$ y $1/T$ para linealización de la ecuación de Arrhenius | 47 |
| 6.5 | Energía de activación y frecuencia de colisión para reacciones de fermentación de la FORSU | 48 |
| 6.6 | Reducción de sólidos volátiles durante el ensilado | 54 |
| 6.7 | Características del inóculo | 57 |
| 6.8 | Características de digestatos aclimatados | 64 |
| 6.9 | Variación de pH durante la metanización a 20 °C | 65 |
| 6.10 | Producción de metano (P_{CH_4}) a 20 °C | 66 |
| 6.11 | Producción de metano de residuos sólidos orgánicos durante la digestión anaerobia psicrófila | 67 |
| 6.12 | Variación de pH durante la metanización a 35 °C | 69 |
| 6.13 | Producción de metano (P_{CH_4}) a 35 °C | 70 |
| 6.14 | Variación de pH durante la metanización a 55 °C | 71 |
| 6.15 | Producción de metano (P_{CH_4}) a 55 °C | 72 |
| 6.16 | Modelos de regresión para la producción de metano | 73 |
| 6.17 | Producción de metano de residuos sólidos orgánicos durante la digestión anaerobia mesófila y termófila | 74 |
| 6.18 | Modelos de regresión para los tiempos de reacción | 75 |
| 6.19 | Modelos de regresión para las constantes de velocidad | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Número | Título | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1.1 | Almacenamiento de residuos orgánicos urbanos en planta de biogás en Leonberg, Alemania | 1 |
| 3.1 | Cambios teóricos en el contenido de oxígeno, pH y poblaciones microbianas durante el ensilado | 7 |
| 4.1 | Proceso de degradación de material orgánico a través de la digestión anaerobia | 18 |
| 5.1 | Metodología general | 30 |
| 5.2 | Muestreo y recolección de la FORSU | 31 |
| 5.3 | Preparación de la FORSU para caracterización y trabajo experimental | 32 |
| 5.4 | Equipo utilizado para ensilado de la FORSU | 33 |
| 6.1 | Potencial de producción de metano de la FORSU | 40 |
| 6.2 | pH, AGV y sólidos volátiles durante el almacenamiento de la FORSU | 41 |
| 6.3 | Comportamiento de la DQO soluble durante el ensilado de la FORSU | 42 |
| 6.4 | pH y producción de metabolitos | 43 |
| 6.5 | Grado de fermentación de la FORSU | 44 |
| 6.6 | Ajuste de los modelos de Tessier y Monod para producción de metabolitos totales | 46 |
| 6.7 | Linealización de la ecuación de Arrhenius para diferentes concentraciones de sólidos | 48 |
| 6.8 | Relación de la energía de activación y la concentración de sólidos durante la fermentación de la FORSU | 49 |
| 6.9 | Producción de ácido láctico (AL) | 49 |
| 6.10 | Producción de etanol | 51 |
| 6.11 | Producción de AGV | 52 |
| 6.12 | Tasas máximas de producción de metabolitos | 53 |
| 6.13 | Producción de biogás durante el ensilado | 55 |
| 6.14 | PBM de la FORSU ensilada y fresca | 56 |
| 6.15 | pH, índice alfa (α) y AGV en reactor a 20 °C | 58 |
| 6.16 | Contenido y producción de metano durante la adaptación del inóculo a 20 °C | 59 |
| 6.17 | pH, índice alfa (α) y AGV en reactor a 35 °C | 60 |
| 6.18 | Contenido y producción de metano durante la adaptación del inóculo a 35 °C | 61 |
| 6.19 | pH, índice alfa (α) y AGV en reactor a 55 °C | 62 |
| 6.20 | Contenido y producción de metano durante la adaptación del inóculo a 55 °C | 63 |
| 6.21 | Producción bruta de metano de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) a 20 °C | 65 |
| 6.22 | Metabolitos en mezclas iniciales (I) y digestatos (F) de la prueba de metanización de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) | 68 |
| 6.23 | Producción bruta de metano de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) a 35 °C | 70 |
| 6.24 | Producción bruta de metano de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) a 55 °C | 72 |
| 6.25 | Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU ensilada metanizada a 35 °C | 76 |

| Número | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| 6.26 | Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU fresca metanizada a 35 °C | 76 |
| 6.27 | Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU ensilada metanizada a 55 °C | 77 |
| 6.28 | Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU fresca metanizada a 55 °C | 77 |
| 6.29 | Constantes de velocidad de producción de metano | 78 |

RESUMEN

El almacenamiento de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) es una práctica común en las plantas de biogás. Ahí, el almacenamiento temporal se da a menudo en condiciones no controladas y durante periodos que pueden ser hasta de varios meses, antes de ser procesada. Como alternativa al almacenamiento no controlado de la FORSU, en el presente trabajo se propone el ensilado; un método de almacenamiento controlado que requiere ajustar los parámetros del proceso para aumentar o disminuir los procesos bioquímicos. Durante el ensilado se llevan a cabo procesos de fermentación que afectan a la etapa posterior de metanización, y sobre los cuales no se reportan estudios para la FORSU. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del ensilado de la FORSU a diferentes concentraciones de sólidos y temperaturas sobre la producción de metano. La FORSU se ensiló a 20, 35 y 55 °C con concentraciones de sólidos totales de 10, 20 y 28 % durante 15 días. Posteriormente, la FORSU ensilada fue sometida a una prueba de metanización durante 25 días para determinar su producción de metano a diferentes relaciones sustrato a inóculo (S/I) de 0.5, 1.0 y 1.5. Como valor de referencia, la FORSU fresca también fue sometida a metanización. Para las pruebas de metanización se utilizaron digestatos previamente adaptados a las tres temperaturas y usando FORSU como sustrato.

Independientemente de la temperatura, la producción de metabolitos durante el ensilado (fermentación) aumenta al disminuir la concentración de sólidos. En el ensilado a 35 °C, la fermentación y su consecuente disminución del pH fue más rápida que a 20 °C. A 35 °C la fase estable del ensilado se alcanza en 4 días, mientras que a 20 °C se alcanza en 8 días. Sin embargo, a 20 °C la acidez es mayor y por tanto el pH es menor que a 35 °C. A 55 °C la fermentación de la FORSU solo es significativa en el ensilado a bajas concentraciones de sólidos. Bajo cualquier condición de ensilado, los metabolitos de mayor producción son el ácido láctico, etanol y ácido acético, los cuales, en conjunto, representan más del 95 % del total de metabolitos detectados. Durante el ensilado, la pérdida de materia orgánica asociada con la producción de biogás es proporcional al grado de fermentación que alcanza la FORSU. Las mejores condiciones de ensilado de la FORSU resultan a 35 °C y 10 % de sólidos totales, ya que, bajo estas condiciones, la FORSU alcanza el mayor grado de fermentación y el ensilado requiere el menor tiempo para alcanzar un pH bajo y estable.

A 20 °C, la metanización de la FORSU ensilada y fresca a altas relaciones S/I resulta inhibida por la acumulación de ácidos grasos volátiles. A 35 y 55 °C, la producción de metano de FORSU ensilada a 10 % de sólidos totales es, independientemente de la relación S/I, mayor entre 5 y 29 % que la FORSU fresca. La producción de metano aumenta al disminuir la relación S/I. Durante la metanización de FORSU ensilada y fresca, la concentración de sólidos durante el ensilado es el parámetro que determina la producción de metano: al disminuir la concentración de sólidos durante el ensilado, aumenta la producción de metano. La relación S/I es el parámetro que más influye sobre los tiempos de producción de metano, al aumentar la concentración de inóculo aumenta la producción de metano. A 55 °C la rapidez de la producción de metano a partir de la FORSU ensilada es mayor que a 35 °C. Esto se debe a que la producción de metabolitos durante el ensilado a 55 °C es inferior que a 35 °C. A 35 °C la producción de metano a partir de FORSU ensilada es mayor que a partir de FORSU fresca para todas las condiciones de concentración de sólidos y relación S/I evaluadas.

Palabras clave: digestión anaerobia, ensilado, fermentación, FORSU, producción de metano

ABSTRACT

Storage of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) is a common practice in biogas plants. There, temporary storage often takes place under uncontrolled conditions and for several days or even months before being introduced into the reactors. As an alternative to the uncontrolled storage of OFMSW, silage is proposed in the present work. Silage is a controlled storage method that requires adjusting process parameters to increase or decrease the biochemical processes. During ensiling, fermentation processes develop, and they can affect the subsequent methanisation. Concerning OFMSW silage, no studies were found. Therefore, this work aimed to determine how OFMSW silage at different solids concentrations and temperatures influences subsequent methane production. OFMSW was ensiled at 20, 35, and 55 °C with total solids concentrations of 10, 20, and 28 % for 15 days. The ensiled OFMSW was subjected to a methanization test for 25 days to determine the methane production at different substrate-to-inoculum (S/I) ratios of 0.5, 1.0, and 1.5. As a reference value, fresh OFMSW was also tested through methanisation. For the methanisation tests, a digestate previously adapted to substrate and different temperatures was used as inoculum.

Regardless of the temperature, the production of metabolites during ensiling increases as the solids concentrations decrease. In the silage at 35 °C, the fermentation and consequent reduction in pH was faster than at 20 °C. At 35 °C, the stable silage phase (stable, low pH) is reached in 4 days, while at 20 °C, it requires 8 days. At 20 °C, the acidity is higher, resulting in lower pH values than at 35 °C. At 55 °C, OFMSW fermentation is only significant in silage at low solids concentrations. Independently of the silage condition, the metabolites with the highest production are lactic acid, ethanol, and acetic acid, which, together, represent more than 95 % of the total detected metabolites. During ensiling, the loss of organic matter associated with biogas production is proportional to the fermentation degree. The best silage conditions for OFMSW are at 35 °C and 10 % total solids; under these conditions, OFMSW reaches the highest fermentation degree, and the silage requires shorter times to reach a lower and stable pH.

At 20 °C, the methanisation of ensiled and fresh OFMSW at high S/I ratios is inhibited by the accumulation of volatile fatty acids. At 35 and 55 °C, the methane production from ensiled OFMSW at 10 % total solids results, under all temperatures and S/I ratios, in higher methane production (5 to 29 %) than from fresh OFMSW. Methane production increases as the S/I ratio decreases. During the methanisation of ensiled and fresh OFMSW, the solids concentration is the most critical parameter to determine methane production. Decreasing solids concentration during silage increases methane production. The S/I ratio is the parameter with the most influence to reduce reaction times so that, as the inoculum concentration increases, the substrate is transformed more rapidly. At 55 °C, the speed of methane production from ensiled OFMSW is more significant than at 35 °C because the metabolites production during silage at 55 °C is lower than at 35 °C. The best temperature condition for the methanisation of ensiled OFMSW is 35 °C. In this condition of temperature, the methane production from ensiled OFMSW is higher than from fresh OFMSW for all conditions of solids concentration and S/I ratios evaluated.

Keywords: anaerobic digestion, fermentation, methane production, OFMSW, silage

1. INTRODUCCIÓN

En las plantas de digestión anaerobia, el almacenamiento temporal de los residuos es una práctica común y necesaria debido a diferentes causas: adaptación a la estacionalidad de la producción de los sustratos (residuos agrícolas y cultivos energéticos), dispersión de las fuentes de producción de los residuos, capacidad limitada de los sistemas de recolección y transporte, y a la capacidad limitada de procesamiento de las plantas (Worrel y Aarne, 2011). El almacenamiento temporal de residuos también está asociado con factores de mercado, ya que en países con climas muy fríos es altamente conveniente mantener la producción de biogás durante el invierno, cuando la demanda y el precio de la energía son más elevados (Seppälä *et al.*, 2008). En todos los casos de almacenamiento temporal de residuos orgánicos se procura evitar la producción de metano que no pueda ser capturado y que pudiera ser emitido libremente a la atmósfera.

En el caso de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), las prácticas de almacenamiento de la FORSU en las plantas de biogás son comunes en Europa, China y otros países donde se han implementado procesos industriales de producción de biogás a partir de residuos orgánicos urbanos (Stürmer, 2017; Al Seadi *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2016). El almacenamiento temporal de los residuos se realiza desde el momento en que estos son producidos y colocados en contenedores en los sitios de generación (viviendas, comercios, espacios públicos, entre otros), donde el material orgánico comienza a degradarse (Nilsson *et al.*, 2018). Posteriormente, dependiendo de la capacidad y eficiencia del sistema de recolección (Malinauskaite *et al.*, 2017), el almacenamiento se prolonga hasta que finalmente los residuos son llevados a las plantas de tratamiento (Figura 1.1). Ahí, el almacenamiento temporal se da a menudo en condiciones no controladas y durante periodos que pueden ser incluso de varios meses antes de ser introducida en los reactores.



Figura 1.1– Almacenamiento de residuos orgánicos urbanos en planta de biogás en Leonberg, Alemania (González-Martínez, comunicación personal).

Dependiendo del contenido de materia orgánica, humedad y demás condiciones ambientales en que la FORSU es almacenada, existe un alto riesgo de actividad microbiana no deseada, lo que además de provocar fuertes emisiones de olores, también puede provocar modificaciones considerables a sus características físicas, químicas y reológicas (Esposito, 2012), induciendo la pérdida de humedad y de materia orgánica, ya sea por los propios procesos de conversión biológica o por lixiviación durante el almacenamiento (Wu *et al.*, 2016). Así mismo, durante el almacenamiento, las sustancias fácilmente biodegradables pueden ser rápidamente convertidas en metabolitos fermentativos, los cuales se acumulan produciendo condiciones de acidez, que deben controlarse adecuadamente para evitar perturbaciones durante la posterior metanogénesis (Fantozzi y Buratti, 2011).

Una alternativa al almacenamiento no controlado de residuos orgánicos es el ensilado; una técnica de almacenamiento utilizada antiguamente para la preservación de forrajes (Oude *et al.*, 1999) y que recientemente ha sido utilizada como un pretratamiento biológico con el objetivo de mantener con cambios mínimos el contenido de humedad natural y de nutrientes de residuos agrícolas y cultivos energéticos utilizados para producir biogás (Egg *et al.*, 1993; Bochmann y Montgomery, 2013). Durante el ensilado se producen diversos metabolitos, siendo el ácido láctico el de mayor producción (Cavinato *et al.*, 2017), el cual al acumularse provoca una disminución del pH que inhibe el crecimiento microbiano y que al prolongarse por extensos periodos (Seppälä *et al.*, 2008) impide la producción de metano durante esta etapa, dando como resultado la conservación satisfactoria de nutrientes y de energía (Kalamaras y Kotsopoulos, 2014).

El ensilado de residuos agrícolas para la producción de biogás es una práctica extendida en países europeos. En Alemania, país líder con más de 8,000 plantas de biogás, los ensilados de residuos agrícolas y cultivos energéticos utilizados para la digestión anaerobia representan el 52 % de la masa tratada, los estiércoles representan el 43 % y el resto son residuos industriales, agroindustriales y urbanos (DBFZ, 2016). Hay estudios que muestran que el ensilado como etapa de tratamiento previo a la digestión anaerobia permite mejorar el rendimiento de producción de metano a partir de sustratos homogéneos (Pakarinen *et al.*, 2011; Wang, 2010; Herrmann *et al.*, 2011) y que las condiciones de ensilado tienen un efecto significativo sobre el diseño y la operación de los reactores, así como sobre la relación costo/beneficio del proceso (Kothari *et al.*, 2014; Zupančič y Grilc, 2012). Además, si el ensilado se realiza sin aditivos químicos, se considera un método particularmente amigable con el medio ambiente para mejorar el potencial de metano de la biomasa lignocelulosa, ya que además de su bajo costo y de su pequeño requerimiento de energía, no deja residuos en comparación con los pretratamientos físicos y químicos (Kafle y Kim, 2013).

El ensilado de la FORSU previo a la metanogénesis implica la separación física de la digestión anaerobia en dos etapas (hidrólisis – fermentación y metanogénesis), permitiendo ajustar las condiciones operativas de cada una de ellas para optimizar las actividades metabólicas específicas de cada etapa y finalmente aumentar la energía obtenida de la FORSU a través de la producción de metano (Schievano *et al.*, 2014).

El ensilado como un método de almacenamiento controlado requiere ajustar los parámetros del proceso para aumentar o disminuir los procesos inherentes. Para que el ensilado sea efectivo, la acidificación inicial rápida es la clave, y uno de los principales parámetros operativos es la concentración de sólidos (Zhou *et al.*, 2018), dada su relación con la biodisponibilidad del agua en el medio y su efecto sobre la dinámica microbiana y la cinética de las reacciones (García-Bernet *et al.*, 2011). Un impacto comúnmente reportado es que una mayor concentración de sólidos totales (ST) ralentiza el crecimiento bacteriano y, en consecuencia, conduce a una fermentación limitada, afectando la conservación del sustrato. También se ha informado que la baja concentración de sólidos puede dar lugar a la formación de lixiviados durante el ensilado, produciendo pérdidas de nutrientes y energía, provocando una contaminación severa en los cuerpos receptores y problemas de manejo de efluentes (Kung *et al.*, 2018).

Otro parámetro crítico para un ensilado exitoso es la temperatura, dado su efecto sobre la actividad enzimática y la degradación térmica de compuestos orgánicos complejos (Buffière *et al.*, 2018). A bajas temperaturas, la fermentación láctica puede no ser tan eficiente si no hay suficientes sustratos fácilmente degradables. Si la fermentación se desarrolla a temperaturas más bajas, el metabolismo de las bacterias se ralentiza hasta un punto en el que no se puede lograr la hidrólisis. Es fundamental que la temperatura no se convierta en un obstáculo para la hidrólisis y que se pueda producir suficiente ácido láctico como clave para la conservación del sustrato (Teixeira Franco *et al.*, 2016).

Existen pocos estudios sobre cómo la concentración de sólidos y la temperatura durante el ensilado afectan la producción posterior de metano. Esto ha limitado la comprensión de como estas dos variables afectan los procesos bioquímicos de la fermentación durante el ensilado y, por tanto, la producción de metano a partir de los productos del ensilado (Teixeira Franco *et al.*, 2016). En lo que a la FORSU se refiere, hasta ahora no se reportan estudios sobre que sucede durante su ensilado, ni de como los parámetros considerados claves pueden ser controlados para lograr un ensilado efectivo y de calidad que permita conservar e incluso mejorar el potencial de producción de metano de la FORSU. El adecuado control de las condiciones de ensilado de la FORSU puede conducir a lograr significativos beneficios en cuanto a aumentar la eficiencia de la digestión anaerobia de FORSU previamente ensilada.

Considerando que la eficiencia de la digestión anaerobia se determina con base en la cantidad de metano producido en un intervalo de tiempo y en relación con la energía potencialmente recuperable del propio sustrato, el aumento de la producción de metano en un tiempo más corto es la meta más importante para aumentar la eficiencia general del proceso. Esto se logra mediante la variación de dos parámetros principales: la relación sustrato a inóculo (S/I) y la temperatura. En la metanización de un sustrato previamente ensilado, la cantidad de sustrato con relación a la cantidad de inóculo metanogénico es considerada el factor principal que impulsa el inicio de las reacciones durante el arranque del proceso, ya que permite que el sistema asimile la producción inicial de metabolitos de la fermentación (Motte *et al.*, 2013), pudiéndose prevenir sobrecargas que pueden afectar a los microorganismos metanógenos. Respecto al efecto de la temperatura sobre la metanogénesis, se ha reportado que la metanización a altas temperaturas se ve favorecida debido a que la tasa de crecimiento específica de los microorganismos es más alta (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2013), aumentando así la tasa de degradación de los sustratos y reduciendo los tiempos de retención en los reactores (Krause *et al.*, 2018).

Siendo la FORSU un sustrato heterogéneo y complejo, el presente trabajo de investigación está dirigido a determinar qué sucede con los procesos de conversión bioquímica y la biodegradabilidad durante su ensilado en plantas de biogás y cuáles deberían ser las condiciones más adecuadas en que el ensilado debe llevarse a cabo para un mayor aprovechamiento energético de la FORSU. El objetivo principal de este estudio fue determinar los efectos del ensilado de la FORSU a diferentes concentraciones de sólidos y temperaturas sobre la producción de metano. Adicionalmente, durante la etapa de metanización, se evaluó el efecto de la concentración relativa de microorganismos metanogénicos (relación S/I) sobre la producción de metano a partir de la FORSU.

Hipótesis

Durante el ensilado de cultivos energéticos se procura que la fermentación se lleve a cabo de una manera rápida para que, al aumentar la producción de ácidos orgánicos, el pH disminuya y los procesos microbiológicos se reduzcan al mínimo y no degraden el material de una manera indeseada. Para el ensilado de la FORSU se desea alcanzar un alto grado de fermentación con la mínima pérdida de material orgánico por producción de CO₂. Así mismo, se procura aumentar el grado de fermentación y así aumentar la solubilización de las sustancias que, posteriormente, se pueden utilizar para producir metano. Por estas razones, las hipótesis que se plantean tienen dos aspectos: el concerniente a la fermentación durante el ensilado y la de la metanización de los productos de la fermentación.

1. Durante el ensilado, el grado de fermentación de la FORSU incrementa al disminuir la concentración de sólidos y al aumentar la temperatura.
2. La producción de metano a partir de la FORSU ensilada aumenta al disminuir la concentración de sustrato, ya que disminuye la acumulación de metabolitos y la probabilidad de una inhibición.

Objetivo general

Determinar el efecto de la concentración de sólidos y temperatura durante el ensilado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos sobre la producción de metano.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la concentración de sólidos y la temperatura sobre la fermentación durante el ensilado de la FORSU.
2. Determinar el efecto del ensilado sobre la biodegradabilidad de la FORSU, medida como el potencial de producción de metano.
3. Determinar el efecto de la relación sustrato a inóculo y la temperatura sobre la producción de metano a partir de FORSU previamente ensilada.
4. Evaluar la eficiencia de producción de metano a partir de FORSU previamente ensilada con respecto a la producción de metano de FORSU fresca.

2. RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (DOFM, 2015) de México, define los residuos sólidos urbanos (RSU) como “los generados en las casas de habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques; los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias, y los resultantes de la limpieza de las vías y lugares públicos”.

En cuanto a los residuos orgánicos, la Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal (GDF, 2019) los define como “todo residuo sólido biodegradable”. Por su parte, la Directiva 2008/98/CE (EUR-Lex, 2018) de la Comunidad Europea hace una definición más amplia de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), también denominada como bio residuos: “la porción de residuos biodegradables de jardines y parques, residuos alimenticios y de cocina procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de consumo al por menor, y residuos comparables procedentes de plantas de transformación de alimentos sólidos”.

En dependencia de las características sociales, económicas, culturales y geográficas, la FORSU puede llegar a representar entre un 50 y 70 % en peso de los residuos sólidos municipales (RSM) (Braguglia *et al*, 2017). Según el Banco Mundial (2018), la proporción de la FORSU está principalmente influenciada por los niveles de ingresos de los países, los cuales a su vez reflejan patrones variados de consumo. Los países de altos ingresos generan relativamente menos alimentos y residuos verdes, con un 32 % del total de desechos; mientras que los países de ingresos medios y bajos generan 53 y 56 % de desperdicios alimenticios y verdes, respectivamente.

El Banco Mundial también reporta que, a nivel mundial, en el año 2016 se generaron aproximadamente 2,010 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos, de los cuales 231 se produjeron en América Latina y el Caribe. En México, según datos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2020), la generación de residuos sólidos urbanos es de 120,128 toneladas por día, de los cuales el 46.42 % corresponde a la fracción orgánica.

Según la Agencia Europea del Medio Ambiente (EEA por sus siglas en inglés), en el año 2020, en el continente europeo se procesaron 17 millones de toneladas de FORSU en plantas de digestión anaerobia, lo cual representa el 47 % de los bioresiduos producidos cada año. En México y el resto de Latinoamérica menos del 1 % de los residuos se tratan mediante biodigestión (Banco Mundial, 2016). Lo anterior indica que la FORSU continúa siendo un recurso valioso con un enorme potencial de aprovechamiento para la producción de energía y otros subproductos. Sin embargo, para lograrlo hace falta abordar diversos desafíos, entre ellos: reducir la brecha entre la investigación a escala de laboratorio y su transferencia a una escala industrial, optimizar los parámetros operacionales de producción, maximizar los rendimientos y eficiencia de los procesos, y disminuir los costos de producción (EEA, 2020).

2.1 Características de la FORSU

La FORSU es un sustrato altamente heterogéneo cuya composición puede variar ampliamente en función de los hábitos de consumo, la región geográfica, tamaño de poblaciones, condiciones climáticas y estacionales, desarrollo socioeconómico y sistemas de recolección. La caracterización de la FORSU es primordial para su uso en la recuperación de energía por medio de la digestión anaerobia, ya que, de su composición física, química y reológica dependerá la formulación de los esquemas de clasificación y recolección, la selección del tipo de tecnología de aprovechamiento, los parámetros operacionales y finalmente, la calidad del biogás y digestato producidos (Campuzano y González-Martínez, 2016, Hongyu *et al.*, 2019).

2.1.1 Características físicas

Según Campuzano y González-Martínez (2016), entre los principales parámetros que caracterizan físicamente a la FORSU están: tamaño de partícula, densidad, contenido de humedad y reología. Estos parámetros están a su vez influenciados por factores de diversa índole que definen las condiciones en que la FORSU llega a las plantas de biogás. La recolección de la FORSU ha ganado una importancia creciente como un factor determinante en la conveniencia del uso de la FORSU como sustrato en la industria del biogás (Nilsson *et al.*, 2018). Lo anterior se debe a que, el tratamiento anaerobio de la FORSU se ha hecho posible gracias a la introducción de la separación en la fuente como una fracción biodegradable limpia. Por tanto, si la FORSU no es separada en la fuente, es necesario un paso de preclasificación para eliminar compuestos no aptos para la digestión anaerobia, lo que implica un aumento significativo en el costo del tratamiento y en la calidad del proceso (Appels *et al.*, 2011).

➤ Tamaño de partícula

Por la naturaleza de producción y composición heterogénea de la FORSU, a menudo se encuentra una distribución muy variada del tamaño de partículas. En esquemas de procesamiento biológico como la digestión anaerobia de la FORSU, la reducción del tamaño de partícula es una operación estándar (Zhang *et al.*, 2019), donde el tamaño óptimo de la partícula depende de cada proceso implementado.

En general, la reducción del tamaño de partícula de un residuo ocasiona el consiguiente aumento del área superficial y con ello mejora la eficiencia general de la bioconversión del sustrato, y es determinante en la calidad del digestato (Karthikeyan y Visvanathan, 2013).

El tamaño de las partículas no debe ser demasiado grande pues podría provocar una obstrucción en los reactores y dificultar que los microorganismos lleven a cabo su digestión. Las partículas más pequeñas, por otra parte, proporcionarían una gran área superficial para adsorber el sustrato que daría como resultado una mayor actividad microbiana y, por tanto, una mayor producción de biogás. Adicionalmente, un pretratamiento físico tal como la trituración o la molienda podría reducir significativamente el volumen de digestor requerido sin disminuir la producción de biogás (Gashaw, 2014; Yadvika *et al.*, 2004); pero la reducción excesiva del tamaño puede causar la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), disminuyendo la producción de metano (Cesaro y Belgiorno, 2014).

Kayhanian y Hardy (1994) identificaron al tamaño de partícula como un parámetro importante en el desempeño del proceso de digestión anaerobia de la FORSU. Sus resultados indicaron que la tasa de producción de metano era inversamente proporcional al tamaño medio de partícula. Además, concluyeron que la reducción del tamaño de partícula también reduce las dificultades de manipulación del material. Sin embargo, dependiendo del contenido de humedad, la trituración de los residuos puede conducir a la compactación de los residuos y a un menor contenido de humedad óptimo (Hartmann y Ahring, 2006).

➤ **Densidad**

La densidad es un parámetro estrechamente relacionado al tamaño de partícula y el contenido de humedad de la FORSU, el cual a menudo es utilizado para realizar cálculos y analizar el comportamiento de la digestión anaerobia (Campuzano, 2015). En procesos con alto contenido de sólidos, la densidad del sustrato puede afectar la distribución de microorganismos en el medio, especialmente en las etapas de hidrólisis y acidogénesis. La baja densidad ayuda a mantener buenos niveles de porosidad, mejorando la transferencia de masa y manteniendo una comunidad microbiana activa, por lo tanto, para evitar una alta compactación, el valor adecuado de densidad debe ser inferior a 1000 kg/m^3 (Petchsri *et al.*, 2004). Según revisión de literatura especializada realizada por Campuzano y González-Martínez (2016), la densidad de la FORSU varía entre 328 y 1052 kg/m^3 .

➤ **Humedad**

El contenido de humedad del sustrato es un parámetro clave para la selección y operación de las tecnologías de digestión anaerobia (húmeda o seca), ya que se relaciona con el volumen requerido de los reactores y el manejo de los digestatos, además de afectar el transporte, la difusión y la cinética de las reacciones del proceso (Forster, 2005; García-Bernet *et al.*, 2011). Según recopilación de valores de humedad de la FORSU en 43 ciudades de diferentes países realizada por Campuzano y González-Martínez (2016), la humedad de la FORSU varía entre 62 y 85 %.

Con respecto a la distribución del agua contenida en la FORSU, García-Bernet *et al.* (2011) aplicaron técnicas analíticas para determinar la distribución del agua en el sustrato y digestatos de plantas que tratan FORSU. Los resultados muestran que el agua está presente bajo 2 formas diferentes: el agua libre (la parte de agua que se puede eliminar por filtración) y la parte intersticial (presente en la estructura capilar de la materia orgánica). Así mismo concluyeron que la estructura capilar cambia con la degradación microbiana, y que la fracción de agua capilar fue más importante en los digestatos que en los residuos iniciales.

➤ **Reología**

La reología es un parámetro con una influencia muy importante sobre las diversas etapas de procesamiento de la FORSU mediante la digestión anaerobia (Campuzano, 2015). La reología se aplica a un fluido que tiene una estructura compleja, tal como la FORSU, y su comportamiento de flujo no se puede caracterizar solamente por la viscosidad (Yang *et al.*, 2018). Según Cao *et al.* (2016) el comportamiento reológico de un fluido se ve influenciado por la concentración de sólidos, temperatura y la distribución de los tamaños de las partículas (granulometría). Hasta ahora, los estudios de reología relacionados con la FORSU se centran en los digestatos producidos y no en la FORSU fresca. Esto se debe a la necesidad de optimizar el diseño y el funcionamiento de los procesos de mezcla y bombeo de digestatos para su recirculación o transporte (Cao *et al.*, 2016).

2.1.2 *Características químicas*

La FORSU es un sustrato bastante heterogéneo y, por tanto, los parámetros que la caracterizan químicamente también lo son, influenciando las estrategias para su manejo y el rendimiento de los procesos de tratamiento. En la digestión anaerobia de la FORSU, a menudo resulta difícil establecer con claridad la influencia de las características químicas sobre el rendimiento de metano, al no poderse establecer comparaciones con resultados de rendimientos generados a partir de sustratos con características tan variadas. En respuesta a esta problemática, Campuzano y González-Martínez (2016) recopilaron y homogeneizaron información sobre las características químicas de la FORSU de 43

ciudades de 22 países, incluyendo México. Los valores promedios con base en peso húmedo obtenidos por Campuzano y González-Martínez (2016) se muestran en la Tabla 2.1.

Con un valor promedio de $\text{pH} = 5.2 \pm 0.95$, la FORSU resulta ser un sustrato acidificado, como consecuencia de los procesos de degradación que tienen lugar desde que los residuos son producidos en los sitios de generación (Nilsson *et al.*, 2018). Así mismo, la baja relación de sólidos volátiles con respecto a los sólidos totales (SV/ST) de la FORSU en comparación con otros sustratos orgánicos complejos tratados mediante digestión anaerobia, tales como el ensilado de maíz (SV/ST = 0.87) y paja de trigo (SV/ST = 0.94) (Wang, 2010; Labatut *et al.*, 2010), indica un alto contenido de material inerte.

Tabla 2.1 Características químicas de la FORSU. Adaptado de Campuzano y González-Martínez (2016)

| Parámetro | Valor | Unidades |
|----------------------------------|-----------------|----------|
| pH | 5.2 ± 0.95 | - |
| Sólidos totales (ST) | 27.2 ± 7.6 | % |
| SV/ST | 0.85 ± 0.09 | - |
| Fósforo total (P_T) | 1.7 ± 2.5 | g/kg |
| Nitrógeno total (N_T) | 7.9 ± 5.4 | g/kg |
| Demanda química de oxígeno (DQO) | 332 ± 122 | g/kg |

De acuerdo con los valores de nitrógeno y fósforo mostrados en la Tabla 2.1, la FORSU es un sustrato pobre en el contenido de nutrientes, por lo que la codigestión de FORSU con sustratos ricos en nutrientes es una alternativa muy difundida para superar los inconvenientes de la monodigestión de la FORSU (Mata-Alvarez, 2014; Esposito *et al.*, 2012; Hartmann *et al.*, 2002). El contenido de fósforo y nitrógeno es un importante indicador de la viabilidad de un sustrato para la digestión anaerobia, dado su papel en el balance nutricional requerido en el proceso (Hussain *et al.*, 2015).

Con respecto a la DQO, este parámetro presenta una alta variabilidad en sus valores, la cual está principalmente asociada a las dificultades en el manejo de las muestras y la heterogeneidad del sustrato. Al igual que el contenido de sólidos volátiles, la DQO es un indicador del contenido de materia orgánica del sustrato, por lo que su relación resulta útil para determinar el potencial de producción de metano del sustrato.

2.1.3 Composición bromatológica

El conocimiento de la composición de la FORSU en cuanto a su contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos y lignina resulta esencial, pues de la influencia de cada una de estas fracciones dependerá el potencial de degradación biológica del sustrato (Nielfa *et al.*, 2015; Hartmann y Ahring, 2006). Según Campuzano y González-Martínez (2016), la FORSU está compuesta principalmente de carbohidratos, representando esta fracción el 55.5 ± 10.1 % de los sólidos volátiles, seguido de grasas con 17.5 ± 6.6 17.7 %, proteínas: 17.7 ± 5.5 % y lignina en un 9.7 ± 5.3 %. La fracción lignocelulósica representa el 37.6 % de los sólidos volátiles de la FORSU, siendo estos componentes los de más difícil biodegradación y, por tanto, pueden influir considerablemente sobre el potencial de producción de metano.

2.2 Biodegradabilidad de la FORSU

El contenido de materia orgánica, medido en términos de sólidos volátiles, es un indicador primario de la biodegradabilidad de un sustrato (Raposo *et al.*, 2011). Con base en el valor de la relación de sólidos volátiles a sólidos totales (SV/ST), la FORSU es considerada un sustrato de alta biodegradabilidad pues,

de acuerdo con Pavan *et al.* (2000^a), un sustrato es susceptible de ser biodegradado cuando la relación SV/ST es mayor a 0.7.

La caracterización elemental de los sustratos es otro enfoque de medición de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos. Con base en el contenido de ciertos elementos (C, H, O, N y S) y considerando que el sustrato será transformado completamente por los organismos anaerobios, es posible estimar la producción de CH₄, CO₂ y NH₃ (Raposo *et al.*, 2011; Symons and Buswell, 1933). Con base en reportes de análisis elemental de FORSU de 14 ciudades de 8 países, Campuzano y González-Martínez (2016) determinaron que, como porcentaje del peso húmedo, la fórmula estequiométrica de la FORSU es C_{46.6}H_{6.6}N_{2.9}S_{0.3}.

La demanda química de oxígeno (DQO) es otro parámetro usado comúnmente para medir el contenido orgánico total de los sustratos (Raposo *et al.*, 2011). La DQO puede ser utilizada para la predicción de la producción de metano, mediante la producción teórica de 350 NmL de metano por gramo de DQO (McCarty, 1964). Posteriormente, la producción de metano se relaciona con las tasas de degradación de la fracción orgánica del sustrato. Así mismo, la relación de la DQO con los SV puede proveer más información sobre la biodegradabilidad de un sustrato, de modo que la relación DQO/SV proporciona información sobre la cantidad de oxígeno requerido para oxidar un gramo de sólido volátil. Para la FORSU de Ciudad de México, Campuzano y González-Martínez (2015) reportan una relación DQO/SV de 1.36.

Finalmente, una de las técnicas más populares y rutinarias realizadas en la academia y la industria para determinar la biodegradabilidad de la biomasa es la prueba de potencial bioquímico de metano (PBM) (Filer *et al.*, 2019; Koch *et al.*, 2019). El valor promedio del potencial de producción de la FORSU de 27 ciudades reportado por Campuzano y González-Martínez (2016) es de 415 ± 137.7 NL/kg_{SV}. Para la Ciudad de México, Campuzano y González-Martínez (2015) reportan un potencial de producción de metano de 541 ± 14 NL/kg_{SV} (referido a los SV alimentados). La alta variabilidad en el valor de PBM se debe tanto a la variación en la composición física y química de la FORSU como a las diversas condiciones experimentales en las que la prueba se lleva a cabo, pues aún sigue habiendo falta de estandarización de las técnicas (Filer *et al.*, 2019; Campuzano y González-Martínez, 2016).

3. ENSILADO

El ensilado es un método de preservación basado principalmente en una fermentación espontánea de ácido láctico en condiciones anaerobias (Oude *et al.*, 2000), en la que bacterias epífitas fermentan los carbohidratos solubles en agua produciendo ácido láctico, ácido acético, etanol y otros productos menores (Bolsen *et al.*, 1996). Debido a la producción de ácidos, el pH del material ensilado disminuye y se inhiben los microorganismos que pueden producir la pérdida de materia orgánica (p.e. producción de CO₂ y CH₄) y nutrientes del sustrato ensilado (Oude *et al.*, 2000). Por tanto, la acidificación inicial rápida es la clave para controlar el crecimiento de microorganismos competidores de las bacterias del ácido láctico (BAL), los que continuarán creciendo hasta que se haya logrado una concentración inhibitoria de ácidos no disociados y un pH suficientemente bajo.

3.1 Bioquímica del ensilado

En un ensilado ideal, las bacterias homolácticas usan los carbohidratos solubles para el crecimiento y producen solo ácido láctico, lo que resultaría en un proceso bioquímico esencialmente sencillo (Kung *et al.*, 2018). Sin embargo, en la práctica el ensilado es un proceso que puede volverse complejo cuando se involucran interacciones entre las muchas especies microbianas que dan como resultado una gran variedad de productos finales (Rooke y Hatfield, 2003). Con base en las principales transformaciones bioquímicas, el proceso de ensilado comúnmente es dividido en cuatro fases (Figura 3.1):

Fase 1.- Fase aerobia inicial. Esta fase normalmente dura las pocas horas en que el O₂ atrapado en el sustrato mantiene la respiración de los microorganismos (Figura 3.1) y se acompaña de la generación de calor, dióxido de carbono y agua (Tabla 3.1). Otras enzimas vegetales permanecen activas. Las proteasas inician la descomposición de proteínas en aminoácidos, y las carbohidrasas aumentan la cantidad de carbohidratos solubles disponibles para la fermentación. Los microorganismos aerobios obligados y facultativos como mohos, levaduras y algunas bacterias permanecen activos, siempre que el pH se mantenga cercano al valor de pH del sustrato fresco (Oude *et al.*, 2000). Esta etapa se puede acortar mediante una trituración fina y buena compactación del sustrato (McDonald *et al.*, 1991).

Fase 2.- Fase de fermentación principal. Esta fase comienza una vez que se ha agotado el O₂ y dura dependiendo de las propiedades del sustrato y las condiciones de ensilado. En esta etapa los microorganismos anaerobios facultativos y obligados, como las enterobacterias, clostridios, ciertos bacilos y levaduras compiten con las BAL por los nutrientes que se liberan cada vez más de las células y tejidos del sustrato (Figura 3.1). Los signos externos de fermentación son la producción de biogás, efluentes líquidos y la reducción de la masa del ensilado (Tabla 3.1). En un ensilado exitoso los cambios microbianos durante esta fase son principalmente la desaparición de enterobacterias y el desarrollo de una población de BAL dominante. La velocidad de este cambio está estrechamente relacionada con la producción de ácido láctico y la rapidez en la disminución del pH hasta valores en un rango de 3.5 a 5.0 (Oude *et al.*, 2000).

Fase 3.- Fase de fermentación estable. Esta etapa llega con la disminución de la intensidad de la fermentación. Solo las enzimas tolerantes a los ácidos continúan activas, causando una lenta hidrólisis de carbohidratos estructurales y de almacenamiento. Esto proporciona el suministro continuo de carbohidratos solubles que compensan su inevitable reducción durante los períodos prolongados de almacenamiento. La población de BAL generalmente experimenta una reducción logarítmica debido a la inhibición del bajo pH y los productos de fermentación. Varias especies de levaduras altamente tolerantes a los ácidos sobreviven este período en un estado casi inactivo, junto con los bacilos y clostridios, que entran en un estado de latencia formando endosporas.

Fase 4.- Fase aerobia final. Esta etapa corresponde al período de alimentación del ensilado, en la cual se da la carga y transporte del ensilado para la alimentación de los biodigestores. Durante el movimiento del ensilado, el O₂ puede acceder en cantidades suficientes para iniciar el crecimiento de microorganismos indeseables. En particular, estos incluyen las levaduras y las esporas o conidios de ciertos mohos, así como las bacterias del ácido acético, que a menudo son responsables del inicio de la inestabilidad aerobia. Estos microorganismos comienzan a multiplicarse en presencia de aire y contribuyen al calentamiento, y a los principales cambios químicos del ensilado, indicados por una reducción del ácido láctico y un aumento del pH.

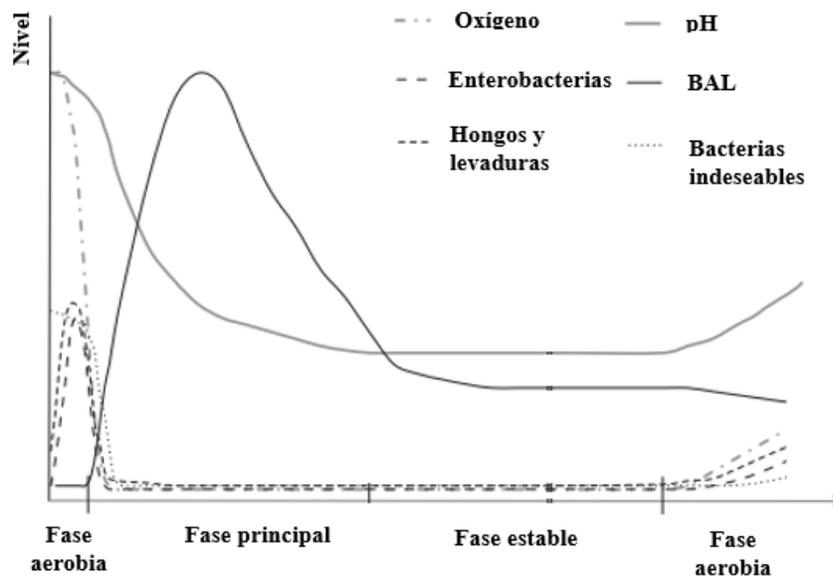


Figura 3.1 Cambios teóricos en el contenido de oxígeno, pH y poblaciones microbianas durante el ensilado

Dunière *et al.* (2013)

Si bien las fases anteriormente descritas se consideran el caso normal de ensilado, dos condiciones pueden poner en peligro el éxito del proceso:

1. La falta de carbohidratos fermentables o su utilización ineficiente que pudiera prevenir una concentración suficientemente rápida y alta de ácidos no disociados a un pH bajo en el ensilado. Esto puede conducir a una fermentación secundaria en la que los azúcares residuales, así como los ácidos láctico y acético formados inicialmente sean fermentados a ácido butírico por clostridios, aumentando el pH. Durante la fermentación secundaria los aminoácidos se fermentan en aminas y NH₃.

- Un período de llenado prolongado o un sellado retrasado del silo que generalmente resulta en una población de levadura alta. Siempre que haya suficientes sustratos como ácido láctico y carbohidratos solubles en agua, el acceso renovado al aire generalmente causará una multiplicación inmediata de la microflora no deseada, con las correspondientes pérdidas aerobias mencionadas en la fase 4.

Como se muestra en la Tabla 3.1, las rutas de fermentación por las que se producen etanol y acetato implican la pérdida de carbono como CO₂. También se da la producción de metabolitos ácidos que tienen un pKa más alto (pKa ácido acético = 4.74, pKa del ácido propiónico = 4.88) que el del ácido láctico (pKa = 3.86) y, por tanto, no logran la acidificación deseable en el ensilado (Rooke y Hatfield, 2003).

Tabla 3.1 Metabolismo de carbohidratos durante el ensilado. Adaptado de Pahlow (1991)

| Proceso | Microorganismos | Productos |
|-----------------------------|--------------------|--|
| Respiración (aerobio) | BAL | Acetato, lactato, H ₂ O ₂ , CO ₂ , otros. |
| | BAA | Acetato |
| | Mohos | CO ₂ , H ₂ O, micotoxinas |
| | Levaduras | CO ₂ , H ₂ O |
| | Bacterias aerobias | CO ₂ , H ₂ O, toxinas |
| Fermentación (anaerobio) | BAL | Acetato, lactato, etanol, CO ₂ , manitol, glicerol, otros. |
| | Levaduras | Etanol, CO ₂ |
| | Clostridios | Butirato, H ₂ , CO ₂ |
| | BAP | Propionato, CO ₂ , H ₂ O |
| | Enterobacterias | Acetato, etanol, lactato, CO ₂ , butanodiol, otros. |

BAL = bacterias del ácido láctico, BAA = bacterias del ácido acético, BAP = bacterias del ácido propiónico

3.2 Microbiología del ensilado

Existe diversa literatura en la que la microbiología del ensilado para la alimentación animal se encuentra ampliamente descrita. Si bien dichas referencias son esenciales para entender de manera general los procesos bioquímicos durante el ensilado, su uso como base teórica en el ensilado para la producción de biogás requiere de ciertas precauciones. Mientras en el ensilado para la alimentación animal el principal interés está puesto sobre la digestibilidad de las proteínas, la palatabilidad y la ingesta de materia seca (Egg *et al.*, 1993); en el ensilado para la producción de biogás, el objetivo principal es preservar la máxima cantidad posible de carbono que posteriormente pueda transformarse en metano (Teixeira Franco *et al.*, 2016).

Los microorganismos asociados al sustrato a ensilar juegan un papel fundamental en la definición de los procesos de fermentación y la calidad del producto ensilado. A menudo el ensilado tiene lugar utilizando la microflora epífita del sustrato, la cual está compuesta por una mezcla compleja de microorganismos formada principalmente por bacterias, levaduras y mohos; en la que la distribución inicial de sus poblaciones depende principalmente de la composición física del sustrato, el contenido de humedad, la madurez de las especies vegetativas y su proceso de corte (Bolsen *et al.*, 1996). Por lo general, al comienzo del ensilado los nutrientes del contenido celular solo se liberan por corte mecánico o laceración del sustrato, creando a menudo condiciones poco uniformes en la distribución microbiana en el sustrato (Daeschel *et al.*, 1987). Posteriormente, a medida que la disponibilidad de oxígeno es escasa y se reduce el pH, la diversidad de los microorganismos epífitos disminuye (McAllister *et al.*, 2018).

Las clases típicas de microorganismos y el rango de sus poblaciones en el ensilado se muestran en la Tabla 3.2. Como es de esperarse, las poblaciones dominantes son microorganismos aerobios o aerobios

facultativos. A menudo, las bacterias del ácido láctico, de las que depende principalmente el ensilado, tienen un orden de magnitud menor en población que otros grupos de microorganismos.

Tabla 3.2 Distribución típica de poblaciones microbianas iniciales en el ensilado. Pahlow *et al.* (2003)

| Grupo | Población (UFC/g_{sustrato}) |
|--------------------------------------|---|
| Bacterias aerobias totales | Mayor a 10,000,000 |
| Bacterias del ácido láctico (BAL) | 10 – 1,000,000 |
| Enterobacterias | 1000 – 1,000,000 |
| Levaduras | 1000 – 100,000 |
| Mohos | 1000 – 10,000 |
| Clostridios (endosporas) | 100 – 1,000 |
| Bacilos (endosporas) | 100 – 1,000 |
| Bacterias del ácido acético (BAA) | 100 – 1,000 |
| Bacterias del ácido propiónico (BAP) | 10 - 1000 |

UFC = unidades formadoras de colonias

3.2.1 Bacterias del ácido láctico

En función de su capacidad para producir ácido láctico como producto primario, los miembros de varios géneros se describen colectivamente por el término “bacterias del ácido láctico”. Seis géneros se asocian regularmente con el ensilado: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Las bacterias del ácido láctico (BAL) a menudo están separadas por los dos tipos básicos de fermentación que pueden ocurrir simultáneamente durante el ensilado. Un proceso homofermentativo, que produce principalmente ácido láctico, y el otro heterofermentativo, donde se forman productos adicionales como etanol o acetato, así como CO₂. En términos de producción de ácido y de pérdida de energía, la primera vía es más eficiente que la contraparte heteroláctica (Pahlow *et al.*, 2003). La fermentación heteroláctica podría potenciar la formación de metano, al producirse ácido acético (Vervaeren *et al.*, 2010), aunque podría también aumentar las pérdidas de materia orgánica por la producción de CO₂ (McDonald *et al.*, 1991).

Las bacterias del ácido láctico generalmente necesitan carbohidratos como fuentes de energía y carbono, y son organismos con requisitos extremadamente selectivos para poder adaptarse a sustratos orgánicos complejos como la FORSU. La temperatura para el crecimiento varía desde 5 a más de 50 °C, con óptimas entre 25 y 40 °C; siendo esta una propiedad relevante para hacer ensilado en climas cálidos. El pH óptimo para el crecimiento está entre 5 y 6.

3.2.2 Enterobacterias

Las especies de enterobacterias que a menudo se encuentran en el ensilado se definen como organismos Gramnegativos, en forma de bastón y a menudo móviles. Son facultativos, poseen catalasa y reducen el NO₃. Algunos de ellos fermentan la glucosa en una mezcla de ácidos, incluido el ácido acético y el ácido fórmico con alcohol; otros producen butanodiol. Pueden descarboxilar y desaminar aminoácidos y pueden utilizar componentes nitrogenados de compuestos orgánicos como sustancias respiratorias que producen energía (Pahlow *et al.*, 2003).

Las enterobacterias epífitas pueden alcanzar niveles superiores de población que las BAL; sin embargo, los valores mínimos para enterobacterias son a menudo 100 veces más altos que los de las BAL. Las enterobacterias suelen ser los primeros organismos bacterianos que se encuentran en sustratos secos, teniendo además la capacidad de crecer a bajas temperaturas, aunque la temperatura óptima para su

crecimiento es más alta que la de la mayoría de las BAL en el ensilado (Pahlow *et al.*, 2003). En general, esto indica la naturaleza menos exigente de las enterobacterias en comparación con otros grupos epífitos relevantes en el sustrato fresco. No obstante, el número de enterobacterias disminuirá sustancialmente al iniciar el ensilado, debido a su escasa capacidad de multiplicarse a valores de pH por debajo de 4.5 (Muck, 2010).

La presencia de enterobacterias en el ensilado es indeseable, puesto que, debido a su naturaleza anaerobia facultativa, pueden competir con las BAL por los nutrientes antes y después del ensilado. También son responsables de gran parte del NH_3 formado a partir de la degradación de proteínas y de la reducción de NO_3 , aumentando así la capacidad de amortiguación de del sustrato ensilado y contrarrestando la disminución rápida del pH (Spoelstra, 1987). El número de enterobacterias y su tasa de disminución en el ensilado pueden servir como buenos indicadores de la calidad del ensilado. La disminución de enterobacterias en el ensilado refleja la presencia combinada de buenas condiciones del proceso: disponibilidad de nutrientes y agua, conversión eficiente de esos nutrientes a productos de fermentación y un pH bajo por la producción de ácido láctico (Muck, 2010).

3.2.3 Levaduras

Las levaduras son microorganismos eucariotas, heterótrofos, que crecen principalmente como células individuales, pero muchas también pueden producir pseudo o verdadero micelio (Pahlow *et al.*, 2003). Las levaduras juegan un papel importante en el deterioro aerobio del ensilado. En condiciones anaerobias, muchas especies pueden fermentar activamente azúcares como glucosa, maltosa y sacarosa. Los principales productos de fermentación de las levaduras son etanol y CO_2 , pero pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles (AGV) y de lactato también puede formarse anaerobiamente por levaduras (McDonald *et al.*, 1991). Los ambientes ácidos anaerobios, como los ensilados, son en principio hostiles para las células de levadura. Se sabe que los ácidos grasos de cadena corta como los ácidos propiónico y acético inhiben las levaduras a un pH bajo. Los ácidos grasos de cadena corta no disociados más prevalentes a pH bajo son claramente más inhibitorios para las levaduras que los ácidos disociados (Eklund, 1983). Esto se debe al hecho de que estas moléculas no disociadas pueden difundirse en la célula y reducir el pH intracelular al liberar iones H^+ .

Las levaduras también son importantes porque algunas especies pueden crecer en condiciones anaerobias, fermentando azúcares en etanol. Cuando los ensilados mantienen niveles sustanciales de azúcares después de que las bacterias del ácido láctico son inhibidas por un pH bajo, las levaduras pueden desarrollarse y son la presunta causa de la mayoría de los ensilados con alto contenido de etanol ($> 20 \text{ g/kg}_{\text{ST}}$) (Pahlow *et al.*, 2003). El rango de temperatura para el crecimiento óptimo de las levaduras se encuentra entre 25 y 30 °C (Walker y Walker, 2018).

3.2.4 Clostridios

El género *Clostridium* comprende bacterias grampositivas, formadoras de endosporas. Los clostridios generalmente derivan su energía de la fermentación de compuestos orgánicos como los carbohidratos y las proteínas. Aunque su tolerancia al oxígeno varía ampliamente, los clostridios son anaerobios y sus efectos sobre la calidad del ensilado generalmente ocurren mucho después de que las bacterias del ácido láctico han dejado de crecer activamente en el ensilado (Pahlow *et al.*, 2003).

Tal como se muestra en la Tabla 3.3, las especies de clostridios más importantes en el ensilado se dividen en tres grupos por los principales compuestos que fermentan: clostridios proteolíticos que fermentan principalmente aminoácidos, el grupo *Clostridium butyricum* que fermenta carbohidratos y *C. tyrobutyricum* que fermenta algunos azúcares, pero, lo que es más importante, fermenta ácido láctico. Los clostridios proteolíticos producen varios compuestos en la catabolización de aminoácidos; los más

importantes son: el amoníaco, las aminas y el dióxido de carbono (Muck, 2010). Los productos primarios del grupo *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum* son ácido butírico, ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, por lo que la actividad metabólica de organismos clostridiales conduce a grandes pérdidas de materia orgánica y pobre recuperación de energía (Pahlow *et al.*, 2003). Las posibilidades de una fermentación clostridial se pueden minimizar mediante el ensilado con concentración de sólidos totales por encima de 30 % e induciendo una producción rápida de ácido láctico porque los clostridios son intolerantes tanto a la presión osmótica alta como al pH bajo (Kung *et al.*, 2018). *Clostridium tyrobutyricum* es la especie clostridial más estudiada en los ensilados, debido a su capacidad de fermentar lactato, lo cual contrarresta las fermentaciones de ácido láctico. La fermentación del ácido butírico realizada por *C. tyrobutyricum* puede describirse como:



Tabla 3.3 Principales características de clostridios predominantes en ensilados. Adaptado de Pahlow *et al.* (2003)

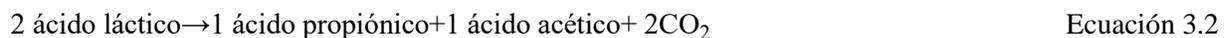
| Características | Grupo proteolítico ¹ | <i>C. butyricum</i> | <i>C. tyrobutyricum</i> |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Sustrato que utiliza: | | | |
| Carbohidratos | Sí | Sí | Sí |
| Proteínas | Sí | No | No |
| Monosacáridos | Variable | Mucho | Poco |
| Lactato | Poco | No | Sí |
| pH²: | Mayor a 5 | Entre 4.5 y 5.0 | Entre 4.2 y 4.5 |
| Productos: | | | |
| Ácido butírico | Sí | Sí | Sí |
| Ácido acético | Sí | Sí | Sí ³ |
| Etanol | Sí | No | No |
| AGV de cadena ramificada ⁴ | Sí | No | No |
| NH ₃ | Sí | No | No |
| Aminas | Sí | No | No |

¹ clostridios que combinan propiedades proteolíticas y sacarolíticas. Pueden fermentar un número limitado de azúcares. ² pH mínimo que permite el crecimiento. Bajo nivel de actividad de agua y elevados niveles de ácidos incrementa el pH mínimo que permite el crecimiento. ³ requiere del ácido acético. ⁴ Isobutírico e isovalérico.

El efecto negativo de una fermentación por *Clostridium tyrobutyricum* es, en primer lugar, por la producción de ácido butírico, el cual, al ser un ácido más débil que el ácido láctico, conduce a un aumento del pH. Así mismo, la producción de H₂ y CO₂ resulta en pérdidas de energía y materia orgánica.

3.2.5 Bacterias del ácido propiónico

Dentro de este género, las propionibacterias clásicas o lácteas son las que se han aislado tradicionalmente de los productos lácteos y se han encontrado en los ensilados y fermentaciones vegetales (Woolford, 1975). Como su nombre lo indica, el ácido propiónico es el principal producto final de la fermentación, pero también pueden producir grandes cantidades de acetato y, en menor medida, CO₂ y ácidos orgánicos como el ácido fórmico o el ácido isovalérico (Cummins y Johnson, 1992). La ecuación de la fermentación es la siguiente:



El hecho de que se puedan encontrar pequeñas cantidades de ácido propiónico en muchos ensilados no necesariamente indica que estén presentes las propionibacterias, puesto que las bacterias como *Clostridium propionicum* y *Selenomonas ruminantium* también producen ácido propiónico como el principal producto final de la fermentación, y muchas otras pueden excretar pequeñas cantidades de propionato (Merry y Davies, 1999).

Dado que el ácido propiónico no disociado es un potente inhibidor de levaduras y mohos, puede mejorar efectivamente la estabilidad aerobia del ensilado (Rooke y Hatfield, 2003). Por lo tanto, ha habido algún interés en usar propionibacterias como inoculantes en los ensilados. El hecho de que las bacterias del ácido propiónico metabolicen una cierta cantidad de ácido láctico en lugar de azúcares para la formación de propionato no parece representar un problema en la mayoría de los ensilados.

3.2.6 Bacterias del ácido acético

El ácido acético es el ácido que típicamente se encuentra en la segunda mayor concentración en los ensilados, oscilando entre el 1 y el 3 % de la materia seca, siendo su concentración inversamente proporcional al contenido de materia seca (Kung *et al.*, 2018). La producción de ácido acético implica una pérdida adicional de CO₂, lo que reduce la recuperación de materia orgánica en aproximadamente 1 % en promedio (Muck, 2010). Si bien los ácidos grasos volátiles son buenos inhibidores de levaduras y mohos (Moon, 1983), el ácido acético no es un inhibidor tan bueno como los ácidos grasos de cadena más larga, pero es más efectivo que el ácido láctico.

El efecto del ácido acético sobre el crecimiento de hongos está relacionado con la concentración no disociada en solución. Por lo tanto, una concentración dada de ácido acético se vuelve más inhibitoria para las levaduras y los mohos a medida que disminuye el pH del ensilado. Desafortunadamente, la fermentación bacteriana del ácido láctico rara vez baja el pH lo suficiente y produce suficiente ácido acético para evitar que las levaduras y los mohos puedan crecer.

3.3 Condiciones para el ensilado

El proceso de ensilado como proceso biológico es bastante dinámico, con varias etapas sucesivas que se desarrollan en entornos y con microorganismos competitivos (Teixeira Franco *et al.*, 2016). Diversos factores pueden afectar las rutas de fermentación que tienen lugar durante el ensilado, y que pueden ser optimizados a fin de obtener un ensilado de calidad que pueda proporcionar el máximo rendimiento energético de los sustratos.

3.3.1 Características del sustrato

Entre los parámetros críticos del ensilado, las características bioquímicas del sustrato deben considerarse como la prioridad para un ensilado exitoso, pues es lo que primordialmente orienta el curso de la fermentación y también tiene un impacto importante a la hora de definir las demás condiciones de ensilado. En general, las características ideales de un sustrato para lograr un ensilado efectivo son: contenidos de humedad relativamente bajos, alto contenido de carbohidratos accesibles (solubles en agua) y baja capacidad de amortiguación (Teixeira Franco *et al.*, 2016). Además, la microflora epífita del sustrato desempeña un papel crucial en el curso del ensilado, de tal modo que, si las BAL están presentes en una cantidad suficiente y en un rango adecuado de contenido de humedad, fermentarán los carbohidratos solubles, acidificando el medio y estabilizando el ensilado si el sustrato posee una baja capacidad de amortiguamiento (Rooke y Hatfield, 2003).

3.3.2 *Tamaño de la partícula*

Con respecto al efecto de este parámetro sobre el ensilado, se reporta que la reducción del tamaño de partícula puede conducir a una fermentación láctica más rápida y por lo tanto a una rápida estabilización del ensilado y a menores pérdidas de materia orgánica (Teixeira Franco *et al.*, 2016).

El objetivo principal de la reducción del tamaño de la partícula es aumentar la superficie accesible para las enzimas hidrolíticas (Kalač, 2012). Herrmann *et al.* (2011) demostraron que, en general, reducir el tamaño de la partícula mejora las condiciones de fermentación mediante la liberación adicional de sustratos fácilmente fermentables, lo que conduce a una fermentación láctica más intensa y reduce las pérdidas de materia orgánica. Además, se ha reportado que en el ensilado con partículas de pequeño tamaño se reduce el riesgo de deterioro aerobio al permitir mayores densidades y limitar la cantidad de oxígeno atrapado en el ensilado (Rooke y Hatfield, 2003). Herrmann *et al.* (2011) también evaluaron el rendimiento de metano a partir de sustratos ensilados con diferentes tamaños de partículas, reportando que, para una alta formación de metano es recomendable cortar los cultivos a tamaños de partículas de 7 - 8 mm. No obstante, solo en un tercio de los casos, la mayor producción de metano compensó el costo adicional de la reducción del tamaño.

3.3.3 *Densidad*

La densidad se asocia con la porosidad y el flujo de oxígeno en el ensilado (Weinberg y Ashbell, 2002), de manera tal que, a mayor densidad la porosidad disminuye y por tanto el flujo de oxígeno en el ensilado es más lento, reduciendo así las pérdidas debidas al deterioro aerobio (Muck *et al.*, 1988). Si bien el oxígeno inicialmente atrapado en el silo puede agotarse en cuestión de horas, existe el riesgo de un deterioro aerobio en las fases posteriores del ensilado, si no se mantienen las condiciones anaerobias que las BAL necesitan para proliferar y dominar la comunidad microbiana (Pitt, 1986). Para limitar el ingreso de oxígeno al ensilado, la densidad es un parámetro considerado crucial.

3.3.4 *Humedad*

Un efecto comúnmente reportado de la humedad en el ensilado es que una mayor concentración de sólidos totales (ST) retrasa el crecimiento bacteriano, conduciendo a una fermentación más restringida y, por lo tanto, afectando negativamente la conservación del sustrato. (Kung, 2018). Sin embargo, los microorganismos involucrados poseen diferentes niveles de tolerancia a la humedad. Mientras los clostridios son particularmente sensibles a la disponibilidad de agua (actividad de agua a_w) y requieren condiciones húmedas para su desarrollo activo (Teixeira Franco *et al.*, 2016), las BAL son capaces de fermentar la biomasa en un amplio rango de concentración de sólidos totales (Rooke y Hatfield, 2003). Según Teixeira Franco *et al.* (2016), la concentración de sólidos guarda una estrecha relación con la acidez del ensilado, de modo que a menor concentración de sólidos el valor del pH requerido para la estabilidad anaerobia del ensilado es menor (Tabla 3.4).

La actividad del agua (a_w) es un parámetro relacionado con el contenido de agua de un sustrato (Tabla 3.4), y es indicativo del agua disponible para el crecimiento de microorganismos y la actividad enzimática durante su conservación (Lanigan, 1963). Los microorganismos necesitan cierta cantidad de agua disponible para vivir, y las reacciones se dan en medio acuoso. La actividad del agua toma valores entre 0 y 1, y cuanto más se aleja de 1 (valor para el agua pura), más difícil es la actividad biológica.

La concentración de sólidos junto con la densidad también se asocia a la formación de lixiviados durante el ensilado, lo cual además de producir pérdidas de nutrientes y energía, también puede ocasionar serios problemas de contaminación y manejo del efluente. En el ensilado para la producción de biogás, las

pérdidas por lixiviación pueden evitarse utilizando el propio efluente como cosustrato en la digestión anaerobia (Egg, 1993). En otros casos, cuando la concentración de sólidos del sustrato es baja se utilizan técnicas de reducción de la humedad como la desecación química y el tratamiento térmico (Rooke y Hatfield, 2003). Según Teixeira Franco *et al.* (2016), el ensilado en un rango de 25 – 30 %_{ST} conduce a una fermentación menos extensa, evita la producción de efluentes y disminuye la pérdida de materia orgánica.

Tabla 3.4 Valor de pH estables y actividad de agua (a_w) en ensilados según la concentración de sólidos. Adaptado de Weissbach (1996)

| % _{ST} (kg _{ST} /kg _{Sustrato}) | Actividad de agua a_w (-) | pH (-) |
|---|-----------------------------|--------|
| 15 | 0.985 | 4.10 |
| 20 | 0.980 | 4.20 |
| 25 | 0.975 | 4.35 |
| 30 | 0.971 | 4.45 |
| 35 | 0.966 | 4.60 |
| 40 | 0.961 | 4.75 |

3.3.5 Temperatura

En términos generales, el ensilado se prefiere una temperatura moderada de 20 a 30 °C. A temperaturas mayores a 37 °C se han reportado efectos perjudiciales de la temperatura sobre la estabilidad aerobia de los ensilados y también se afecta la calidad del ensilado debido a una fermentación más extendida (Weinberg *et al.*, 2001; Kim y Adesogan, 2006) y una mayor fermentación clostridial (McDonald *et al.* 1991). El aumento de la temperatura de ensilado tiene como consecuencia un mayor dominio de clostridios y enterobacterias, ya que tienen una temperatura óptima de crecimiento más alta que las BAL (Rooke y Hatfield, 2003).

Por debajo de 20 °C, la fermentación láctica puede no ser tan eficiente si no se dispone de suficiente sustrato fácilmente fermentable, por lo que, es necesario mantener un cierto nivel de temperatura para superar la barrera inicial de hidrólisis y que las BAL puedan disponer de material orgánico soluble (Teixeira Franco *et al.*, 2016).

3.3.6 Uso de aditivos

Los aditivos en el ensilado pueden ser utilizados con diversos propósitos, a partir de los cuales pueden clasificarse como: aditivos estimulantes de la fermentación, aditivos inhibidores de la fermentación, aditivos inhibidores del deterioro aerobio, nutrientes y absorbentes (McDonald, 1991).

Los estimulantes de la fermentación son los aditivos más utilizados ya que sus beneficios para la preservación son en general reconocidos, por lo que la mayoría de los estudios sobre el uso de aditivos en ensilados para la producción de biogás apuntan a este tipo (Teixeira Franco *et al.*, 2016). Entre los estimulantes más conocidos hay varios tipos de enzimas, fuentes de carbohidratos o inoculantes de BAL (Kalač, 2012).

Otros aditivos de mucho uso son los inhibidores de la fermentación, cuyo propósito es minimizar las pérdidas de materia seca y energía mediante la inhibición de la actividad biológica de los microorganismos degradantes a través de la disminución del pH. Al fomentar una rápida fermentación láctica, el ensilado entra en una fase estable más rápidamente (Herrmann *et al.*, 2011).

3.4 Parámetros de efectividad del ensilado

3.4.1 pH

El comportamiento del pH durante el ensilado se ve afectado por la capacidad amortiguadora del sustrato, de modo que, en sustratos con alta capacidad amortiguadora requerirá más ácido para reducir su pH (Kung, 2018). Un ensilado que alcanza un pH suficientemente bajo para evitar fermentaciones secundarias con producción de ácido butírico y otros ácidos grasos volátiles se define como un ensilado estable (Pahlow *et al.*, 2003). Tal como se muestra en la Tabla 3.4, los valores de pH necesarios para un ensilado estable están en función de la actividad del agua (a_w) a una determinada concentración de sólidos totales.

En términos de la efectividad del ensilado, una rápida disminución del pH es deseable, ya que a valores de pH bajos y si se mantienen las condiciones anaerobias, el crecimiento de todos los microorganismos incluidas las bacterias del ácido láctico se ven inhibidas y el ensilado tarda menos en alcanzar la fase estable (McAllister y Hristov, 2000). Esto limita las pérdidas de materia orgánica y energía, y permite conservar el potencial de metano del sustrato ensilado.

3.4.2 Pérdidas de materia orgánica

La reducción de las pérdidas de materia orgánica durante el ensilado de un sustrato es esencial para el uso económico y sostenible del biogás (Herrmann *et al.*, 2011). La pérdida de materia orgánica puede producirse por los procesos bioquímicos de la fermentación o por lixiviación durante el ensilado (Buffière *et al.*, 2018). Por lo tanto, en un sistema cerrado donde el lixiviado no es extraído, las pérdidas de materia orgánica se asocian exclusivamente a los procesos fermentativos (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Pérdidas de materia orgánica y energía según rutas de fermentación. Adaptado por Borreani *et al.* (2018)

| Organismos | Tipo de fermentación | Sustrato | Productos | Pérdida (%sustrato) | |
|-----------------|----------------------|------------|--|---------------------|---------|
| | | | | SV | Energía |
| BAL | Homoláctica | Glucosa | 2 lactato | 0 | 0.7 |
| BAL | Heteroláctica | Glucosa | 1 lactato, 1 etanol, 1 CO ₂ | 24 | 1.7 |
| BAL | Heteroláctica | 3 fructosa | 1 lactato, 1 acetato, 2 manitol, 1 CO ₂ | 4.8 | 1 |
| Enterobacterias | | 2 glucosa | 2 lactato, 1 acetato, 1 etanol, 2 CO ₂ | 17 | 11.1 |
| Clostridios | | 2 lactato | 1 butirato, 2 CO ₂ , 2H ₂ | 51.1 | 18.4 |
| Levaduras | | Glucosa | 2 etanol, 2CO ₂ | 48.9 | 0.2 |

*BAL: Bacterias del ácido láctico

El dominio rápido de las BAL en la fermentación es necesario para lograr bajas pérdidas de materia orgánica, pues el desarrollo lento de las BAL causa una velocidad de fermentación lenta y produce una caída lenta del pH que permite la actividad de microorganismos no deseados (Scudamore y Livesey, 1998). En cuanto a la ruta de formación de ácido láctico, si bien la fermentación heteroláctica tiene ventajas en cuanto a la producción de metabolitos intermedios para la posterior metanogénesis (Herrmann, 2011; Vervaeren *et al.*, 2010), esta vía se asocia con mayores pérdidas de materia seca que la homoláctica (McDonald *et al.*, 1991). Según Kung (2010), en un ensilado efectivo las pérdidas totales de materia seca deben situarse por debajo del 12 %. Sin embargo, según Borreani *et al.* (2018), en sistemas de ensilado para la producción de biogás, las pérdidas de materia orgánica pueden limitarse por

debajo del 20 % y el potencial de metano se puede conservar casi por completo o incluso aumentar en algunos casos.

3.4.3 Producción de biogás

La producción de biogás durante el ensilado es un parámetro de suma importancia dado que este representa la pérdida de material orgánico soluble y de energía del sustrato (McAllister y Hristov, 2000). La formación del biogás dependerá de los procesos bioquímicos producidos durante el ensilado, pues además de los metabolitos principales pueden dar lugar a la formación de subproductos como el dióxido de carbono e hidrógeno (Luo *et al.*, 2011) que son liberados del medio en forma de biogás.

Tal como se muestra en la Tabla 3.5, cuando las fermentaciones heterolácticas tienen lugar o cuando microorganismos diferentes a las BAL están activos en el ensilado, la pérdida en forma de CO₂ es grande. Adicional a las pérdidas de materia orgánica por la producción de CO₂, cuando en el ensilado hay actividad clostridial, la producción de hidrógeno tiene lugar, siendo esta la principal razón de pérdida de energía (Borreani *et al.*, 2018).

4. DIGESTIÓN ANAEROBIA DE FORSU

La digestión anaerobia (DA) es un proceso microbiológico que consiste en la degradación, en ausencia de oxígeno, de un material orgánico complejo (Khalid *et al.*, 2011). Siendo uno de sus productos finales el metano, la DA ofrece muchas ventajas en lo que respecta al aprovechamiento energético de los residuos orgánicos (André *et al.*, 2017), permitiendo además la destrucción de patógenos (condiciones termofílicas) y la producción de digestato (Asia y Oladoja, 2006). El digestato es un subproducto formado de materia orgánica bastante estable y con alto potencial de su uso como mejorador de suelos o biofertilizante (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

En cuanto a la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales (FORSU), la digestión anaerobia se observa como una solución factible para su aprovechamiento energético (Dhar *et al.*, 2015), tanto así que se considera uno de los desarrollos tecnológicos más exitosos e innovadores observados durante las dos últimas décadas en el ámbito de la gestión de residuos (De Baere y Mattheeuws, 2015). Entre las principales ventajas que han impulsado la expansión la DA de la FORSU, se cuentan: su bajo consumo de energía, baja producción de lodos, menores requerimientos de espacio, reducción en el volumen de residuos y la producción de bio fertilizantes y acondicionadores de suelos (Adekunle y Okolie, 2015).

Según De Baere y Mattheeuws (2015), solo en Europa se han construido 244 instalaciones que tratan la FORSU, lo que representa una capacidad acumulada de 7,750,000 toneladas por año de materia orgánica, lo que a su vez constituye el 25 % de los residuos sólidos municipales dispuestos en el continente.

4.1 Bioquímica de la digestión anaerobia

Durante la digestión anaerobia las transformaciones bioquímicas que se llevan a cabo pueden separarse en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Los microorganismos que llevan a cabo las reacciones de degradación en cada una de estas etapas difieren ampliamente con respecto a su fisiología, necesidades nutricionales, cinética de crecimiento y sensibilidad a las condiciones ambientales (Adekunle y Okolie, 2015).

a) Hidrólisis

Esta etapa se produce cuando los polímeros orgánicos complejos son reducidos a simples moléculas solubles por enzimas extracelulares. Las proteínas, lípidos y carbohidratos se hidrolizan en aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga y azúcares, respectivamente (Li *et al.*, 2011). Una vez reducidos, estos compuestos orgánicos más simples se convierten en la fuente de energía o de carbono para los diferentes grupos de microorganismos que llevan a cabo la etapa siguiente. Por tal razón, la hidrólisis es considerada la etapa limitante en la digestión anaerobia de sustratos complejos (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

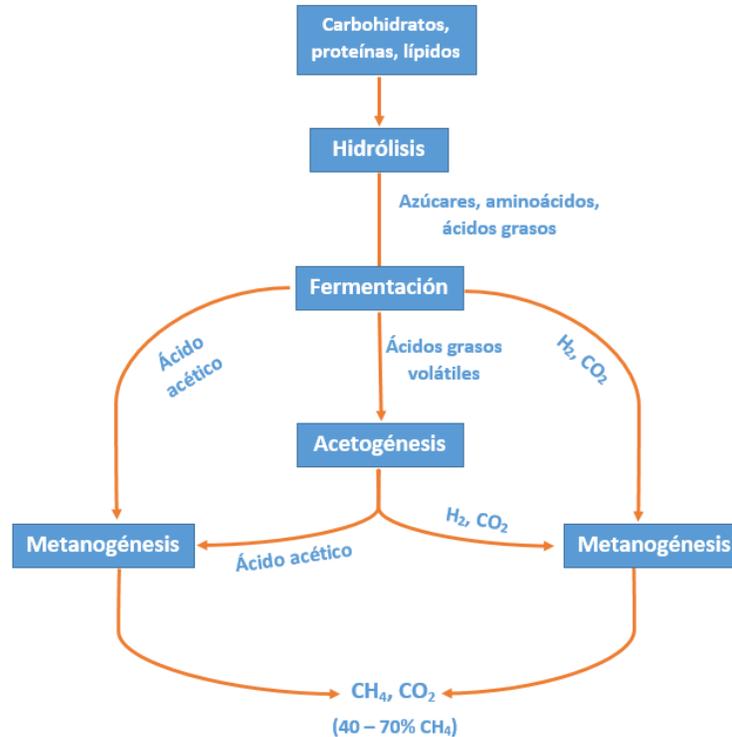


Figura 4.1 Proceso de degradación de material orgánico a través de la digestión anaerobia. Adaptado de Li *et al.* (2011).

b) Acidogénesis

Los monómeros producidos en la fase hidrolítica son consumidos por dos grupos de bacterias: anaerobias y facultativas. Estos grupos de microorganismos degradan los monosacáridos y aminoácidos en una mezcla de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido valérico, ácido butírico, ácido propiónico y ácido acético), hidrógeno y dióxido de carbono (Adekunle y Okolie, 2015; Batstone *et al.*, 2002).

c) Acetogénesis

En esta etapa los ácidos orgánicos producidos en la acidogénesis son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por grupos acetogénicos que utilizan como sustrato los ácidos grasos de cadena más larga (Batstone *et al.*, 2002) y otros compuestos que no pueden ser usados directamente por las arqueas metanogénicas.

d) Metanogénesis

Esta es la etapa final, donde una variedad de arqueas metanogénicas consumen acetato, dióxido de carbono e hidrógeno para producir metano (Li *et al.*, 2011). El hidrógeno producido en la acetogénesis es consumido por grupos de organismos metanogénicos hidrogenofílicos, y el acetato por grupos metanogénicos acetoclásticos (Batstone *et al.*, 2002). A menudo la metanogénesis es el foco de muchos estudios de DA debido tanto a su sensibilidad a la inhibición por ácidos intermedios, así como también a que en esta etapa se dan las reacciones bioquímicas más lentas en todo el proceso (Li *et al.*, 2011; Al Sadi *et al.*, 2008).

4.2 Termodinámica de la digestión anaerobia

Las relaciones que existen entre los grupos de microorganismos en la digestión anaerobia son complejas y cada interacción es esencial para el bienestar de todo el proceso (Hinds, 2015). Las relaciones sintróficas entre microorganismos, en la cual un organismo depende de la actividad de otro, forman parte de la complejidad de la actividad microbiana. Un ejemplo de una relación sintrófica en la cadena alimentaria anaerobia es la asociación entre las bacterias productoras de hidrógeno y las arqueas metanogénicas que consumen hidrógeno (Gerardi, 2003).

Durante la acetogénesis, la producción de hidrógeno incrementa la presión parcial de este gas, por lo que es requerido que las arqueas hidrogenotróficas, realicen la conversión del gas hidrógeno a metano y evitar así que la presión parcial de hidrógeno alcance niveles que resulten inhibitorios para el metabolismo de las bacterias acetogénicas.

En la tabla 4.1 se muestra que las reacciones acetogénicas son termodinámicamente desfavorables, es decir, que no se llevarán a cabo bajo condiciones estándares, ya que el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG°) durante la reacción es positivo y, por tanto, se requiere energía adicional para que las reacciones se produzcan (Henze *et al.*, 2008).

Tabla 4.1 Estequiometría y cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG°) para algunas reacciones acetogénicas en condiciones estándares. Henze *et al.* (2008)

| Compuesto | Reacción | ΔG° (KJ/mol) |
|---------------------------|--|---------------------------|
| Lactato | $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | -4.2 |
| Etanol | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | +9.6 |
| Butirato | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | +48.1 |
| Propionato | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$ | +76.1 |
| Metanol | $4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{CO}_2 \longrightarrow 3\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$ | -2.9 |
| Hidrógeno-CO ₂ | $2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ | -70.3 |

La relación sintrófica entre las bacterias productoras de hidrógeno y las arqueas que consumen hidrógeno garantiza la producción de ácidos volátiles como una fuente importante de energía y carbono para la metanogénesis (Al Seadi *et al.*, 2008; Hinds, 2015). Con frecuencia, este equilibrio es tan delicado que resulta difícil alcanzarlo, lo que conduce un bajo rendimiento en la producción de metano debido a la inestabilidad del proceso (Demirel y Yenigün, 2002).

4.3 Tipos de reactores anaerobios

4.3.1 Según el modo de alimentación

Con base en el modo de alimentación, los reactores para la digestión anaerobia pueden ser clasificados como continuos y discontinuos.

Alimentación continua: el sustrato se agrega y se extrae del digestor sin intermitencia. Dado que el sustrato fresco se agrega continuamente, todas las reacciones involucradas en la generación de biogás ocurren a una velocidad cuasi constante (Chaudhary, 2008).

Alimentación discontinua (*batch* o en lote): los reactores son llenados con el sustrato, con o sin mezcla de inóculo, y luego es sometido al proceso de degradación durante un periodo determinado. Este proceso se realiza sin añadir sustrato adicional hasta que el proceso de degradación se haya completado.

4.3.2 Según el contenido de humedad en la alimentación

Con base en el contenido de humedad, los procesos utilizados para la digestión anaerobia de residuos sólidos pueden distinguirse principalmente dos tipos: seca o de alto contenido de sólidos (mayor a 15%) y húmeda o de bajo contenido de sólidos (menor a 15%) (Di Maria *et al.*, 2017). Si bien ambos procesos presentan numerosas ventajas (Tabla 4.1) y han sido aplicados ampliamente, el proceso de digestión anaerobia seca (DAS) es más popular hoy en día entre los investigadores y en procesos a escala industrial (Kothari *et al.*, 2014). Según proyecciones hechas por De Baere y Mattheeuws (2012) para el año 2015, en Europa la digestión seca representaría aproximadamente el 70 % de la capacidad instalada.

4.3.2.1 Digestión anaerobia húmeda

La digestión anaerobia húmeda ha resultado atractiva debido a su simplicidad y a su similitud con la tecnología usada durante décadas para el tratamiento de lodos producidos en plantas de tratamiento de aguas residuales. El reactor más utilizado en este proceso es el reactor de tanque continuamente agitado (CSTR por sus siglas en inglés) (Verma, 2002). En el reactor CSTR el sustrato se introduce a una velocidad proporcional a la velocidad del efluente eliminado. El sustrato es agitado continuamente y se mezcla completamente cuando se instala una agitación mecánica o hidráulica (reciclaje de líquidos) o una mezcla neumática (inyección de biogás) (Li, 2015).

Antes de alimentar los sustratos en el digestor anaerobio húmedo, el material de alimentación se condiciona al contenido de sólidos apropiado agregando agua de proceso según sea necesario. La adición de agua en exceso es visto a menudo como la principal desventaja del proceso de digestión húmeda (Luning *et al.*, 2003).

Tabla 4.2 Ventajas y desventajas de los sistemas de digestión seca y húmeda. Adaptado de Campuzano (2015).

| Tecnología | Ventajas | Desventajas |
|-------------------------|--|---|
| Digestión húmeda | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fácil mezcla ▪ Equipo de bombeo sencillo ▪ Alta tasa de difusión ▪ Dilución de compuestos inhibitorios ▪ Codigestión con o agua residual o lodos para ajustar el contenido de ST | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mayor consumo energético ▪ Mayor producción de digestato líquido ▪ En los equipos de bombeo puede haber problemas de operación y abrasión por la presencia de arena, piedras, huesos o plásticos ▪ Mayor sensibilidad para desestabilizarse por altas cargas y a inhibirse por rápida difusión |
| Digestión seca | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mínima producción de efluente líquido ▪ Reactores de menor tamaño ▪ Tratamiento con cargas orgánicas más altas ▪ Menor consumo de agua y energía | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja tasa de difusión de acuerdo con el grado de mezcla ▪ Requiere equipo especial para el manejo de los residuos (bombas para trabajo pesado) ▪ Mayores tiempos de reacción ▪ Menor estabilidad en condiciones termofílicas ▪ Puede no lograrse un mezclado adecuado |

4.3.2.2 Digestión anaerobia seca

Los reactores utilizados en procesos de digestión anaerobia seca generalmente usan agitadores mecánicos, a fin de lograr una mezcla completa en los reactores. Esto ayuda a que los sustratos alimentados tengan suficiente contacto con la población microbiana, por lo que el tratamiento previo o la mezcla antes de la alimentación son necesarios para garantizar que el inóculo activo esté presente en todo el reactor (Li, 2015).

Como uno de los principales inconvenientes de la digestión anaerobia seca se menciona que, a un contenido de sólidos mayor al 30 %, la transferencia de masa está fuertemente limitada y como consecuencia puede producirse la acidificación del reactor. Así mismo, presentan menor rendimiento de biogás debido a problemas de obstrucción que no permiten un correcto percolado (Mata-Álvarez, 2003), y por variación temporal y espacial de la comunidad microbiana (Zupančič y Grilc, 2012). Los digestores discontinuos secuenciales y en fases intentan superar estas desventajas (Rapport *et al.*, 2008). Algunos de los procesos a nivel comercial que emplean sistemas en lote son: BioFerm, BEKON, HELECTOR, KompoFerm y RosRoca - digestión seca. En algunos casos se emplean sistemas en dos etapas: en la primera utilizan un sistema en lote y en la segunda un sistema en continuo (Biopercolat y GICON) (Campuzano, 2015).

Tabla 4.3 Tecnologías de digestión anaerobia seca. Waltenberger y Kirchmayr (2013), Wellinger (2013), Abbasi-Güendouz *et al.* (2012).

| Tipos de reactores | Características generales | Clasificación | Algunas tecnologías comerciales |
|---|--|---|---|
| Continuos | <ul style="list-style-type: none"> Concentración de sólidos entre 20 y 40 %. Debido a la alta viscosidad de la mezcla el flujo es tipo pistón. | <ul style="list-style-type: none"> Digestor de percolación | <ul style="list-style-type: none"> DRANCO VALORGA |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Digestor flujo pistón | <ul style="list-style-type: none"> Kompogas Linde KCA |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Silo digestor con recirculación externa | <ul style="list-style-type: none"> ATF Dranco |
| Discontinuos (tipo garaje o en lote) | <ul style="list-style-type: none"> Requiere recirculación para mantener la humedad y la temperatura Flexibilidad para expansión de la planta Se operan en lotes para mantener constante la producción de biogás | <ul style="list-style-type: none"> Digestor de percolación | <ul style="list-style-type: none"> Bekon Bioferm /Eggersmann Loock 3A-Process |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Digestor de retención | <ul style="list-style-type: none"> Ratzka |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Digestor pile up | <ul style="list-style-type: none"> BAG Budissa Ratzka |

4.3.3 Según configuración de la planta

4.3.3.1 Procesos en una etapa

En este tipo de plantas hay un solo digestor en el que se carga el sustrato periódicamente y en el cual se llevan a cabo todas las reacciones de la digestión anaerobia (De Baere, 2000; Jain *et al.*, 2015). Los digestores de una etapa son sencillos de diseñar, construir y operar, y generalmente son menos costosos. Forster (2005) afirma que, si los procesos en una etapa son operados en condiciones ideales, se puede obtener un rendimiento biológico tan eficiente como el de los sistemas de dos etapas. Una de las desventajas de este proceso es que la carga orgánica está limitada por la capacidad de los organismos metanogénicos para tolerar la repentina disminución del pH que resulta de la rápida producción de ácidos

durante la acidogénesis (Rapport *et al.*, 2008). Desde la década de los 90 en Europa se ha incrementado el número de plantas para el tratamiento de residuos sólidos municipales que operan en una fase. En el año 2012, el 93 % de las plantas de digestión anaerobia instaladas operaban con una sola fase (De Baere *et al.*, 2012).

4.3.3.2 Proceso en dos etapas

En los procesos de dos etapas se busca, a través de la separación física de los reactores, establecer condiciones óptimas para la etapa de fermentación (hidrólisis-acidogénesis-acetogénesis) y para la metanogénesis, optimizando así las actividades metabólicas específicas y, en última instancia, maximizando la generación de metano (Schievano *et al.*, 2014). Esta configuración de los reactores también implica la separación de la ecología natural y el metabolismo del consorcio de microorganismos responsables del proceso de digestión anaerobia. De allí que para la primera etapa la tasa limitante es la hidrólisis y para la segunda la velocidad del crecimiento celular (De Baere, 2000; Luongo Malave' *et al.*, 2014).

Un proceso de dos etapas o multi etapas es una estrategia para aumentar el rendimiento global del proceso en términos de estabilidad, eficiencia de degradación tanto en la fase de fermentación como de metanogénesis y, por tanto, en términos de recuperación total de energía. Esto se logra a través de la aplicación de condiciones diferentes a los reactores en cada etapa (Rapport *et al.*, 2008).

Según Campuzano (2015) a nivel comercial solamente el 7 % de las plantas de digestión anaerobia de FORSU realizan un proceso multietapas. Si bien esta tecnología cuenta con ventajas, la complejidad y los costos de construcción y funcionamiento de sistemas comerciales de múltiples etapas no han permitido su expansión. Se contabilizan al menos 6 tecnologías a nivel comercial con procesos de digestión anaerobia en dos etapas (BTA, Linde-KCA-Dresden, Biopercolat, BiogasNord y Krieg & Fischer) operando en configuraciones seca – seca y seca – húmeda, con temperaturas de operación tanto mesofílicas como termofílicas, y con tiempos de retención entre 13 y 60 días (Campuzano, 2015; Rapport *et al.*, 2008).

4.4 Parámetros operacionales

El importante desarrollo tecnológico de la DA de FORSU ha dado lugar a la aparición de un gran número de opciones especializadas para la implementación del proceso. Según Campuzano (2015), existen al menos 40 tecnologías sólo para el tratamiento de la FORSU.

Con la creciente demanda de energía renovable y la implementación de normativas de protección ambiental, la digestión anaerobia ha atraído considerable atención dentro de la comunidad científica, lo que ha repercutido en el desarrollo de diversas tecnologías a escala laboratorio y a escala comercial (Mao *et al.*, 2015). Las tecnologías de DA varían según los parámetros en los que operan (características del sustrato, concentración de sólidos, temperatura, inóculo, tiempos de reacción y las características del sustrato que utilizan), los cuales, además de definir la conveniencia de su uso, también definen su clasificación.

4.4.1 Características del sustrato

Es difícil realizar una comparación directa del rendimiento en la producción de biogás a partir de la FORSU ya que los datos de rendimiento para tipos específicos de residuos a menudo son producidos bajo una gran variedad de condiciones que afectan significativamente el rendimiento de la DA, medido como el rendimiento de arranque, el rendimiento de biogás y la relación de conversión de sólidos totales y volátiles (Ajay *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). También la presencia de impurezas y de componentes de

gran tamaño en la FORSU puede conducir a una mayor complejidad en el comportamiento biológico y en los costos del proceso (Zupančič y Grilc, 2012). En general, las marcadas diferencias en las características físicas, químicas y bromatológicas de FORSU, ya sea por su fuente de generación, condiciones ambientales e incluso en las mismas áreas geográficas, tienen un efecto significativo sobre el diseño y la operación de los reactores, la calidad de los productos, la fisiología bacteriana y la relación costo/beneficio del proceso (Kothari *et al.*, 2014; Zupančič y Grilc, 2012).

Bolzonella *et al.* (2006) hicieron una comparación del rendimiento en la producción de biogás de dos reactores de digestión anaerobia seca a gran escala operando en las mismas condiciones, pero alimentados con residuos sólidos orgánicos municipales separados en la fuente y con separación mecánica. Los resultados indican que el reactor que trata la fracción de residuos orgánicos separados en la fuente y el reactor que trata la FORSU separada mecánicamente generaron unos 200 y 60 m³ de biogás por tonelada de residuos tratados, respectivamente, mientras que la producción específica de metano fue de unos 400 y 130 NL/kg_{sv}, respectivamente. Otros autores también han evaluado la biodegradabilidad de la FORSU separada en la fuente y separada mecánicamente. Forster- Carneiro *et al.* (2008) reportan una mayor biodegradabilidad para FORSU separada en origen con una remoción del 45 % de sólidos volátiles, mientras que para la FORSU separada mecánicamente la remoción de sólidos volátiles fue de 56 %. En cuanto a producción de biogás, para la FORSU separada en la fuente se muestra una producción casi 5 veces superior a la FORSU separada mecánicamente. Estos resultados son atribuidos por los autores a la acumulación de AGV durante la etapa inicial de la operación del reactor alimentado con FORSU separada en la fuente, lo cual produjo disturbios en la producción de biogás.

4.4.2 Humedad

El contenido de humedad es un parámetro clave para la selección y operación de las tecnologías de digestión. En la digestión anaerobia seca, este parámetro es aún más determinante pues, aunque un proceso con alto contenido de sólidos muestra ventajas en cuanto a reactores de menor volumen y una mayor concentración de biomasa activa, a nivel operativo estos sólidos son difíciles de manejar, bombear y mezclar, además de afectar el transporte, la difusión y la cinética de las reacciones del proceso (Forster, 2005; García-Bernet *et al.*, 2011). Los consorcios de microorganismos anaerobios para la producción de biogás requieren un ambiente con una actividad de agua de (a_w) > 0.91 (Rockland y Beuchal, 1987).

Producto de las variaciones en las características físicas propias de la FORSU, a una escala comercial es difícil mantener los mismos niveles de humedad durante todo el proceso de digestión. A menudo a escala industrial, el contenido de humedad del reactor se ajusta mediante la adición de agua dulce o la recirculación de digestato líquido. Los operadores deben adaptar la cantidad de líquido agregado de acuerdo con los parámetros mecánicos, reológicos y biológicos del sustrato a alimentar (Le Hyaric *et al.*, 2012).

4.4.3 Temperatura

En la digestión anaerobia, la temperatura es una variable significativa ya que determina el comportamiento de los principales parámetros del proceso. Muchos investigadores han informado sobre los efectos de la temperatura en la comunidad microbiana, cinética del proceso, solubilidad de los gases, la producción de metano y la estabilidad de los reactores (Khalid *et al.*, 2011; Mata-Alvarez, 2003; Fernández *et al.*, 2010).

La digestión anaerobia mesofílica ha sido predominante principalmente porque presenta menores requerimientos de energía y en este rango los microorganismos son menos sensibles a los cambios de temperatura, tolerando fluctuaciones de hasta ± 3 °C (De Baere y Mattheeuws, 2012; Zupančič y Grilc, 2012). La DA en condiciones termofílicas en las últimas dos décadas se ha perfilado como una tecnología

con un considerable crecimiento debido esencialmente a las siguientes ventajas (De Baere *et al.*, 2012; Mao *et al.*; 2015, Al Seadi *et al.*, 2008):

- Mayor velocidad de las reacciones biológicas y químicas,
- aumento en el crecimiento específico máximo de los microorganismos,
- mayor capacidad de carga,
- disminución en la solubilidad de los gases favoreciendo la transferencia de la fase líquida a la fase gaseosa,
- reducidos tiempos de retención,
- disminución de la viscosidad, lo que mejora la difusión de materiales disueltos,
- baja tasa de generación de lodos
- producción de biogás con tasas de 30 o 50 % mayores que la digestión mesofílica.

Si bien la mayoría de las principales tecnologías de digestión anaerobia se encuentran disponibles para operar tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas, en Europa la instalación de plantas de digestión anaerobia de FORSU en condiciones termofílicas ha experimentado un considerable aumento hasta alcanzar el 40 % del mercado (Campuzano, 2015; De Baere y Mattheeuws, 2012). Este aumento se ha justificado principalmente a los altos rendimientos en la producción de biogás y a que la mayor demanda de energía en el proceso termofílico se justifica por el mayor rendimiento de biogás (De Baere y Mattheeuws, 2012).

4.4.4 Inóculo

En la digestión anaerobia, la adición del inóculo (biomasa activa) busca mejorar la hidrólisis de la materia orgánica y acelerar la velocidad de producción de biogás creando condiciones óptimas para los consorcios microbianos metanogénicos, evitando la inhibición del proceso debido a la alta acumulación de AGV (Schievano *et al.*, 2010).

La fuente del inóculo empleado para el arranque de reactores anaerobios es un factor primordial, pues de ella depende si el inóculo posee una actividad microbiológica adecuada, una suficiente capacidad para aclimatarse a las características del residuo, una alta capacidad para adaptarse a cambios de temperatura y una elevada capacidad de tamponamiento del medio. Dado que la composición de los inóculos varía en magnitud y proporción con el tiempo y con las condiciones de funcionamiento del reactor, la puesta en marcha del proceso no puede considerarse concluida hasta que no se produzca la aclimatación completa del inóculo, es decir, cuando se alcancen condiciones estables de operación para el nuevo sustrato (Karthikeyan y Visvanathan, 2013).

Si bien existen diversas fuentes de inóculo utilizadas para la digestión de residuos sólidos tales como estiércoles, rúmen bovino, lodos de plantas de aguas residuales, lodos anaerobios granulares y ensilados (Hosseini *et al.*, 2019; Forster-Carneiro *et al.*, 2008), en las plantas de digestión anaerobia de FORSU la práctica más común para establecer y mantener un proceso estable es la recirculación de digestatos sólidos ($ST > 15\%$) o líquidos (posterior a la separación de sólidos, $ST < 15\%$) (Lin y Li., 2017; Schievano *et al.*, 2010).

La principal justificación de la inoculación mediante la recirculación de los digestatos es que al ser un inóculo generado a partir del propio residuo, este se encuentra aclimatado y por tanto contiene una población mixta de bacterias y arqueas ya adaptadas (Karthikeyan y Visvanathan, 2013). La velocidad de crecimiento de los metanógenos acetoclásticos es baja, resultando en tiempos de duplicación de varios días o inclusive mayores. Estas velocidades de crecimiento extremadamente bajas explican el por qué los reactores anaerobios requieren un periodo de puesta en marcha muy largo cuando el inóculo no se encuentra adaptado (Henze *et al.*, 2008)

4.4.5 *Tiempo de retención hidráulica*

El tiempo de retención hidráulica (TRH) es el tiempo promedio que el sustrato alimentado permanece dentro del reactor antes de salir (El Achkar *et al.*, 2017). El TRH desempeña un papel importante en la digestión anaerobia puesto que de él depende que los microorganismos dispongan de su tiempo específico para consumir el sustrato y sintetizar los productos. Si el proceso no se puede mantener en un TRH adecuado, se producirá una actividad metabólica desfavorable y productos indeseables (Neshat *et al.*, 2017). Para TRH largos se necesita un tamaño grande de digestor y además se puede provocar la muerte de microorganismos debido a la escasez de nutrientes. En contraste, los TRH cortos pueden resultar en la inhibición por acumulación de AGV o al lavado de microorganismos y consecuentemente en un bajo rendimiento de metano (Neshat *et al.*, 2017).

4.4.6 *Tiempo de retención de sólidos*

El tiempo de retención de sólidos (TRS) o tiempo de retención celular (TRC) se define como el periodo que la biomasa activa (inóculo) permanece en el reactor, y determina la eficiencia de consumo del sustrato y la dinámica de la población microbiana y las rutas metabólicas. Su valor óptimo puede variar dependiendo de factores como las características de los residuos, el tipo y diseño del reactor, las condiciones ambientales dentro del digestor y los microorganismos implicados en el proceso (Ajay *et al.*, 2011). En reactores anaerobios que operan con mezcla completa y en reactores de flujo pistón, el TRS es igual al TRH, lo que significa que la relación TRS/TRH es igual a 1.0. Para que la retención de la biomasa se considere efectiva, la relación TRS/TRH debe ser superior a 3.0 (Burke, 2001).

Un aumento en TRS permite un mayor tiempo de contacto entre el sustrato y los microorganismos, pero requiere una alimentación más lenta o un mayor volumen del reactor. En reactores continuos el tiempo de retención debe ser suficientemente largo para asegurar que la cantidad de microorganismos eliminados con el efluente (digestato) no sea mayor que la cantidad de microorganismos reproducidos (Burke, 2001). Un TRS corto proporciona un buen caudal de sustrato, pero un menor rendimiento de biogás. Por lo tanto, es importante adaptar el TRS a la velocidad de descomposición específica de los sustratos usados (Al Seadi *et al.*, 2008).

En la digestión anaerobia de FORSU un enfoque alternativo ha sido recircular el digestato como inóculo, permitiendo así un tiempo de retención de sólidos más largo en el digestor y reduciendo el potencial de biogás del digestato resultante. Esto es especialmente benéfico en las plantas a gran escala con bajos tiempos de retención de sólidos pues en el digestato no recirculado puede permanecer una cantidad sustancial (25 – 30 %) del potencial de metano, lo que puede causar emisiones de gases de efecto invernadero durante su acumulación a cielo abierto (Estevez *et al.*, 2014).

4.5 **Parámetros de control del proceso**

La digestión anaerobia es un proceso complejo donde pequeños cambios en las condiciones de operación o en las características mismas del sustrato pueden provocar alteraciones en el equilibrio entre los grupos de microorganismos resultando en un proceso inestable o en su fallo total (Mei y Peng, 2016).

Si bien en los digestores anaerobios el control del proceso a menudo es difícil debido a las numerosas condiciones operacionales interrelacionadas y a que los cambios en una condición pueden afectar directa o indirectamente a otros (Gerardi, 2003), existen ciertos parámetros de control que son utilizados como indicadores del estado del proceso. Los indicadores comunes para el monitoreo del proceso de biogás son: la tasa de producción de biogás, composición del biogás, pH, alcalinidad y los ácidos grasos volátiles (Mata-Álvarez, 2003).

4.5.1 pH

De manera general, el valor de pH mide concentración de ácidos en un medio (Kothari *et al.*, 2014). Su determinación es sumamente importante para el control y operación de reactores, dado que tiene una gran influencia en el metabolismo microbiano y afecta la disociación de algunos compuestos de importancia (amoníaco, sulfuro, ácidos orgánicos) para el proceso (Forster, 2005; Al Seadi *et al.*, 2008).

El rango de pH considerado para la digestión anaerobia es relativamente amplio y el valor de pH óptimo varía con los diferentes sustratos, las técnicas de digestión y las poblaciones microbianas involucradas en el proceso (Zhai *et al.*, 2015). Para un óptimo proceso de digestión anaerobia, diversos autores recomiendan valores de pH cercanos al neutro, pues en esas condiciones la mayoría de las arqueas metanogénicas pueden desarrollarse favorablemente. Adekunle y Okolie (2015) reportan que para la mayor producción de biogás el rango óptimo debe ser de 6.7 a 7.5. Al Seadi *et al.* (2008) por su parte indican que la formación de metano ocurre dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5.5 a 8.5, con un intervalo óptimo entre 7.0 – 8.0 para la mayoría de los metanógenos.

En reactores de una etapa, donde se logra un proceso equilibrado, es decir que las arqueas metanogénicas convierten los productos de la fermentación a la misma velocidad a la que se forman metano y dióxido de carbono, el pH del medio se estabiliza en valores ligeramente alcalinos (7.4 - 8.5) dependiendo de la temperatura de trabajo (Forster, 2005). Para las bacterias fermentativas, un rango de pH de 4.0 a 8.5 es adecuado (Braguglia *et al.*, 2017) El hecho de que los microorganismos acidificantes son activos inclusive a pH bajo (4.0), significa que cuando la capacidad metanogénica del sistema se sobrepasa el reactor se acidificará a un pH de 4.0 o 5.0 (Henze *et al.*, 2008).

4.5.2 Alcalinidad y capacidad búfer

La alcalinidad de una sustancia es su capacidad para neutralizar ácidos y constituye la suma de todas las bases titulables. La alcalinidad total es la suma de la alcalinidad bicarbonática o alcalinidad parcial (AP) y la alcalinidad por AGV o alcalinidad intermedia (AI) (Forster, 2005). La capacidad búfer o la capacidad de neutralizar ácidos, representa para los digestores anaerobios la habilidad que estos tienen para resistir cambios de pH sin comprometer la estabilidad del proceso. Esta capacidad está dada tanto por la alcalinidad bicarbonática como por productos en el medio que pueden reaccionar con el gas carbónico para producir alcalinidad bicarbonática (Cajigas *et al.*, 2005).

El exitoso funcionamiento de un reactor anaerobio depende de una adecuada relación entre la alcalinidad bicarbonática y la alcalinidad por AGV, ya que un reactor anaerobio puede presentar una alta alcalinidad total, pero una baja alcalinidad bicarbonática. Esto significaría que su capacidad de amortiguamiento de pH no es suficiente y por tanto puede sufrir una acidificación. Una relación AI/AP entre 0.10 y 0.40 es recomendada (Martín-González *et al.*, 2013), es decir que se requiere que al menos el 60 % de la alcalinidad total sea bicarbonática.

El índice alfa (α) definido como la relación entre la alcalinidad debida a los AGV y la alcalinidad total es usualmente empleada para el control de la estabilidad del proceso. Se ha encontrado que valores entre 0.20 y 0.30 garantizan un buen funcionamiento del reactor. Mientras que valores menores a 0.20 indican subalimentación y mayores a 0.35, principios de acidificación (Rojas, 1987).

4.5.3 Inhibidores

En la digestión anaerobia, a menudo se encuentran sustancias inhibitoras que son consideradas como la causa principal de la interrupción o falla los reactores (Chen *et al.*, 2008). La presencia de inhibidores puede deberse a que están contenidos en los sustratos o a que son producidas durante el proceso mismo

de la digestión anaerobia (Mata-Alvarez, 2003). Una sustancia es considerada un inhibidor cuando provoca un cambio adverso en la población microbiana o la inhibición del crecimiento bacteriano. La inhibición suele estar indicada por una disminución de la tasa de estado estacionario de producción de gas metano y la acumulación de ácidos orgánicos (Kroeker *et al.*, 1979).

Los ácidos grasos volátiles (AGV) se reportan a menudo como la principal causa de inhibición de la digestión anaerobia. La generación anaerobia de AGV se logra a través de una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por bacterias acidogénicas y acetogénicas (Zhou *et al.*, 2017). Los AGV son productos intermedios en la digestión anaerobia y son los precursores de la producción de biogás (Huang *et al.*, 2016).

Los microorganismos anaerobios, especialmente los metanógenos, son sensibles a la concentración de ácidos en el digestor y su crecimiento puede ser inhibido por condiciones ácidas, por lo tanto, se debe evitar su acumulación excesiva (Kothari *et al.*, 2014). Si la tasa de producción de AGV es mayor que la tasa de consumo por las arqueas metanogénicas (las cuales tienen una tasa de crecimiento más lenta) ocurre una acumulación de AGV en el reactor que provocaría su acidificación si no hay capacidad búfer suficiente para neutralizarlos, y solo volverá a funcionar adecuadamente con adición externa de alcalinidad (Hartmann y Ahring, 2006; Pezzolla *et al.*, 2017).

En la digestión anaerobia de la FORSU, la producción de AGV es alta y rápida, debido a alto contenido de compuestos fácilmente biodegradables, por lo que es mayor el riesgo de la acidificación del medio y una inhibición de la fase metanogénica (Fantozzi y Buratti, 2011). Algunos trabajos de investigación se han realizado para demostrar que a pesar del pH inicial muy bajo durante la fase ácido/acetogénica y de la concentración muy elevada de AGV que generalmente causan la inhibición e inestabilidad de la fase metanogénica, un proceso de digestión en dos fases y la recirculación continuada de digestato pueden ayudar a disminuir la concentración de AGV y además mejorar el tamponamiento del pH a lo largo del tiempo (Lee *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013).

4.5.4 Producción y composición del biogás

En un proceso estable, la cantidad de biogás producido y su composición también debe ser estable. Este indicador junto a las concentraciones de AGV y alcalinidad están estrechamente ligados y su interrelación puede dar una visión certera de la estabilidad del proceso (Mata-Álvarez, 2003):

- cuando la concentración de AGV es baja (<1000 mg_{DDO}/L) y la producción de biogás es alta, con un contenido de dióxido de carbono alrededor del 25 – 33 %, el proceso es estable y la cadena trófica está correctamente equilibrada;
- cuando la concentración de AGV en el medio y el contenido de dióxido de carbono en el biogás aumentan simultáneamente, el proceso se va a alterar y los microorganismos acidificantes prevalecen sobre los metanogénicos; por lo tanto, los AGV se están acumulando en el medio;
- cuando aumenta la concentración de AGV y la producción de biogás disminuye, se puede estar ante una inhibición o problemas de toxicidad.

4.6 Cinética de la digestión anaerobia

El modelado de la digestión anaerobia, basado en estudios cinéticos, permite predecir el efecto de las variables sobre el rendimiento del proceso. Por ello, el desarrollo y parametrización de los modelos ajustados a resultados experimentales es de suma importancia (Fdez.-Güelfo *et al.*, 2011). Los modelos que resultan de los estudios cinéticos son una herramienta de predicción y diseño de los procesos, y también son muy útiles para comprender los mecanismos inhibidores de la biodegradación de un sustrato (Khanal, 2008; Sajeena Beevi *et al.*, 2015).

Según Fernández-Rodríguez *et al.* (2013), la cinética de la digestión anaerobia se puede establecer mediante modelos matemáticos con base en la tasa de crecimiento de microorganismos, la utilización del sustrato y la formación de productos, y es posible interrelacionarlos por diferentes coeficientes. Para el estudio cinético de la digestión anaerobia de FORSU se han aplicado y estudiado diversos modelos. Los modelos cinéticos de primer orden, de Romero, Gompertz modificado y tipo Monod destacan entre los de mayor aplicación (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2013; Campuzano, 2015, Nielfa *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2010; Sajeena Beevi *et al.*, 2015; Viéitez *et al.*, 2000).

El modelo cinético de primer orden es muy fácil de usar ya que proporciona una base simple para comparar el rendimiento estable del proceso en condiciones prácticas (Sajeena Beevi *et al.*, 2015). Se ha observado un mejor ajuste para la digestión anaerobia de sustratos complejos donde la hidrólisis es la etapa limitante (Fernández *et al.*, 2010).

El modelo cinético de Romero ha sido utilizado para la modelación de la digestión anaerobia seca de FORSU y se basa en la hipótesis de que el proceso microbiológico puede representarse como una reacción auto catalítica como consecuencia de la capacidad de reproducción de los microorganismos (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2013).

El modelo modificado de Gompertz describe la densidad celular durante los períodos de crecimiento de los microorganismos en términos de tasas de crecimiento exponencial y duración de la fase de latencia (Amiri *et al.*, 2017), lo cual ha permitido un mejor ajuste en procesos anaerobios que han experimentado alguna perturbación o inhibición (Kothari *et al.*, 2014). El modelo modificado de Gompertz supone que la producción de biogás es proporcional a la actividad microbiana (Nielfa *et al.*, 2015)

El modelo cinético tipo Monod establece que el crecimiento celular es una función de la disponibilidad de un sustrato limitante (Monod, 1949) y ha sido utilizado para predecir la formación de metano y determinar los parámetros cinéticos de la degradación de FORSU en reactores anaerobios (Campuzano, 2015) y en rellenos sanitarios (Viéitez *et al.*, 2000). Una de las limitaciones que presenta el modelo tipo Monod es que no tiene en cuenta el hecho de que los microorganismos utilizan parte del sustrato para su mantenimiento (Muloiwa *et al.*, 2020).

El modelo de Tessier, también conocido como modelo exponencial, es similar al tipo Monod y ha sido reportado con un buen ajuste en la modelación de la producción de biomasa y bioenergía a partir de subproductos agrícolas (Choi y Lee, 2019), en la producción de etanol (Ahmad *et al.*, 2011) y otros productos de fermentación (Muloiwa *et al.*, 2020).

A concentraciones de sustrato bajas y muy altas, el modelo tipo Monod y el modelo de Tessier guardan una gran similitud. Sin embargo, cuando ocurre la transición de la dinámica de baja concentración de sustrato a alta concentración de sustrato, el modelo Tessier establece un aumento más rápido de la velocidad de crecimiento específica, debido a la relación exponencial entre la velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato (Kong, 2017; Villadsen *et al.*, 2001). Lo anterior se explica en que el modelo de Tessier sí tiene en cuenta la energía de mantenimiento para la actividad celular, lo que significa que la tasa máxima de crecimiento se reducirá cuando la concentración de sustrato sea menor y los microorganismos compitan por los recursos (Wang y Witarsa, 2016).

5. METODOLOGÍA

En las plantas de digestión anaerobia de la FORSU, el almacenamiento temporal en condiciones no controladas y por periodos extensos es una práctica muy común, pudiendo incidir sobre la producción de metano. El almacenamiento no controlado de la FORSU implica un alto riesgo de deterioro por la actividad microbiana no deseada, el cual induce a la reducción del contenido de los compuestos orgánicos susceptibles de ser transformados a metano. Además de los propios procesos de conversión biológica de la FORSU durante el almacenamiento no controlado, la lixiviación también puede convertirse en una causa de la merma del contenido orgánico (Wu *et al.*, 2016). Como alternativa, el presente trabajo propone el ensilado como un método de almacenamiento controlado para la conservación del potencial de producción de metano de la FORSU. La metodología que aquí se describe está orientada a determinar las mejores condiciones para el ensilado de la FORSU que permitan mejorar su aprovechamiento energético mediante la producción de metano.

La metodología se desarrolló en tres etapas (Figura 5.1). La Etapa 1 correspondió al ensilado de la FORSU, en la cual se evaluaron dos parámetros del proceso: temperatura y concentración de sólidos. El objetivo de esta etapa fue determinar las condiciones de temperatura y concentración de sólidos que permiten el ensilado más efectivo mediante una rápida y suficiente acidificación de la FORSU. En la Etapa 2, el trabajo experimental estuvo dirigido a la producción de digestatos de la FORSU con el objetivo de utilizarlos como inóculos metanogénicos adaptados al sustrato y a las diferentes temperaturas propuestas. La Etapa 3 consistió en la metanización de la FORSU previamente ensilada a diferentes temperaturas y concentraciones de sólidos (Etapa 1) utilizando los inóculos metanogénicos previamente aclimatados (Etapa 2). El objetivo de esta última etapa fue, mediante una prueba de metanización, determinar la efectividad del ensilado para aumentar la producción de metano de la FORSU. En la etapa 3, se evaluó además el efecto la temperatura y la relación sustrato a inóculo (S/I) sobre la producción de metano, con el fin de establecer las mejores condiciones de metanización para lograr la mayor eficiencia en la producción de metano a partir de la FORSU ensilada comparada con la FORSU fresca.

Para determinar el tiempo de ensilado (Etapa 1) de la FORSU se llevó a cabo un experimento, en el cual se fermentó FORSU fresca. El tiempo en que la FORSU alcanzó un estado estable de fermentación se estableció como la duración de la etapa de ensilado. La duración de la prueba de metanización (Etapa 3) se determinó a partir de los experimentos de aclimatación de los inóculos, desarrollados en la Etapa 2.

Previo al desarrollo de las etapas descritas en la Figura 5.1, una muestra representativa de la FORSU fue recolectada en una estación de transferencia de la Ciudad de México. La muestra fue caracterizada y almacenada en condiciones adecuadas para su posterior uso en los experimentos de las diferentes etapas.

5.1 Muestreo y caracterización de la FORSU

Para la obtención de las muestras de la FORSU se seleccionó la Estación de Transferencia de residuos sólidos de la alcaldía de Coyoacán en la Ciudad de México. Según el Inventario de Residuos Sólidos de

la Ciudad de México elaborado por la Secretaría de Medio Ambiente (SEDEMA, 2018), en el año 2017 la Alcaldía de Coyoacán registró la mayor eficiencia en la recolección selectiva de la FORSU en la Ciudad de México, con un 75 %. La Alcaldía de Coyoacán hace una recolección separada de la FORSU en los domicilios y la transporta a la estación de transferencia los martes, jueves y sábados; lo cual fue considerado para definir el día de muestreo. La muestra recolectada fue utilizada para el desarrollo experimental descrito en la Figura 5.1.

| Etapa 1. Ensilado | Variables | | | |
|--|-------------|---|--|----|
| | Temperatura | | Concentración de sólidos | |
| Fermentación de FORSU a diferentes temperaturas y concentraciones de sólidos. | 20 °C | | 10, 20 y 28 % _{ST} | |
| | 35 °C | | | |
| | 55 °C | | | |
| Arreglo experimental | | | | |
| | | Concentración de sólidos (% _{ST}) | | |
| | | 10 | 20 | 28 |
| Temperatura (°C) | 20 | R1 | R2 | R3 |
| | 35 | R4 | R5 | R6 |
| | 55 | R7 | R8 | R9 |
| * Para cada temperatura los reactores fueron operados por duplicado | | | | |
| Etapa 2. Producción de inóculo para metanización | Variables | | | |
| | Temperatura | | Relación S/I | |
| Generación de digestatos de FORSU adaptados a diferentes temperaturas para su uso como inóculo metanogénico. | 20 °C | | 0.5, 1.0 y 1.5 g _{SV} -sustrato/ g _{SV} -Inóculo | |
| | 35 °C | | | |
| | 55 °C | | | |
| Etapa 3. Metanización de ensilados | Variables | | | |
| | Temperatura | | Relación S/I | |
| Metanización de los ensilados de FORSU a diferentes temperaturas y relación sustrato/inóculo (S/I). | 20 °C | | 0.5, 1.0 y 1.5 g _{SV} -sustrato/ g _{SV} -Inóculo | |
| | 35 °C | | | |
| | 55 °C | | | |
| Arreglo experimental | | | | |
| | | Concentración de sólidos durante el ensilado (% _{ST}) | | |
| | | 10 | 20 | 28 |
| Relación S/I | 0.5 | R1 | R2 | R3 |
| | 1.0 | R4 | R5 | R6 |
| | 1.5 | R7 | R8 | R9 |
| * A cada temperatura se implementó el mismo arreglo experimental. No se realizó duplicado. | | | | |

Figura 5.1- Metodología general

5.1.1 Recolección y almacenamiento

Para la recolección de la muestra se cumplió con el procedimiento recomendado en la Norma Mexicana NMX-AA-015-1985: Método de cuarteo para residuos sólidos municipales (ver también ASTM D5231-92, 2016). Se muestrearon 11 camiones, obteniendo de cada uno un peso aproximado de 200 kg. Posteriormente, el total de la muestra se mezcló completamente usando un cargador frontal y palas. Terminada la mezcla se realizó el proceso de cuarteo, repitiéndose dos veces para reducir la cantidad a aproximadamente 200 kg. Luego se procedió al empaque de las muestras en bolsas plásticas, especiales para congelar alimentos, con sellado hermético. El empaque se realizó de forma manual (Figura 5.2) a fin de poder separar materiales plásticos, metales, piedras y madera, los cuales son considerados

elementos contaminantes de la FORSU. Las bolsas conteniendo la FORSU fueron rotuladas y posteriormente almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el propósito de minimizar el riesgo de alteraciones a las propiedades físicas y químicas.



Figura 5.2 Muestreo y recolección de la FORSU

5.1.2 Caracterización de la FORSU

Considerando la heterogeneidad en la composición de la FORSU y la presencia de residuos de gran tamaño, y para garantizar su homogeneidad, esta fue inicialmente triturada utilizando una licuadora industrial, marca International, modelo LI-5. Posterior a la trituración, la FORSU fue extrudida utilizando un molino de carne marca Advance RH, modelo MOLAI – 22, con diámetro de orificio del cedazo de 8 mm (Figura 5.3). Una vez homogenizada la muestra se realizó la determinación de los siguientes parámetros: Demanda Química de Oxígeno (DQO), carbohidratos solubles en agua (CSA), sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV), pH, ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH_4). Los métodos analíticos utilizados se detallan en el capítulo 5.8.

5.2 Fermentación de FORSU

El objetivo de este experimento fue determinar el comportamiento de la hidrólisis y acidificación de la FORSU durante su almacenamiento por un tiempo prolongado. Esto sirvió para determinar el tiempo en que la FORSU alcanza un estado estable durante la fermentación. Dicho tiempo fue posteriormente utilizado como parámetro para establecer la duración de las pruebas de ensilado de la FORSU.

La fermentación se realizó durante 45 días utilizando un reactor de vidrio de 2,000 mL, con 1500 mL de volumen de reacción. El reactor fue alimentado con FORSU fresca, con una concentración de sólidos de 28 %. El reactor, además se mantuvo a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin mezcla mecánica y sin ajuste de pH. Cada tres días se extrajo una muestra del contenido del reactor y se determinaron los siguientes

parámetros: pH, DQO soluble, sólidos totales, sólidos volátiles y AGV. Los métodos analíticos utilizados para cada determinación se detallan en el capítulo 5.8.

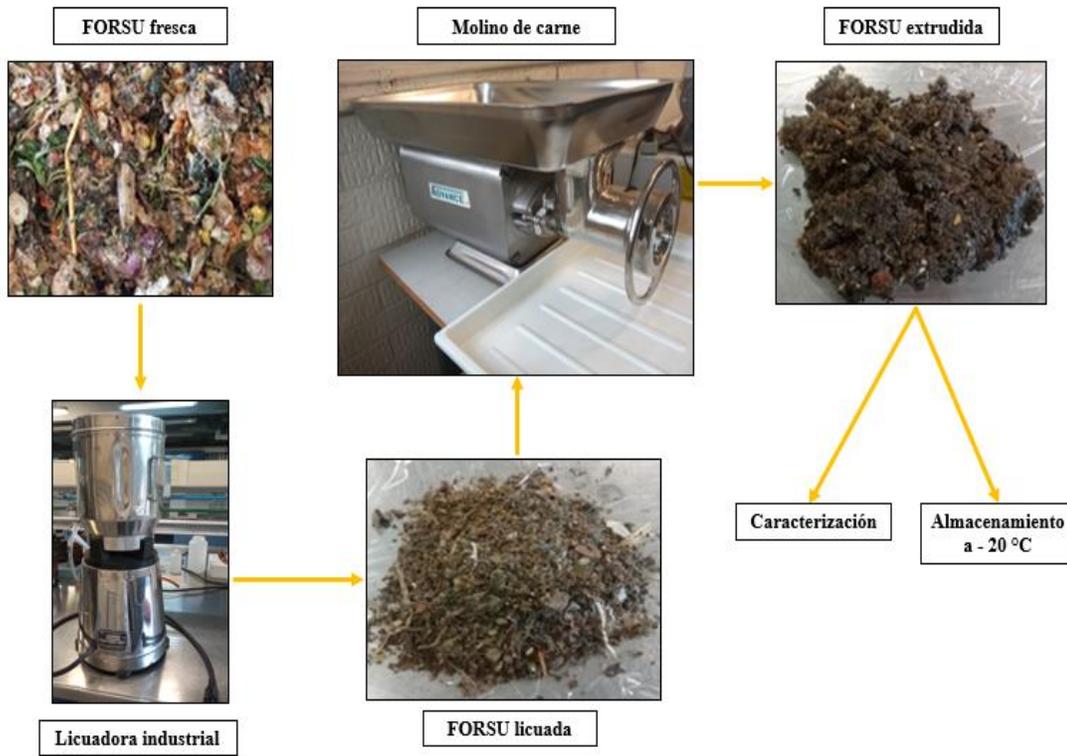


Figura 5.3 Preparación de FORSU para caracterización y trabajo experimental

5.3 Ensilado

5.3.1 Preparación de muestras

Aproximadamente 30 kg de la FORSU fueron triturados y extrudidos siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 5.1.2. De ese lote ya homogenizado se tomó la muestra de FORSU para la realización de cada experimento.

5.3.2 Condiciones de ensilado

Según lo planteado en la Figura 5.1, el procedimiento experimental que aquí se describe se realizó a tres temperaturas: 20, 35 y 55 °C. La temperatura de 20 °C fue seleccionada considerando la temperatura media anual de la Ciudad de México. La razón de esta temperatura es la posibilidad de realizar el ensilado a temperatura ambiente (caso común de almacenamiento de FORSU antes de ser procesada para producción de biogás). Las temperaturas de 35 y 55 °C fueron seleccionadas considerando que estos valores se reportan como óptimos para obtener las tasas más altas de degradación anaerobia en condiciones mesofílicas y termofílicas (Mata-Álvarez, 2003). Con la variación de la temperatura se desea determinar el efecto de este parámetro sobre la hidrólisis, la velocidad y el grado de fermentación de la FORSU durante el ensilado, así como sobre la composición de los metabolitos producidos y su influencia en la posterior metanización.

A cada temperatura se operaron 6 reactores discontinuos (Figura 5.4) durante 15 días, utilizando frascos de vidrio de 1000 mL con un volumen de reacción de 800 mL. El tiempo de ensilado de 15 días se determinó a partir de los resultados del experimento descrito en el capítulo 5.2. Tres reactores fueron conectados a un equipo contador de biogás (*Bioprocess Control*) y otros 3 reactores fueron utilizados como sacrificio para la extracción de muestras. Los reactores conectados al contador de biogás no fueron abiertos durante los 15 días de ensilado y su contenido no fue mezclado. En los reactores de sacrificio solo se realizó mezcla al momento de extraer las muestras. Diferentes concentraciones de sólidos fueron analizadas: 10, 20 y 28 %_{ST}, correspondiendo el 28 %_{ST} a la concentración de sólidos inicial de la FORSU fresca. Para ajustar las otras concentraciones se agregó agua de la llave. Dado que la concentración de sólidos se relaciona directamente con la disponibilidad de agua en el medio para la actividad microbiana (Le Hyaric *et al.*, 2011; García-Bernet *et al.*, 2011), la variación de este parámetro durante el ensilado se realizó con el objetivo de determinar su efecto sobre la cinética y el grado de fermentación que la FORSU puede alcanzar durante el ensilado. Los valores de la concentración de sólidos evaluados se determinaron considerando un rango (10 – 28 %_{ST}) suficientemente amplio para obtener resultados extrapolables. La fermentación durante el ensilado se llevó a cabo con los microorganismos nativos contenidos en la FORSU y el pH no se ajustó en ningún momento.

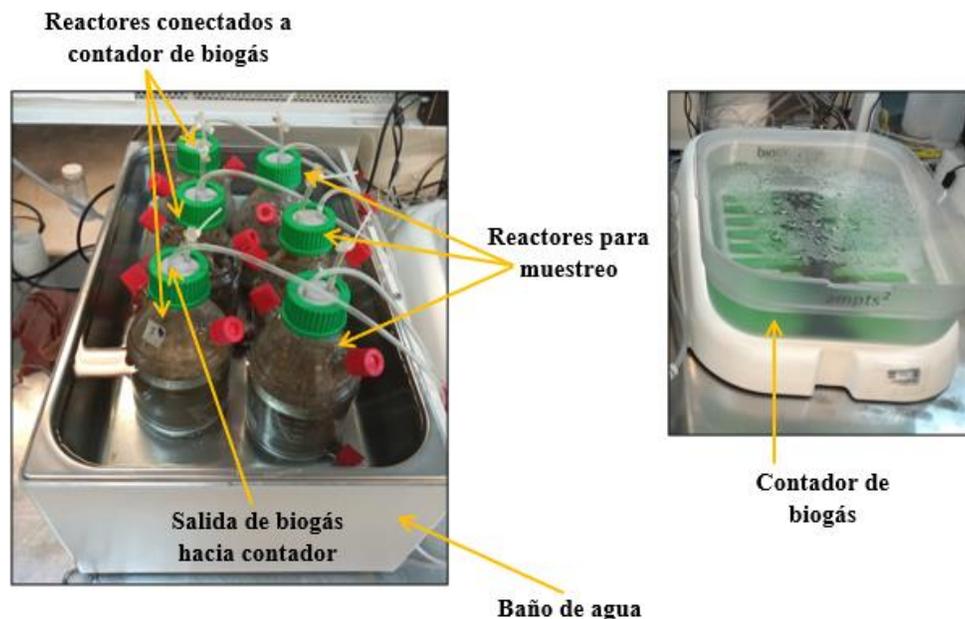


Figura 5.4 Equipo utilizado para ensilado de la FORSU

5.3.3 Parámetros de monitoreo

De los reactores de sacrificio, diariamente se extrajeron muestras después de realizar un intenso mezclado manual del contenido en cada reactor. Para cada muestra se determinó el pH, sólidos totales y volátiles, DQO soluble, AGV, alcoholes (etanol y metanol) y ácido láctico. Los métodos analíticos utilizados para cada determinación se describen en el capítulo 5.8. Los sólidos volátiles se corrigieron utilizando los factores de volatilización propuestos por Porter y Murray (2001). Para 105 °C, el factor de volatilización fue de: 0.394 para ácido láctico, 0.937 para AGV totales y 1.0 para alcoholes totales. A partir de los valores obtenidos de DQO soluble y metabolitos totales (AGV + alcoholes + ácido láctico) se calculó el grado de fermentación (η_f), el cual indica la fracción de los compuestos orgánicos solubles convertidos a metabolitos de procesos fermentativos y se calcula relacionando la DQO equivalente de los metabolitos totales con la DQO_S del sustrato (Ecuación 3):

$$\eta_f = \frac{[DQO_{Eq-metabolitos\ totales}]}{[DQO_{soluble}]} \cdot 100$$

Ecuación 5.1

5.3.4 Prueba de potencial bioquímico de metano

A fin de determinar el efecto del ensilado sobre la biodegradabilidad de la FORSU, medida como el potencial de producción de metano, los productos del ensilado obtenidos a las diferentes temperaturas y concentraciones de sólidos fueron sometidos a la prueba de potencial bioquímico de metano (PBM)

Para realizar la prueba de PBM se utilizó el *Automatic Methane Potential Test System* (AMPTS II) de la empresa *Bioprocess Control, Suecia*. El equipo consta de un baño de agua, mediante el cual se mantuvo una temperatura constante de 35 °C. Para la reacción se utilizaron frascos de 500 mL con un volumen efectivo de 400 mL. En cada frasco se adicionaron 8 g_{SV} de inóculo, el cual consistió en lodos anaerobios granulados de un reactor UASB utilizado para el tratamiento de aguas residuales de la Cervecería Modelo en la Ciudad de México. Los lodos se mantuvieron almacenados en el laboratorio a una temperatura de 4 °C y previo a su uso, fueron centrifugados a una velocidad de 3700 rpm durante 7 minutos. El sobrenadante fue desechado para evitar la presencia de sustancias disueltas exógenas.

Para determinar la producción de metano endógena del inóculo, también se operó un reactor que contenía solo inóculo. La proporción sustrato a inóculo fue de 1:4, para lo cual se adicionó 2 g_{SV} de cada producto ensilado como sustrato y 8 g_{SV} de inóculo. Posteriormente, a cada frasco se añadió 1 mL de solución de micronutrientes y 100 mL de solución búfer de fosfatos 0.4 M y se añadió agua del grifo hasta alcanzar el volumen de reacción de 400 mL. Para garantizar condiciones anaerobias se realizó el desplazamiento del aire del espacio de cabeza de los frascos mediante N₂ durante 30 segundos.

Los frascos fueron puestos en incubación con agitación mecánica mediante el acople de motores de mezcla. Para realizar la medición del biogás el equipo cuenta con un dispositivo de registro (contador de biogás) al cual se conectó cada frasco mediante una manguera. Diariamente, por cromatografía, se determinó el contenido de metano en el biogás. Se calculó el valor del PBM y se expresó en términos de volumen de metano producido en condiciones normalizadas (NL) por unidad de masa de sustrato (SV). La duración de la prueba se determinó con base en la recomendación de Holliger *et al.* (2016), quienes consideran que la máxima producción de metano se alcanza cuando los valores de metano acumulado no cambian más del 1 % en promedio de tres días consecutivos.

5.4 Aclimatación y producción de inóculos

Para que un inóculo (biomasa activa) sea efectivo se requiere que este se encuentre adaptado tanto al sustrato como a las condiciones de funcionamiento del reactor, principalmente a la temperatura (Capítulo 4.4.4). En las plantas a gran escala de digestión anaerobia de FORSU, una práctica común es utilizar el digestato de lotes previamente digeridos (digestato) como inóculo (Schievano *et al.*, 2010). La principal justificación de la inoculación mediante digestatos es que, al ser generado a partir del propio residuo, se encuentra aclimatado y, por tanto, contiene una población mixta de bacterias y arqueas ya adaptadas (Karthikeyan y Visvanathan, 2013).

Para seguir el concepto de temperatura, la metanización se realizó también a las mismas tres temperaturas en que se realizó el ensilado (20, 35 y 55 °C). A cada temperatura se operaron tres reactores discontinuos utilizando frascos de vidrio de 2,000 mL, cada uno con un volumen de reacción aproximado de 1,500 mL. Los reactores fueron alimentados con FORSU fresca en una relación sustrato a inóculo (S/I) de 0.33, 0.5 y 1.0 con base en sólidos volátiles. Como fuente de microorganismos para iniciar la adaptación se utilizaron lodos anaerobios granulados de un reactor UASB que trata las aguas residuales

de la Cervecería Modelo en la Ciudad de México que opera a 35 °C. Los lodos se mantuvieron almacenados en el laboratorio a una temperatura de 4 °C y previo a su uso, fueron centrifugados a una velocidad de 3,700 rpm durante 7 minutos, y el sobrenadante fue desechado para evitar la presencia de sustratos exógenos disueltos. Durante la operación de los reactores no se realizó mezcla mecánica ni se ajustó el pH. El control de la temperatura se realizó a través de un baño de agua.

Para considerar la estabilidad de los reactores y la viabilidad del digestato para su uso como inóculo se consideraron los siguientes criterios en la operación del reactor:

- a) pH entre 7.0 y 8.0 (Al Seadi *et al.*, 2008).
- b) Relación de alcalinidad de bicarbonato a alcalinidad total (índice α) superior a 0.6 (Martín-González *et al.*, 2013).
- c) Concentración de AGV por debajo de 1.5 g/kg de digestato (Saveyn y Eder, 2014) y
- d) Concentración de metano estable mayor a 60 % en el biogás (Schievano *et al.*, 2008).

A las tres temperaturas, los reactores fueron monitoreados con los siguientes parámetros: pH, alcalinidad, sólidos totales y volátiles, concentración de AGV y nitrógeno amoniacal. Se realizó la cuantificación de biogás utilizando un contador automático de biogás y, por cromatografía, se determinó el contenido de metano en el biogás. Antes de utilizar el digestato para las pruebas de producción de metano, este se mantuvo bajo las mismas temperaturas sin alimento durante 6 días.

5.5 Metanización de FORSU ensilada

Conforme al objetivo de este trabajo, esta etapa consistió en llevar a cabo pruebas de metanización de la FORSU ensilada y así determinar el efecto del ensilado sobre la producción de metano, utilizando como comparación la producción de metano de la FORSU fresca. La prueba de metanización consistió en mezclar FORSU ensilada y fresca con los digestatos previamente adaptados al sustrato y a las mismas temperaturas evaluadas en la etapa de ensilado (20, 35 y 55 °C) (Capítulo 5.4).

Además de la temperatura, la relación S/I (sólidos volátiles del sustrato a sólidos volátiles de inóculo) también fue evaluada como un parámetro operacional de la metanización. Las relaciones S/I evaluadas en este trabajo se determinaron con base en referencias de estudios similares. Di Maria *et al.* (2012) reportan que en la digestión anaerobia de FORSU a escala industrial, generalmente se aplican relaciones S/I bajas (0.3 - 0.5 en base seca) a fin de maximizar la cinética de reacción y evitar riesgos de fallas del proceso. Karthikeyan y Visvanathan (2013) reportan que en la digestión anaerobia seca de FORSU es posible operar reactores por lotes alimentados con porcentajes de inóculo que oscilan entre 10 y 60 % de la masa total por digerir. Por su parte, Motte *et al.* (2013) reportan uso de relaciones S/I entre 2 y 6 durante la operación de reactores a escala de laboratorio. Tomando en cuenta lo anterior, se evaluaron relaciones S/I en un rango amplio (0.5 - 1.5) que permitiera llegar a resultados concluyentes. Al final de la prueba de metanización, como principales resultados se obtuvo: el efecto del ensilado sobre la cantidad de metano producido por unidad de masa y la rapidez de su producción; las mejores condiciones de temperatura y relaciones S/I para obtener la mayor producción de metano a partir de la FORSU ensilada.

Durante las pruebas de metanización no se controló el pH (sin solución búfer), no se añadieron micronutrientes y no hubo mezcla mecánica en los reactores. La no adición de solución búfer fue con el objetivo de evaluar la capacidad de los inóculos adaptados para amortiguar las caídas de pH en el sistema. El no establecer mezcla durante la metanización fue para determinar la viabilidad de la llevar a cabo la metanización como un proceso simple, al reducir el uso de elementos mecánicos y el consumo adicional de energía. En esta etapa del trabajo experimental se operaron 18 reactores (Tabla 5.1) en modo discontinuo utilizando frascos de 500 mL con un volumen variable de reacción. Como primer paso, en todos los frascos se añadieron 10 g_{SV} de inóculo metanogénico (digestato) aclimatado (Capítulo 5.4). Posteriormente, con cada uno de los 3 productos (10, 20 y 28 %_{ST}) obtenido del ensilado de la FORSU

(Capítulo 5.3), se alimentaron 3 reactores con 5, 10 y 15 g_{SV} de FORSU previamente ensilada. De esta forma se ajustaron las relaciones de sustrato a inóculo (S/I) a 0.5, 1.0 y 1.5 para cada producto del ensilado, resultando en la operación de 9 reactores con FORSU ensilada (Tabla 5.1). Otros 9 reactores fueron alimentados siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero utilizando como sustrato la FORSU fresca o sin ensilar (Tabla 5.1). Esto con el fin de establecer un punto de comparación y así determinar el efecto del ensilado sobre la producción de metano. No se operaron réplicas de los reactores.

Tabla 5.1 Arreglo experimental para la prueba de metanización para cada una de las temperaturas seleccionadas (20, 35 y 55 °C)

| | Relación S/I en la metanización | Concentración de sólidos durante el ensilado (% _{ST}) | | |
|----------------|---------------------------------|---|-----|-----|
| | | 10 | 20 | 28 |
| FORSU ensilada | 0.5 | R1 | R2 | R3 |
| | 1.0 | R4 | R5 | R6 |
| | 1.5 | R7 | R8 | R9 |
| FORSU fresca | 0.5 | R10 | R11 | R12 |
| | 1.0 | R13 | R14 | R15 |
| | 1.5 | R16 | R17 | R18 |

El inóculo metanogénico utilizado fue digestato previamente adaptado a la FORSU y a la temperatura correspondiente. Para determinar la producción de metano endógena de los digestatos, también se operaron reactores conteniendo solamente digestatos sin mezcla y control de pH. Los reactores fueron incubados durante 25 días a las temperaturas respectivas. Diariamente se tomaron muestras de biogás y por cromatografía se determinó el contenido de metano. El tiempo de 25 días para la prueba de metanización se determinó a partir de los resultados del experimento de aclimatación del inóculo a 35 °C descrito en el Capítulo 5.4.

5.6 Análisis estadístico

Se utilizó la herramienta de análisis estadístico Solver de Excel para el análisis estadístico. Se realizaron análisis de regresión múltiple para predecir el comportamiento de las variables dependientes consideradas en las diferentes etapas experimentales. Los análisis de varianza (ANOVA) del análisis de regresión fueron utilizados para determinar las diferencias significativas de los resultados experimentales y para determinar la influencia de las diferentes variables independientes. Se consideró un nivel de confianza del 95 %.

5.7 Modelación cinética

La cinética de producción de metabolitos durante el ensilado y la producción de metano fue analizada mediante los modelos de Monod y Tessier (Capítulo 4.6). La utilización de los modelos de Monod (Ecuación 5.2) y Tessier (Ecuación 5.3) se basó principalmente en que ambos modelos permiten relacionar el consumo de sustrato con formación de productos a través de los coeficientes de rendimiento (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2013) y en las referencias de su uso para la modelación de procesos bioquímicos en los que se ha utilizado sustratos complejos.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_S+S} \tag{Ecuación 5.2}$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{-\frac{S}{K_T}} \right) \tag{Ecuación 5.3}$$

Donde

$\mu_{\text{máx}}$ = tasa máxima de crecimiento de microorganismos

S = concentración de sustrato

K_s = constante de saturación media

K_T = constante de velocidad

5.8 Métodos analíticos

Los métodos utilizados para determinar los parámetros de caracterización de la FORSU y de monitoreo de los procesos de las diferentes etapas experimentales se presentan en la Tabla 5.2. Para las determinaciones de DQO, NH_4 , carbohidratos y AGV la FORSU y digestatos, las muestras fueron diluidas añadiendo un volumen conocido de agua destilada, siendo tratadas como muestras de aguas residuales.

Tabla 5.2 Métodos analíticos

| Parámetro | Método | Principio |
|--|---|--|
| pH | APHA-4500 B | Medición con potenciómetro. |
| Sólidos totales (ST) | APHA-2540 B | Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 105 °C. |
| Sólidos volátiles (SV) | APHA-2540 E | Gravimetría. Muestra secada a 105 °C e incinerada a 550 °C. |
| Demanda química de oxígeno (DQO) | APHA-5220 D | Fotometría. Digestión ácida por reflujo cerrado a 150 °C durante 2 horas. Lectura a 600 nm. |
| DQO soluble | APHA-5220 D | Muestra previamente filtrada utilizando filtros de celulosa de 0.45 μm . |
| Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄) | APHA-4500-NH ₃ C y 4500-NH ₃ E | Destilación por arrastre de vapor y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N. |
| Carbohidratos solubles | Método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois <i>et al.</i> , 1956) | Determinación colorimétrica cuantitativa de azúcares y sus derivados metílicos, oligosacáridos y polisacáridos. Muestra previamente filtrada utilizando filtros de celulosa de 0.45 μm . Lectura a 490 nm. |
| Ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes (etanol y metanol) | | Cromatógrafo de gases (HP 5890 GC System) equipado con detector de ionización de llama (FID), columna Stabilwax - DA, con hidrógeno como gas de arrastre. Muestra previamente filtrada utilizando filtros de celulosa de 0,22 μm . |
| Ácido láctico (AL) | Borshchevskaya <i>et al.</i> , 2016 | Determinación espectrofotométrica del producto coloreado de la reacción de iones lactato con cloruro de hierro (III) a 390 nm. Muestra previamente filtrada utilizando filtros de celulosa de 0.45 μm . Lectura a 390 nm. |
| Alcalinidad parcial (AP) e intermedia (AI) | Martín-González <i>et al.</i> , 2013 | Titulación con ácido sulfúrico 0.1 N de pH de la muestra hasta pH de 5.75 para AP y de 5.75 a 4.3 para AI. |
| Contenido de CH ₄ y CO ₂ en biogás | | Cromatógrafo de gases (SRI 8610c) equipado con detector de conductividad térmica, columna de acero inoxidable empaquetada con gel de sílice (8600-PK1A), helio como gas de arrastre con flujo de 20 mL/min. La temperatura del detector fue de 150 °C. |

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de la FORSU

6.1.1 Caracterización fisicoquímica

La Tabla 6.1 muestra que la FORSU es un sustrato con alto contenido de sólidos (28 %_{ST}) y, del total de materia seca, el 80 % corresponde a sólidos volátiles, lo cual indica un alto contenido relativo de materia orgánica. La relación de SV/ST es superior a los valores reportados por otros autores (Tabla 6.1) que han caracterizado la FORSU de la Ciudad de México recolectada en la misma Estación de Transferencia. Esto indica que la FORSU utilizada en este estudio posee una mayor fracción de compuestos susceptibles de ser aprovechados para la producción de biogás.

La FORSU es también un sustrato originalmente ácido, con un pH de 5.2 y una concentración de AGV de 36 g_{DQO}/kg_{SV}, lo cual refleja el efecto de degradación de sus componentes orgánicos desde que son producidos en los sitios de generación (Nilsson *et al.*, 2018) hasta que la muestra fue obtenida en la estación de transferencia. Según la Tabla 6.1, los valores de pH y AGV solo son reportados por Ossa (2020), con valores similares a los obtenidos en este trabajo.

Tabla 6.1 Características de la FORSU de la Ciudad de México

| Parámetro | Unidades | Este trabajo | Ossa (2020) | Figueroa (2018) | Campuzano (2015) |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------|-------------|-----------------|------------------|
| pH | - | 5.2 | 5.3 | NR | NR |
| Sólidos totales (ST) | g/kg | 275 ± 2.0 | 278 ± 3.0 | 291 ± 3.1 | 297 ± 4.0 |
| Sólidos volátiles (SV) | g/kg | 221 ± 2.0 | 206 ± 3.6 | 228 ± 3.0 | 223 ± 4.1 |
| SV/ST | - | 0.80 | 0.74 | 0.78 | 0.75 |
| DQO | g/kg _{SV} | 1427 ± 13 | 1871 ± 12 | 1294 ± 60 | 1363 ± 15 |
| DQO/SV | - | 1.58 | 1.90 | 1.29 | 1.37 |
| DQO_s | g/kg _{SV} | 540 ± 53 | NR | NR | NR |
| CSA | g _{DQO} /kg _{SV} | 275 ± 6 | NR | NR | 274 |
| AGV | g _{DQO} /kg _{SV} | 36 ± 3 | 44 ± 0.1 | NR | NR |

NR = no reportado, CSA = carbohidratos solubles en agua. La DQO equivalente de CSA y AGV se determinó con base en la DQO teórica para cada compuesto. La DQO teórica fue calculada con la ecuación general de Rittmann y McCarty (2001).

Al igual que el contenido de sólidos volátiles, la DQO es un parámetro que comúnmente se utiliza para caracterizar el contenido orgánico total de un sustrato, y es útil para predecir la producción de metano.

Sin embargo, para sustratos sólidos, la DQO es poco reportada debido a la complejidad en el manejo de las muestras asociado a la heterogeneidad de la FORSU (Campuzano, 2015). En este trabajo, la DQO de la FORSU es de 1427 ± 13 g/kg_{SV}, situándose en el rango de valores mostrados en la Tabla 6.1. La relación de la DQO con la concentración de sólidos volátiles de la FORSU (g_{DQO}/g_{SV}) obtenida en este estudio es de 1.58, lo cual resulta inferior a lo reportado por Ossa (2020) y mayor a lo que reportan Figueroa (2018) y Campuzano (2015).

De la DQO total de la FORSU, el 38 % es soluble (540 g/kg_{SV}) y a su vez, el 51 % (275 g_{DQO}/kg_{SV} de la DQO soluble (DQO_S) corresponde a carbohidratos solubles en agua (CSA). Si bien estos últimos son de suma importancia, ya que corresponden a la fracción de sustrato primario disponible para la fermentación, a menudo el contenido de CSA no es un parámetro determinado en la caracterización de la FORSU. Para la FORSU de la Ciudad de México, solamente Campuzano (2015) determinó el contenido de carbohidratos, encontrando una concentración de carbohidratos solubles de 274 g_{DQO}/kg_{SV} siendo similar al valor de CSA en este estudio.

Dasgupta y Chandel (2020) reportan un contenido de CSA del 195 g/kg_{ST} en la FORSU de la ciudad de Bombay, India; siendo un valor similar al encontrado en la FORSU de la Ciudad de México (206 g/kg_{ST}). Campuzano y González-Martínez (2016), recopilaron datos de CSA de la FORSU en 6 ciudades de diferentes países, registrándose valores en un rango de 5.9 a 22 %_{SV}, equivalentes a 18.7 y 67 g/kg_{ST}, respectivamente. Estos valores se encuentran muy por debajo de lo medido en este estudio y lo reportado por Dasgupta y Chandel (2020).

Comparada con otros sustratos comúnmente ensilados para la producción de biogás, la FORSU posee un contenido de CSA similar al maíz, pasto y sorgo, los cuales poseen valores de CSA en rangos de 87 a 301, 29 a 210 y 100 a 200 g/kg_{ST}, respectivamente (Adesogan y Newman, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2010). El alto contenido de CSA en la FORSU resulta benéfico para el ensilado, puesto que se garantiza la disponibilidad de carbohidratos fermentables para los microorganismos y, por tanto, una rápida y alta producción de ácidos que reduzcan el pH en el ensilado.

6.1.2 Biodegradabilidad

Se determinó la biodegradabilidad anaerobia de la FORSU de la Ciudad de México mediante la prueba de potencial bioquímico de metano (PBM), resultando en un valor de 318 NL/kg_{SV}. Este valor es inferior al reportado por Campuzano y González-Martínez (2015), quienes para FORSU de la Ciudad de México registraron un potencial de producción de metano de 541 ± 14 NL/kg_{SV}. Esta notable diferencia se atribuye a la variación en las características del sustrato y de las condiciones experimentales en que se realizó la prueba (28 %_{ST} en este estudio). Campuzano y González-Martínez (2015) realizaron la prueba de PBM en condiciones húmedas, con FORSU a 3.5 %_{ST}. Así mismo, el valor de PBM de la FORSU en este estudio se encuentra por debajo del valor promedio de 415 ± 137.7 NL/kg_{SV} reportado por Campuzano y González-Martínez (2016) para 27 ciudades de 12 países. Sin embargo, se encuentra dentro de la desviación típica de los valores reportados.

Tal como es típico en las curvas de PBM de la FORSU reportada por otros autores, la curva en este estudio (Figura 6.1) mostró un comportamiento diáuxico, con una primera fase exponencial de producción de metano durante los primeros dos días ($m = 75$ NL/kg_{SV}·d). Esta etapa se estabilizó al día 5, acumulando en este periodo el 60 % del metano producido durante toda la prueba. De acuerdo con Campuzano (2015), la producción de metano en esta etapa se lleva a cabo por el consumo de la fracción de la FORSU fácilmente asimilable por los microorganismos.

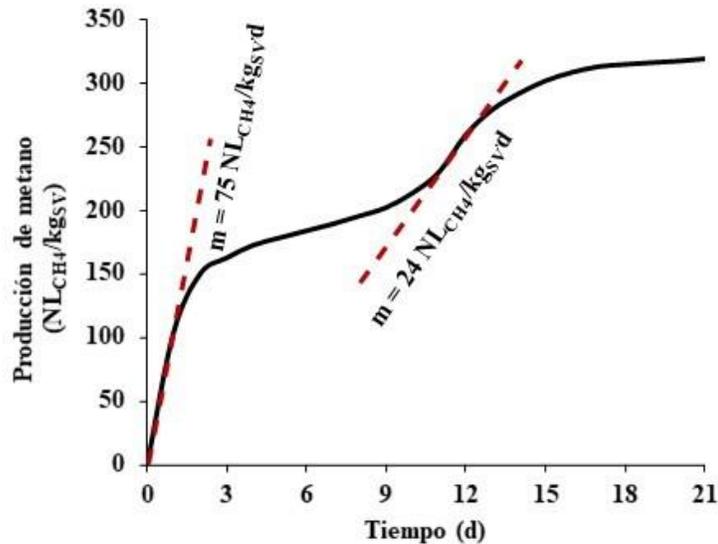


Figura 6.1 Potencial de producción de metano de la FORSU

Después de una fase estacionaria entre los días 5 y 11, en la que los microorganismos se adaptan a la fracción de sustrato de más difícil biodegradación (Campuzano, 2015), se observa una segunda fase exponencial producción de metano entre los días 11 y 13 ($m = 24 \text{ NL}/\text{kg}_{\text{SV}}\cdot\text{d}$) y se estabilizó hasta el día 17, habiéndose producido el 98 % del metano. A partir de entonces, la curva de producción de metano tuvo un comportamiento asintótico con una producción diaria menor al 1 % acumulado (Holliger *et al.*, 2016) y, por tanto, la prueba fue detenida.

Con base en la prueba de PBM, la FORSU posee una biodegradabilidad anaerobia cercana a otros sustratos comúnmente ensilados para la producción de biogás. Herrmann *et al.* (2011) determinaron el potencial de producción de metano para el maíz (329.9 NL/kg_{SV}), sorgo (317.1 NL/kg_{SV}), pasto forrajero (293.3 NL/kg_{SV}) e híbrido de trigo y centeno (339.5 LN/kg_{SV}). Comparado con los demás sustratos, el maíz ha sido de mayor uso en la digestión anaerobia gracias a que tiene el mayor rendimiento de materia seca por área cultivada (Mazurkiewicz *et al.*, 2019). No obstante, la producción de biogás basada a partir del maíz está siendo cuestionada debido a la aglutinación de las plantas de biogás junto con la alta cantidad de digestato y la contaminación resultante de las aguas superficiales y subterráneas, la emisión de gases contaminantes y los efectos perjudiciales del cultivo de maíz en la degradación de los suelos (Herrmann, 2012). En este contexto, la utilización de la FORSU para la producción de biogás presenta ventajas en cuanto a su disponibilidad en grandes cantidades, bajo costo y que no compite con el uso alimentario como es el caso del maíz (Tyagi *et al.*, 2018).

6.2 Fermentación de FORSU

Tal como se muestra en la Figura 6.2, durante el almacenamiento de la FORSU se mostraron dos fases bien definidas de fermentación: una fermentación principal o activa donde se transforman los compuestos orgánicos de fácil biodegradación, y una fermentación secundaria o estable que corresponde con la fermentación de compuestos orgánicos de difícil biodegradación. La fase de fermentación principal se caracterizó por una rápida producción de AGV y como consecuencia, una rápida disminución del pH y la disminución del contenido de materia orgánica (SV) asociada a la pérdida de carbono en el biogás producido durante la fermentación.

El pH registró una rápida disminución hasta un valor de 4.1 al día 6, estabilizándose posteriormente en valores cercanos a 4.3 durante el resto del experimento. El comportamiento inicial del pH es adecuado

para fines del ensilado de la FORSU, puesto que se crean condiciones de acidez suficientes para garantizar la inhibición de microorganismos indeseables durante el ensilado (Wang *et al.*, 2010).

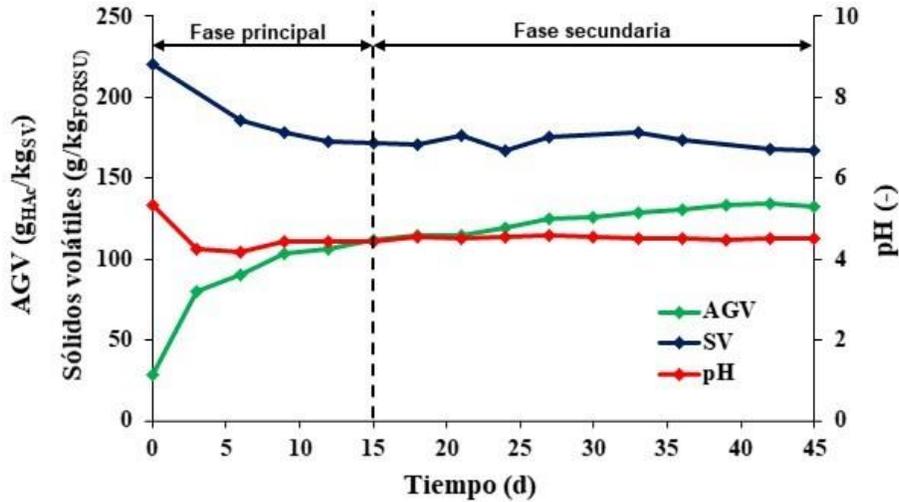


Figura 6.2 pH, AGV y sólidos volátiles durante el almacenamiento de la FORSU

Con respecto a la producción de AGV, durante todo el periodo de almacenamiento se observó un incremento sostenido de la concentración de AGV, registrándose durante los primeros 15 días las mayores tasas de producción. Por lo tanto, a partir de estos resultados, se definió el tiempo de 15 días como el parámetro a utilizar en los posteriores experimentos de ensilado de la FORSU. Así mismo, se determinó prescindir del uso de inóculo en el ensilado, considerando que la fermentación de la FORSU se produjo de manera efectiva por la microflora nativa.

6.3 Ensilado

6.3.1 Hidrólisis

La Figura 6.3 muestra que, en todos los casos de temperatura (20, 35 y 55 °C) y concentración de sólidos (10, 20 y 28 %_{ST}), la DQO soluble (DQO_S) disminuye rápidamente desde el primer día de ensilado. Esto se asocia a que, el oxígeno en el medio se agotó con mucha rapidez y, posteriormente el ensilado entró en la fase principal o de mayor intensidad de fermentación, en la cual el sustrato soluble es utilizado en gran medida para el crecimiento de los microorganismos (Dunière *et al.*, 2013, reduciendo la fracción de DQO soluble transformada a compuestos orgánicos).

A las tres temperaturas, a la menor concentración de sólidos (10 %_{ST}), se produjo la mayor disminución de la DQO_S. Sin embargo, a 35 y 55 °C la disminución fue más rápida que a 20 °C. Dicho comportamiento es consecuencia de que, tanto a bajas temperaturas como en condiciones de baja disponibilidad de agua (alta concentraciones de sólidos), el crecimiento microbiano es más lento (Kung, 2018). Según Abbassi-Guendouz *et al.* (2012), a altas concentraciones de sólidos, la transferencia de masa y el acceso de los microorganismos al sustrato es restringido, limitando el crecimiento celular.

Después de alcanzar un valor mínimo de DQO_S a 20 y 35 °C, para todas las concentraciones de sólidos se registró un aumento de la fracción soluble hasta estabilizarse durante el resto del tiempo de ensilado. Zhou *et al.* (2018) indican que, bajo condiciones de mucha acidez en el medio (valores de pH menores a 5.0), la actividad de la mayoría de los microorganismos hidrolíticos es inhibida y, por tanto, el aumento

de la DQO_s se asocia a la actividad de las enzimas ácido tolerantes (Figura 6.4). Según Oude *et al.* (2000), en ensilados ya acidificados, las enzimas ácido tolerantes son las responsables de la hidrólisis de carbohidratos estructurales y de almacenamiento.

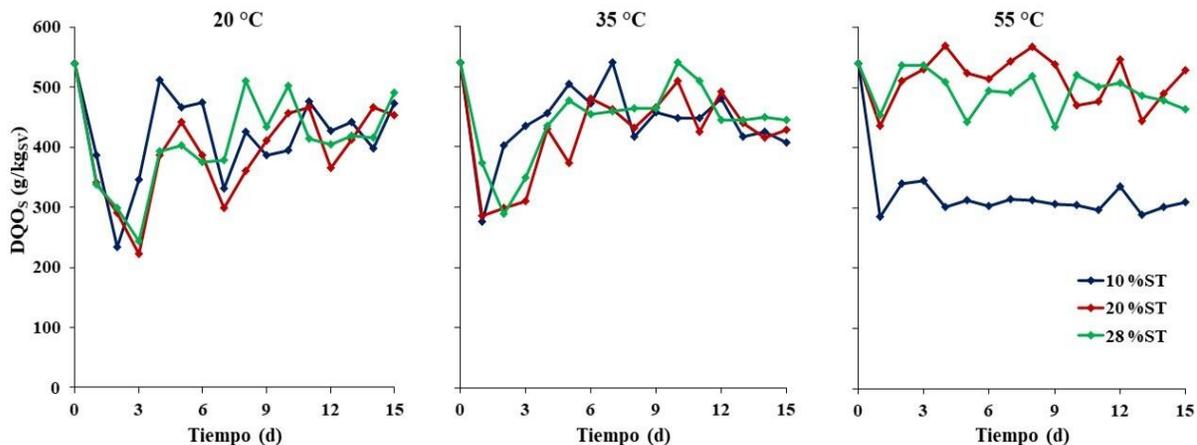


Figura 6.3 Comportamiento de la DQO soluble durante el ensilado de la FORSU

A 55 °C, la disminución de la DQO_s a altas concentraciones de sólidos fue considerablemente menor que la registrada para 20 y 35 °C. Esto sugiere un efecto combinado de la temperatura y la concentración de sólidos sobre la actividad microbiana. De acuerdo con Weinberg *et al.* (2001), el crecimiento de la mayoría de las bacterias acidolácticas y levaduras se ve fuertemente restringido a temperaturas mayores a 40 °C. A su vez, las altas concentraciones de sólidos limitan la accesibilidad de los microorganismos al sustrato. En el ensilado a 10 %_{ST}, inicialmente la DQO_s mostró una disminución en su valor similar a la registrada a 20 y 35 °C. Sin embargo, no se registró un posterior aumento, tal como sucedió a las temperaturas más bajas. Este comportamiento se explica en que, a una temperatura de 55 °C, la actividad de los microorganismos hidrolíticos se reduce drásticamente y a que, la temperatura no es lo suficientemente alta para producir una hidrólisis térmica del material particulado. De acuerdo con lo reportado por Buffière *et al.* (2018), para lograr una considerable desintegración térmica de la materia orgánica son necesarias temperaturas por encima de los 80 °C.

Finalmente, en todos los casos de temperatura y concentraciones de sólidos estudiadas, a partir del día 6 el ensilado la DQO_s registró valores relativamente estables. La alta variabilidad de la DQO_s en esta fase se atribuye a la heterogeneidad del sustrato y la complejidad de en el manejo y análisis de las muestras.

6.3.2 Fermentación

6.3.2.1 pH y producción total de metabolitos

La Figura 6.4 muestra el comportamiento del pH y la producción de metabolitos totales (ácido láctico, alcoholes y AGV) durante el ensilado de la FORSU a diferentes concentraciones de sólidos y temperaturas.

Ensilado a 20 °C. Según lo mostrado en la Figura 6.4, a esta temperatura el pH disminuyó de manera constante durante los primeros 8 días y luego se estabilizó en valores cercanos a 4. Se observaron valores de pH más altos a concentraciones de sólidos más altas. Durante los primeros 10 días, la producción total de metabolitos (como DQO) aumentó hasta alcanzar 220 g_{DQO}/kg_{SV} para 20 y 28 %_{ST}, mientras que para 10 %_{ST} la producción de metabolitos superó los 300 g_{DQO}/kg_{SV}.

Ensilado a 35 °C. A esta temperatura el pH disminuyó rápidamente durante los primeros dos días y luego se mantuvo estable cerca de 4 hasta el día 15. Al igual que con el ensilado a 20 °C, los valores de pH aumentaron con la concentración de sólidos. A 20 y 28 %_{ST} la producción de metabolitos aumentó rápidamente durante los primeros tres días para alcanzar valores de aproximadamente 220 g_{DQO}/kg_{SV}, similar al ensilado a 20 °C. Solo para el 10 %_{ST} la producción de metabolitos continuó aumentando hasta el día 6, para luego disminuir a valores entre 300 y 340 g_{DQO}/kg_{SV} hasta el final del experimento. En el ensilado a 35 °C la disminución del pH fue más rápida con respecto a 20 °C, debido a que, por efecto de una mayor temperatura la velocidad de las reacciones fermentativas es mayor.

Ensilado a 55 °C. El pH disminuyó lentamente de 5.5 hasta valor mínimo de 5.0 para 20 y 28 %_{ST}. Para 10 %_{ST} el pH disminuyó durante los primeros tres días y se estabilizó en valores cercanos a 4.5. Similar a las otras dos temperaturas, la concentración de sólidos más baja muestra la mayor producción de metabolitos. Sin embargo, la producción de metabolitos para 20 y 28 %_{ST} fue baja en comparación con las otras dos temperaturas, con valores estables entre 20 y 30 g_{DQO}/kg_{SV}. Lo anterior indica una fermentación limitada debido a que, a 55 °C no todos los microorganismos que componen la microflora nativa del sustrato pueden mantenerse activos (He *et al.*, 2012).

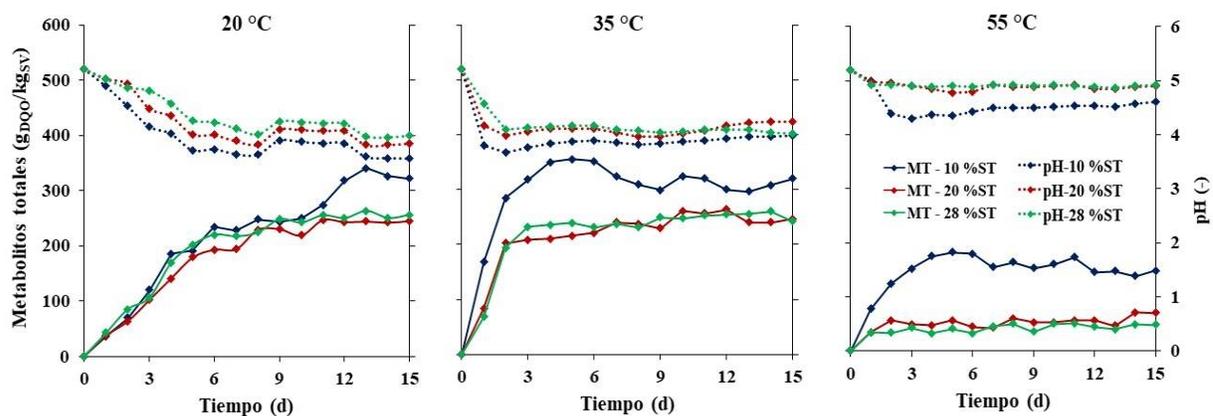


Figura 6.4 pH y producción de metabolitos (productos fermentativos)

Dado que el pH no fue controlado en ningún caso, a todas las temperaturas se registró una disminución del pH. A 20 y 35 °C, la caída del pH a valores por debajo de 4.0 fue causada por una mayor producción de ácido láctico, cuyo valor de pKa es 3.86. En la Figura 6.4 puede observarse la relación de la disminución del pH con la temperatura y la concentración de sólidos del ensilado. A 20 y 35 °C; se observa que, independientemente de que las concentraciones al final del ensilado son similares a las dos temperaturas, a 20 °C el valor del pH fue más bajo que a 35 °C. Dicho comportamiento puede explicarse en que, a temperaturas más bajas aumenta la solubilidad del CO₂ producido durante la fermentación, contribuyendo así con la disminución del pH en el medio. El mismo efecto es informado por Weinberg *et al.* (2001), quienes ensilaron maíz y trigo a 37 y 41 °C y encontraron que, a temperaturas más bajas, la fracción de CO₂ soluble en el agua aumentó y el pH resultó en valores más bajos. Con respecto a la concentración de sólidos, el pH disminuyó más en los ensilados con la menor concentración de sólidos, lo cual se corresponde con producción de metabolitos más alta. Según García-Bernet *et al.* (2011), cuando la concentración de sólidos es baja, la disponibilidad del agua en el medio aumenta, aumentando con ella la actividad microbiana y, por tanto, la producción de metabolitos.

En cuanto a la efectividad del ensilaje, una rápida disminución del pH es deseable. A valores de pH bajos y, si se mantienen las condiciones anaerobias, el crecimiento de todos los microorganismos, incluidas las bacterias del ácido láctico (BAL) es inhibido y el ensilado entra en una fase estable más rápidamente permitiendo la conservación de los sustratos (McAllister y Hristov, 2000). Con base en lo anterior puede

señalarse que, de las condiciones evaluadas durante el ensilado de la FORSU, a temperatura media (35 °C) y bajas concentraciones de sólidos (10 %_{ST}) el ensilado es más efectivo, ya que se alcanzan más rápidamente las condiciones de acidez necesarias para preservar el sustrato.

6.3.2.2 Grado de fermentación (η_f)

A partir de la DQO soluble (Figura 6.3) y de las concentraciones de metabolitos totales (Figura 6.4) se procedió a calcular el grado de fermentación en cada uno de los ensilados. El grado de fermentación representa la fracción de compuestos solubles del sustrato que son transformados mediante procesos fermentativos. Este parámetro es importante para evaluar el consumo y disponibilidad del sustrato soluble durante el ensilado y, por tanto, la posibilidad de que los procesos fermentativos continúen teniendo lugar. Según lo mostrado en la Figura 6.5, a 20 °C la fase principal de fermentación se extendió hasta el día 8, representando los metabolitos de la fermentación aproximadamente el 90 % de la DQO_s en los ensilados con 10 y 20 %_{ST}. Para 28 %_{ST} el grado de fermentación no superó el 80 %.

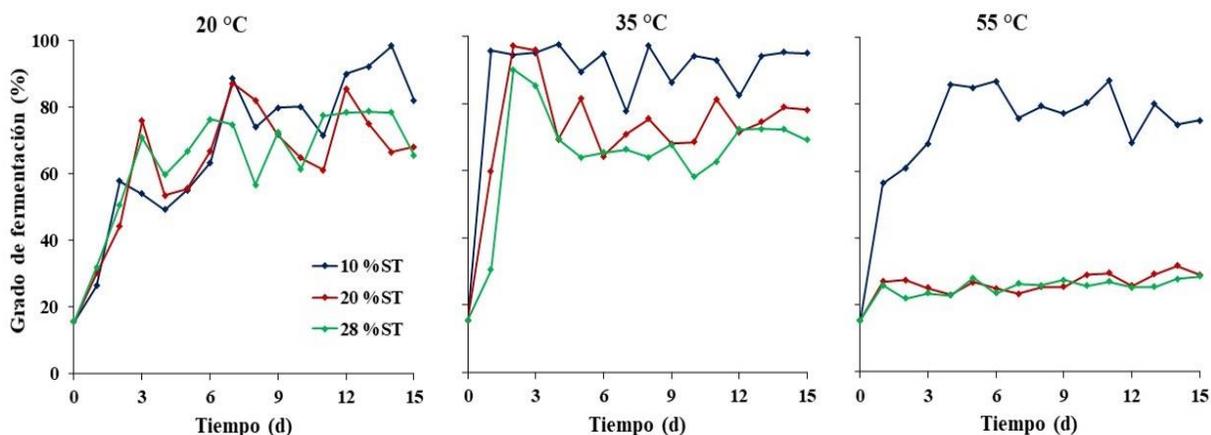


Figura 6.5 Grado de fermentación (η_f) de la FORSU

A 35 °C, la fase principal de fermentación se produjo durante los dos primeros días, observándose que en este periodo que los metabolitos, producto de la fermentación, representaron casi la totalidad de la DQO_s. Al igual que a 20 °C; el mayor grado de fermentación se registró para 10 y 20 %_{ST}. A partir del día 2, el grado de fermentación a 10 %_{ST} se mantuvo relativamente estable por encima de 90 %, mientras que para 20 y 28 %_{ST}, disminuyó manteniéndose variable entre 60 y 80 %. Lo anterior es indicativo de que, a las mayores concentraciones de sólidos, la transferencia de masa se ve afectada, limitando el contacto entre microorganismos, enzimas y sustrato. Un comportamiento similar al de este trabajo es reportado por Gameiro *et al.* (2016), quienes evaluaron la influencia de la concentración de sólidos y la alcalinidad sobre la fermentación de la FORSU. La fermentación se realizó a 25 °C y a concentraciones de sólidos de 5, 8 y 10 %. Los autores concluyeron que el grado fermentación está fuertemente influenciado por la concentración de sólidos y que el aumento del contenido de ST condujo a una disminución del grado de fermentación.

A 55 °C, solamente para 10 %_{ST} se registró un aumento considerable del grado de fermentación, alcanzando un poco más del 80 % al día 4. Para 20 y 28 %_{ST} el grado de fermentación no superó el 30 %, indicando tanto la actividad fermentativa estuvo muy limitada tanto, por la temperatura como por las altas concentraciones de sólidos.

Antes y al final del experimento se determinó la concentración de carbohidratos solubles en agua (CSA) en la FORSU (Tabla 6.2). A 20 y 35 °C, en todos los ensilados se detectó un remanente de CSA entre el

3 y 8 % de la concentración inicial. Solamente para 20 °C y 10 %_{ST} no se detectaron CSA en el producto ensilado. El hecho de que a 20 y 55 °C se lograron altos grados de fermentación y que adicionalmente se encontraron CSA residuales en los ensilados, indica que la concentración inicial de carbohidratos fermentables en la FORSU es suficiente para garantizar el crecimiento microbiano durante la fase principal de fermentación y que la actividad hidrolítica de las enzimas ácido tolerantes fuera posible. Al comparar entre 20 y 35 °C, es notorio que, aunque a ambas temperaturas se alcanzan remociones de CSA similares, los grados de fermentación fueron mayores a 35 °C que a 20 °C (Figura 6.5). Lo anterior indica que a 20 °C solamente la fracción de CSA fue fermentada, mientras que a 35 °C tanto los carbohidratos como otros compuestos solubles (lípidos y proteínas) también fueron utilizados como sustrato para la fermentación.

Tabla 6.2 Carbohidratos solubles en agua (CSA) antes y después del ensilado

| Temperatura | Concentración de sólidos (% _{ST}) | Grado de fermentación (η_f) | CSA (g _{DQO} /kg _{SV}) | | Variación (%) |
|-------------|---|------------------------------------|---|----------------------------|---------------|
| | | | FORSU Antes del ensilado | FORSU después del ensilado | |
| 20 °C | 10 | 82 | 244 | 0 | -100 |
| | 20 | 68 | 252 | 12 | -95 |
| | 28 | 66 | 262 | 18 | -93 |
| 35 °C | 10 | 95 | 249 | 12 | -95 |
| | 20 | 78 | 251 | 8 | -97 |
| | 28 | 69 | 261 | 12 | -95 |
| 55 °C | 10 | 75 | 249 | 277 | +11 |
| | 20 | 29 | 251 | 262 | +4 |
| | 28 | 28 | 261 | 270 | +3 |

El valor del grado de fermentación (η_f) corresponde al final del ensilado.

Contrario a lo observado a las temperaturas más bajas, a 55 °C la concentración de CSA registró un aumento para todas las concentraciones de sólidos, siendo el más significativo a 10 %_{ST}. Resultados similares reportan Kim y Adesogan (2006) quienes luego de ensilar maíz a diferentes temperaturas encontraron que a mayor temperatura la concentración de CSA residuales fue mayor. Dicho incremento es atribuido a que, a temperatura más alta la fermentación es reducida por la disminución de bacterias ácido lácticas activas. Colombatto y Mould (2004) encontraron que, el aumento de la temperatura de 20 a 40 °C durante el ensilado de maíz redujo el contenido de compuestos lignocelulósicos y aumentó el contenido de carbohidratos solubles, lo cual se corresponde con los resultados encontrados en este estudio.

6.3.2.3 Cinética de la fermentación

La producción de metabolitos totales (Figura 6.6) fue ajustada utilizando los modelos de Tessier y Monod. A fin de determinar la constante de velocidad de fermentación (producción de los metabolitos totales), el ajuste se realizó para la fase de producción exponencial de metabolitos para las diferentes temperaturas y concentraciones de sólidos evaluadas.

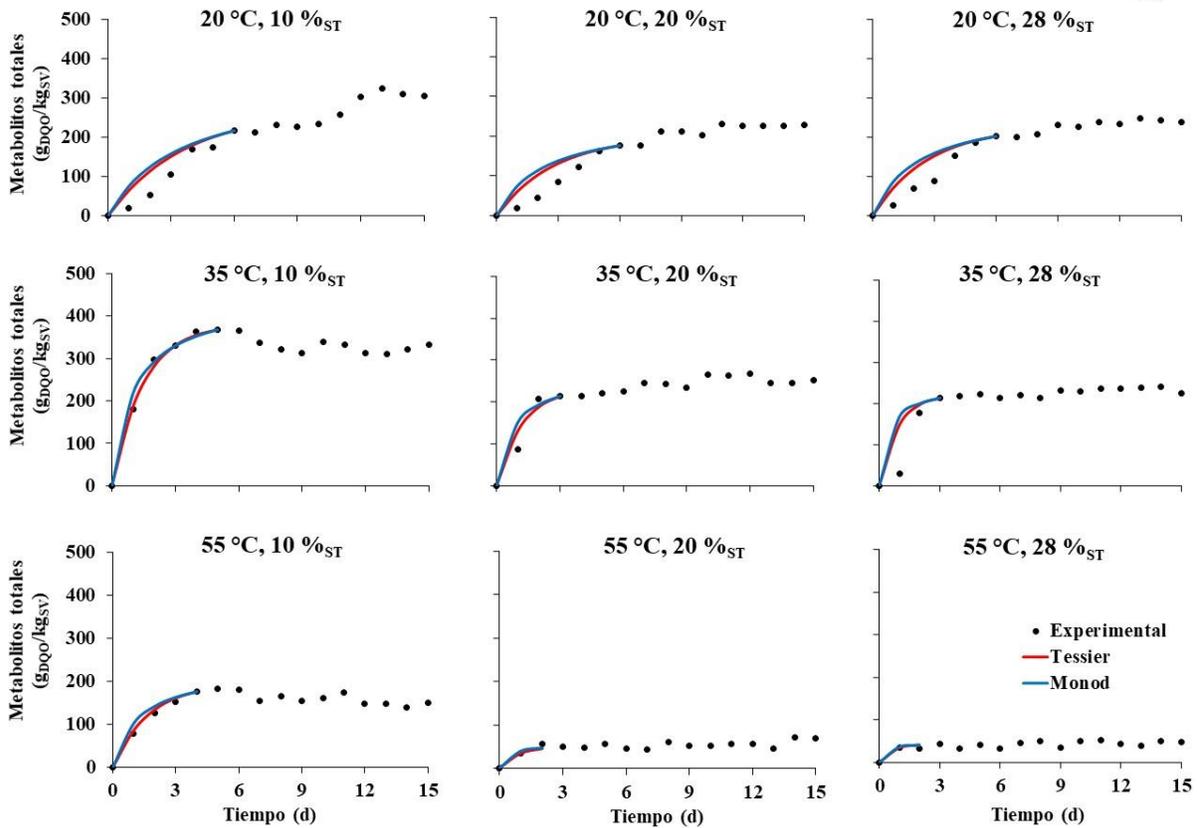


Figura 6.6 Ajuste de los modelos de Tessier y Monod para producción de metabolitos totales

En la Tabla 6.3 se muestran los valores de las constantes de velocidad para cada modelo y su respectivo coeficiente de correlación (R^2), observándose que en todos los casos los datos experimentales tienen un mejor ajuste con el modelo de Tessier. Esto se debe a que, a diferencia del modelo tipo Monod, el modelo de Tessier sí tiene en cuenta la energía de mantenimiento para la actividad celular, lo cual implica que a medida que la concentración de sustrato disminuye y los microorganismos compiten por él, la producción de los metabolitos disminuye. Esta es la razón por la cual, en el segmento de transición de alta a baja concentración, la curva del modelo de Tessier se encuentra siempre por debajo de la curva del modelo tipo Monod.

Para todas las temperaturas, los valores de las constantes de velocidad muestran una relación proporcional con la concentración de sólidos; cuando aumenta la concentración de sólidos aumenta también la constante de velocidad de producción de los metabolitos. Lo anterior se explica en que, si bien a mayores ST las concentraciones máximas de metabolitos totales fueron menores, la producción diaria fue mayor.

Respecto a la temperatura, las constantes de velocidad de producción de metabolitos también mostraron un aumento proporcional a la temperatura; a mayor temperatura, mayores valores de las constantes de velocidad. Este es un efecto esperado, dado que con el aumento de la temperatura las reacciones biológicas y químicas se producen con mayor rapidez (Al Seadi *et al.*, 2008).

Para describir mejor la relación de la temperatura y las constantes de velocidad de fermentación de la FORSU se hizo uso de la ecuación de Arrhenius.

$$K = Ae^{-\frac{E}{RT}}$$

Ecuación 6.1

Donde E = energía de activación (KJ/mol)

A = frecuencia de colisión entre las partículas o factor pre exponencial

K = constante de velocidad

R = constante de los gases ideales (0.00831 KJ/mol·K)

T = temperatura (°K)

Tabla 6.3 Constantes de velocidad de producción de metabolitos totales

| Temperatura (°C) | Concentración de sólidos (% _{ST}) | Modelo | | | |
|------------------|---|----------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| | | Tessier | | Monod | |
| | | K (d ⁻¹) | R ² | K _s (d ⁻¹) | R ² |
| 20 | 10 | 0.280 | 0.8771 | 3.5 | 0.8216 |
| | 20 | 0.359 | 0.9262 | 2.3 | 0.8810 |
| | 28 | 0.416 | 0.8864 | 2.2 | 0.8354 |
| 35 | 10 | 0.674 | 0.9976 | 1.0 | 0.9868 |
| | 20 | 0.812 | 0.9377 | 0.8 | 0.8888 |
| | 28 | 1.111 | 0.7582 | 0.5 | 0.6842 |
| 55 | 10 | 0.586 | 0.9957 | 1.3 | 0.9771 |
| | 20 | 1.176 | 0.9595 | 0.4 | 0.9387 |
| | 28 | 1.620 | 0.9667 | 0.2 | 0.9735 |

Con la linealización de la ecuación de Arrhenius se determinó la energía de activación para la fermentación de la FORSU a las diferentes concentraciones de sólidos. En la ecuación linealizada, la pendiente de la recta representa el término (-E/R), mientras la ordenada al origen representa el lnA, permitiendo también determinar el valor de la frecuencia de colisión.

$$\ln K = \left(-\frac{E}{R}\right)\frac{1}{T} + \ln A$$

Ecuación 6.2

A partir de los valores de temperatura de ensilado y las constantes de velocidad obtenidas con el modelo de Tessier se procedió a la linealización de la ecuación de Arrhenius. Se utilizaron las constantes de velocidad obtenidas del modelo de Tessier puesto que fue el modelo al que mejor se ajustaron los datos experimentales. Los valores de los términos lnK y 1/T calculados para la linealización de la ecuación de Arrhenius se muestran en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Valores de lnK y 1/T para linealización de la ecuación de Arrhenius

| Temperatura | | 1/T (K ⁻¹) | K (d ⁻¹) | | | lnK | | |
|-------------|-----|------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| °C | °K | | 10 % _{ST} | 20 % _{ST} | 28 % _{ST} | 10 % _{ST} | 20 % _{ST} | 28 % _{ST} |
| 20 | 293 | 0.00341 | 0.280 | 0.359 | 0.416 | -1.3 | -1.0 | -0.9 |
| 35 | 308 | 0.00324 | 0.674 | 0.812 | 1.111 | -0.4 | -0.2 | 0.1 |
| 55 | 328 | 0.00304 | 0.586 | 1.176 | 1.620 | -0.2 | 0.2 | 0.5 |

Los términos $\ln K$ y $1/T$ de la ecuación de Arrhenius y las respectivas líneas de tendencia para las diferentes concentraciones de sólidos en las que se ensiló la FORSU se muestran en la Figura 6.7. A partir de la ecuación de la recta para cada concentración de sólidos se calcularon los valores de la energía de activación y la frecuencia de colisión para las tres concentraciones de sólidos a las que fue ensilada la FORSU (Tabla 6.5).

De la Figura 6.7 puede observarse que a mayor concentración de sólidos aumenta la pendiente de la línea de tendencia, lo cual resulta en una mayor energía de activación para las reacciones de fermentación (Tabla 6.5) y una menor frecuencia de colisión entre el sustrato y los microorganismos. Dicho fenómeno es consistente con lo reportado por diversos autores (García-Bernet *et al.*, 2011; Abbassi - Guendouz *et al.*, 2012) en cuanto a que, a altas concentraciones de sólidos, la transferencia de masa se ve limitada y se dificulta el acceso de los microorganismos al sustrato.

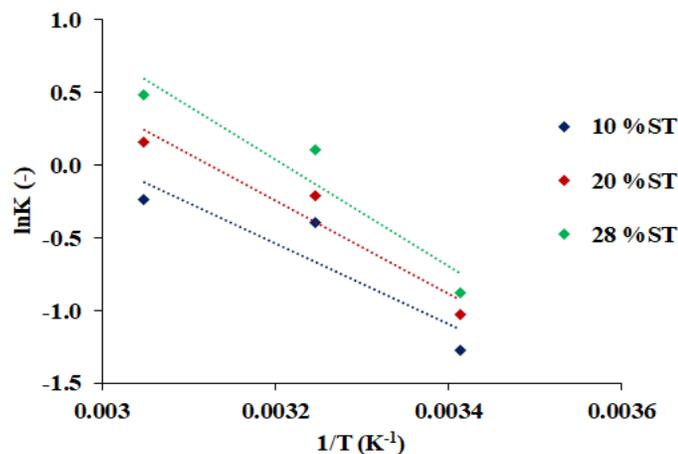


Figura 6.7 Linealización de la ecuación de Arrhenius para diferentes concentraciones de sólidos

Tabla 6.5 Energía de activación y frecuencia de colisión para reacciones de fermentación de la FORSU

| % _{ST} | - E/R | lnA | E (KJ/mol) | A (KJ/mol) |
|-----------------|---------|--------|------------|------------|
| 10 | -2769.2 | 8.3257 | 23.0 | 0.4718 |
| 20 | -3215.3 | 10.049 | 26.7 | 0.4334 |
| 28 | -3675.5 | 11.798 | 30.5 | 0.4052 |

Finalmente, se graficaron los valores de la energía de activación y de concentración de sólidos (Figura 6.8) a fin de obtener un modelo que permita predecir la energía de activación requerida para la fermentación de la FORSU en función de la concentración de sólidos durante el ensilado.

El modelo obtenido de la Figura 6.8 indica que la energía de activación para la fermentación de la FORSU guarda una relación lineal con la concentración de sólidos, de modo tal que, a menor concentración de sólidos disminuye la energía requerida para que las reacciones de fermentación se produzcan. Dicha relación se sustenta en que, a menor concentración de sólidos, el agua en el medio actúa como un agente diluyente que permite un aumento en la interacción (frecuencia de colisión en la ecuación de Arrhenius) entre las partículas de sustrato y los microorganismos, dando lugar a una mayor rapidez de la fermentación.

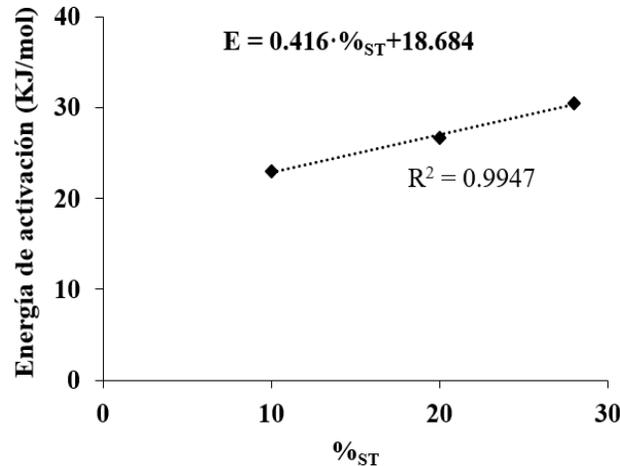


Figura 6.8 Relación de la energía de activación y la concentración de sólidos durante la fermentación de la FORSU

6.3.2.4 Producción de metabolitos

➤ Ácido láctico

El ácido láctico (AL) fue el principal metabolito producido a las tres temperaturas, indicando el dominio de las bacterias del ácido láctico (BAL) en la comunidad microbiana nativa de la FORSU. La mayor concentración de ácido láctico se registró a la menor concentración de sólidos (10 %_{ST}) en las tres temperaturas, con concentraciones máximas de 230, 240 y 115 g_{DQO}/kg_{SV} (SV alimentados), para 20, 35 y 55 °C, respectivamente (Figura 6.9). Si bien, a 20 y 35 °C se alcanzaron concentraciones máximas de ácido láctico similares, es notorio el efecto de la temperatura sobre una mayor rapidez de producción a 35 °C que a 20 °C. Lo anterior indica que, aunque la temperatura influyó sobre las tasas de producción del ácido láctico, en todos los casos la fermentación láctica fue predominante el ensilado.

En la FORSU fresca el ácido láctico representa el 61 % de los metabolitos totales. Posteriormente, para cada condición de ensilado la concentración de ácido láctico fue variable (Figura 6.9), variando también la fracción representada por este metabolito respecto a la concentración de metabolitos totales (Figura 6.4).

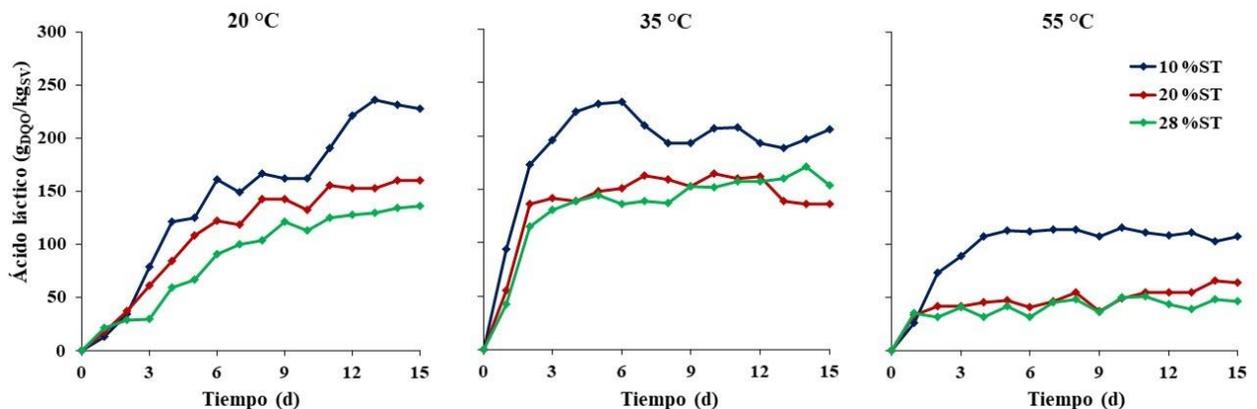


Figura 6.9 Producción de ácido láctico (AL)

A 35 °C, la concentración de ácido láctico al 10 %_{ST} alcanzó su valor máximo de 240 g_{DQO}/kg_{SV} al día 6 y posteriormente registró una disminución en su concentración variando entre 200 y 215 g_{DQO}/kg_{SV} hasta el final del ensilado. Dicha disminución es asociada con una fermentación butírica, en la cual dos moles de ácido láctico son necesarias para producir 1 mol de ácido butírico: $2 \text{ ácido láctico} \rightarrow 1 \text{ ácido butírico} + 2\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$. Esta fermentación tiene un efecto negativo sobre la calidad del ensilado debido a que, en primer lugar, por la producción de ácido butírico, el cual al ser un ácido más débil que el ácido láctico conduce a un aumento en el pH. Así mismo, la producción de H₂ y CO₂ resulta en pérdidas de energía y materia orgánica. Según Pahlow *et al.* (2003) los efectos de la actividad de los clostridios sobre la calidad del ensilado generalmente ocurren mucho después de que las bacterias del ácido láctico han dejado de crecer activamente en el ensilado; lo cual, en el presente estudio explica la disminución del ácido láctico al final del tiempo de ensilado.

A 55 °C la producción de ácido láctico fue considerablemente inferior que a 20 y 35 °C, debido a que a temperaturas mayores a 50 °C el crecimiento de las BAL es fuertemente restringido (McDonald *et al.*, 1991). El rango óptimo de temperatura para el crecimiento de las LAB varía entre 27 y 38 °C (Yamamoto *et al.*, 2011). El efecto de una menor producción de ácido láctico a temperaturas altas también es reportado por Kim y Adesogan (2006), quienes al ensilar maíz a 40 y 20 °C registraron que a la mayor temperatura la producción de ácido láctico se redujo más del 40 %.

Con respecto a la concentración de sólidos, a 20 °C la producción de ácido láctico aumentó a las menores concentraciones de sólidos. Por su parte, a 35 y 55 °C, la producción de ácido láctico para las concentraciones de sólidos de 20 y 28 %_{ST} resultó en valores similares entre sí. Contrario a los resultados de este estudio, Kim y Adesogan (2006) reportan que, durante el ensilado de maíz a 40 °C, con el aumento de la concentración de sólidos de 30 a 35 %, la producción de ácido láctico disminuyó 10 %.

Si bien el ácido láctico es un metabolito viable para la formación de metano, la metanización de un sustrato previamente sometido a una fermentación láctica puede verse inhibida debido al bajo valor de pH y a que, durante la metanogénesis el ácido láctico puede ser fácilmente convertido a propionato, el cual es un metabolito con alto potencial inhibitorio de la actividad metanogénica (Wang *et al.*, 2014).

➤ Etanol

El etanol constituyó la segunda mayor fracción de metabolitos producidos a las tres temperaturas, aunque con variaciones en el comportamiento con respecto a la concentración de sólidos en el ensilado (Figura 6.10).

A 20 °C, la mayor producción de etanol se registró el día 7 para la FORSU con 28 %_{ST}. La concentración máxima fue de 100 g_{DQO}/kg_{SV}, y se mantuvo constante hasta el día 15. Según Chandler (1988), bajo las condiciones de menor humedad, la actividad de las levaduras se ve favorecida con respecto a las bacterias (Chandler, 1988), lo cual explica la mayor producción de etanol a 28 %_{ST}. Para 10 y 20 %_{ST}, las concentraciones más altas se alcanzaron el día 12 y 8, respectivamente, con valores de 60 g_{DQO}/kg_{SV}. Dicho comportamiento se asocia con que a 20 °C la disminución del pH fue gradual dando lugar al crecimiento de levaduras y, por tanto, la producción de etanol fue posible a partir de dos rutas fermentativas: 1) Fermentación heteroláctica, donde, además de ácido láctico, también se producen etanol y ácido acético. 2) Fermentación alcohólica, cuyo principal metabolito es el etanol. Con respecto a la actividad de las levaduras en los ensilados, Zhou *et al.* (2016) reportan que aún a bajos pH, las bajas temperaturas favorecen indirectamente la supervivencia de la levadura al permitir un metabolismo más lento y una permeabilidad reducida de la membrana celular a los ácidos orgánicos, protegiéndolas de ser inhibidas.

A diferencia de los resultados a 20 °C, la producción más alta de etanol a 35 °C se registró el día 4 con 105 g_{DQO}/kg_{SV} a la concentración de sólidos más baja (10 %_{ST}). Al comparar entre las temperaturas de 20 y 35 °C, es notable que, a la mayor temperatura, la fase principal de producción de etanol se produjo durante los primeros 3 días de ensilado independientemente de la concentración de sólidos, mientras que a 20 °C fue de 5 días para 28 %_{ST} y de 13 días para 10 y 20 %_{ST}. Al igual que 20 °C, a 35 °C, la producción de etanol puede asociarse tanto a una fermentación heteroláctica como una alcohólica. Aunque se sabe que los ambientes ácidos anaerobios, como los ensilados, son en principio hostiles para las células de levadura, Pahlow *et al.* (2003) informa que, incluso a valores de pH bajos y siempre que haya disponibilidad suficiente de carbohidratos solubles, algunas especies de levaduras pueden desarrollarse, siendo la causa de la mayoría de los ensilados con alto contenido de etanol.

A 55 °C, debido a la inactivación de las levaduras a esta temperatura, la producción de etanol fue significativa solo en el ensilado a 10 %_{ST}, con una concentración máxima de 31 g_{DQO}/kg_{SV}. Ese valor es 50 % menor al registrado a 20 °C y 70 % menor al de 35 °C. Según Walker y Walker (2018), el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de las levaduras se encuentra entre 25 y 30 °C. Estos resultados concuerdan con las conclusiones de McDonald *et al.* (1991) quienes reportan que por encima de 40 °C la mayoría de las levaduras se inactivan.

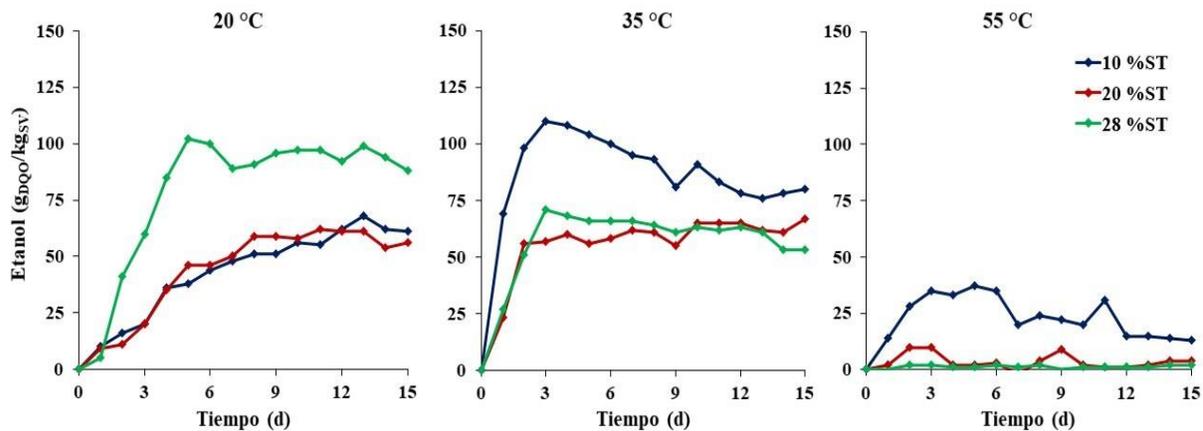


Figura 6.10 Producción de etanol

La producción de etanol en grandes cantidades durante el ensilado tiene efectos positivos para la producción de metano. Según Zhao *et al.* (2016), durante la metanización, el etanol tiene un alto potencial para evitar el consumo de la alcalinidad del sistema y, por tanto, su capacidad amortiguadora, ya que una fracción importante del carbono del sustrato se convierte en etanol y no en AGV. Por su parte, Wu *et al.* (2015) afirman que, termodinámicamente, una fermentación orientada a la producción de etanol permite a los microorganismos metanogénicos una mejor recuperación energética.

➤ Ácidos grasos volátiles

El comportamiento en la producción de AGV totales fue variable para las tres temperaturas (Figura 6.11). En todos los casos se detectó ácido acético y propiónico, mientras que el ácido butírico solo fue detectado en el ensilado a 10 %_{ST} y 35 °C. Para todas las concentraciones de sólidos evaluadas el ácido acético fue el tercer metabolito con la mayor concentración después del ácido láctico y el etanol.

A 20 °C, de los tres AGV probados, solo se detectó ácido acético en las tres concentraciones de sólidos evaluadas y no se observaron diferencias significativas entre ellas. Se observaron concentraciones de 19, 18 y 21 g_{DQO}/kg_{SV} para los reactores con 10, 20 y 28 %_{ST}, respectivamente. Estas concentraciones

representan entre el 6 y el 8 % de los metabolitos totales producidos, bastante superiores a los valores entre el 1 y el 3 % reportados para ensilados por Kung *et al.* (2018).

A 35 °C, se detectaron concentraciones de ácido acético más altas que a 20 °C. La concentración más alta de ácido acético fue 50 g_{DQO}/kg_{SV} a 20 %_{ST}, mientras que a 10 y 28 %_{ST}, las concentraciones máximas fueron 33 y 22 g_{DQO}/kg_{SV}, respectivamente. A 20 %_{ST} se notó una segunda fase de producción de ácido acético, la primera durante los primeros dos días de ensilado y la segunda a partir del día 7. Mientras la primera fase se asocia con una fermentación heteroláctica, la segunda fase se asocia con la acetogénesis a partir de etanol y ácido láctico, dado que mientras la concentración de ácido acético aumentó el ácido, las de etanol (Figura 6.10) y ácido láctico (Figura 6.9) disminuyeron. A partir del día 6 se detectó ácido propiónico a 10 y 20 %_{ST}, en ambos casos aumentando su concentración a 5 g_{DQO}/kg_{SV} al día 15. El hecho de encontrar pequeñas cantidades de ácido propiónico en el ensilado no necesariamente indica que su producción se deba a la actividad de propionibacterias, ya que bacterias como *Clostridium propionicum* también producen ácido propiónico como el principal producto final de la fermentación, y muchas otras bacterias también pueden excretar pequeñas cantidades de propionato (Pahlow *et al.*, 2003). Se ha reportado que a valores de pH por debajo de 4.8, las bacterias propiónicas son inhibidas (Pahlow y Honig, 1993), el cual es el caso del presente estudio. El ácido butírico se detectó solo al 10 %_{ST}, con un máximo de 4.0 g_{DQO}/kg_{SV}. La presencia de ácido butírico se asocia con un proceso de fermentación butírica usando como sustrato el ácido láctico, y es un indicador de actividad de clostridios en el ensilado.

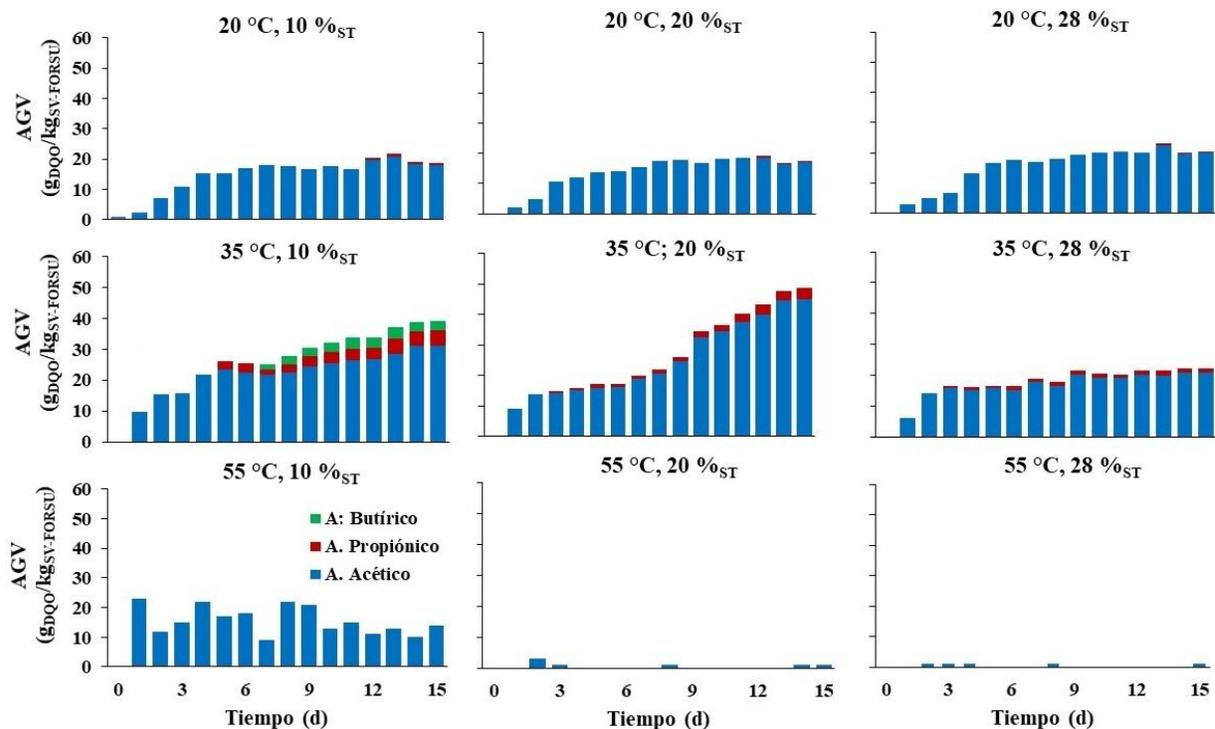


Figura 6.11 Producción de AGV

A 55 °C, el ácido acético fue el único AGV detectado. Se registraron concentraciones variables de este ácido sólo en el ensilaje al 10 %_{ST}, siendo la máxima concentración de 23 g_{DQO}/kg_{SV}. En este caso, la producción de ácido acético se asocia solamente con una fermentación heteroláctica, ya que, a esta temperatura las bacterias del ácido acético son inhibidas (McDonald *et al.*, 1991). El ácido propiónico no fue detectado en el ensilado a 55 °C, debido a las condiciones de temperatura y acidez que no favorecen su producción. La temperatura óptima de crecimiento para las bacterias propiónicas oscila entre 25 y 32 °C, y el pH óptimo está entre 6.5 y 7.0 (Gautier, 2014).

6.3.2.5 Rapidez de producción de metabolitos

Las tasas máximas de producción de metabolitos totales y de los tres metabolitos primarios se evaluaron en función de la concentración de sólidos y la temperatura de la fermentación durante el ensilado. A partir de las curvas de producción, se calcularon las velocidades iniciales máximas para los metabolitos totales, ácidos acético y láctico, y etanol (Figura 6.12). La mayoría de las velocidades más altas se detectaron al comienzo de cada reacción.

La producción de metabolitos totales presenta tasas similares a 20 y 55 °C (25 - 45 g_{DQO}/kg_{SV}·d), mientras que, a 35 °C, las tasas aumentan significativamente a valores entre 85 y 130 g_{DQO}/kg_{SV}·d, donde claramente, las tasas aumentan inversamente proporcional con la concentración de sólidos. Para el ácido láctico, las tasas muestran valores cercanos a 20 g_{DQO}/kg_{SV}·d a 20 °C y aumentan tres veces a 35 °C. A 55 °C, los valores de velocidad disminuyen a aproximadamente 35 g_{DQO}/kg_{SV}·d. Las tasas de producción de etanol son bajas a 20 °C, aumentan de 20 a 35 g_{DQO}/kg_{SV}·d a 35 °C y disminuyen a 55 °C (menores a 20 g_{DQO}/kg_{SV}·d). Para el ácido acético, las tasas de producción de ácido acético a 20 y 55 °C son casi nulas, pero, a 35 °C, alcanzan valores entre 42 y 55 g_{DQO}/kg_{SV}·d, lo que indica una clara preferencia de los microorganismos por 35 °C.

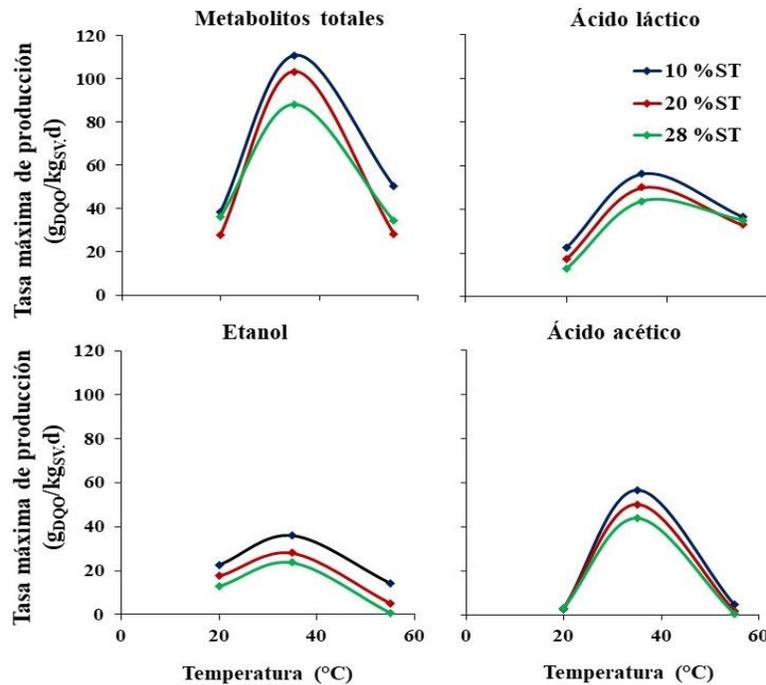


Figura 6.12 Tasas máximas de producción de metabolitos

Para los metabolitos totales y los individuales, las tasas de producción son mayores a 35 °C y varían inversamente proporcional con la concentración de sólidos. El aumento de las tasas de producción máxima de los metabolitos no presenta un crecimiento lineal con respecto a la temperatura, pues a 55 °C resultan fuertemente disminuidas en comparación con 35 °C. Este comportamiento refleja el efecto típico de la temperatura sobre la actividad enzimática, en la que por encima de una temperatura óptima (35 °C en este caso), se produce la desnaturalización o inactivación de las enzimas (Daniel y Danson, 2010).

6.3.3 Pérdida de materia orgánica

De acuerdo con Buffière *et al.* (2018), la pérdida de materia orgánica en los ensilados puede producirse por los procesos bioquímicos de la fermentación o por lixiviación durante el ensilado. Dado que el presente estudio se realizó en un sistema cerrado, donde el lixiviado no fue extraído, las pérdidas de materia orgánica se asocian exclusivamente a los procesos fermentativos. Según el proceso fermentativo llevado a cabo, además de los metabolitos principales, también tiene lugar a la formación de subproductos como el dióxido de carbono e hidrógeno (Luo *et al.*, 2011), los cuales son liberados en forma de biogás.

En la Tabla 6.6 se muestra la pérdida de materia orgánica (SV), durante el ensilado de la FORSU en función de la temperatura y la concentración de sólidos. A 20 °C las pérdidas de materia orgánica fueron mayores a 10 %_{ST} (13 %), mientras que entre 20 y 28 %_{ST} no se registraron grandes diferencias, con pérdidas de 5 y 3 %, respectivamente. Este comportamiento es coherente con el grado de fermentación (Figura 6.5) alcanzado durante el ensilado, de modo que la pérdida de materia orgánica es proporcional al grado de fermentación. A 35 °C, la pérdida de materia orgánica tuvo un comportamiento diferente al de 20 °C, siendo mayor la pérdida de materia orgánica a 20 %_{ST} con 21%, seguida de 10 y 28 %_{ST}; con reducciones de SV del 10 y 6 %, respectivamente.

Tabla 6.6 Reducción de sólidos volátiles durante el ensilado

| Temperatura (°C) | Concentración de sólidos (%) | Reducción de SV (%) |
|------------------|------------------------------|---------------------|
| 20 | 10 | 13 |
| | 20 | 5 |
| | 28 | 3 |
| 35 | 10 | 10 |
| | 20 | 21 |
| | 28 | 6 |
| 55 | 10 | 4 |
| | 20 | 0 |
| | 28 | 0 |

La producción de metabolitos a 20 como a 35 °C se asocia con fermentaciones heteroláctica y alcohólica. Según Borreani *et al.* (2018), en ambas rutas fermentativas se producen pérdidas de materia orgánica por la producción de CO₂. Dichos autores afirman que cuando tienen lugar fermentaciones heterolácticas y alcohólicas, las pérdidas de materia orgánica (SV) pueden alcanzar entre 24 y 49 %, respectivamente. Kung (2018) plantea que, en un ensilado efectivo las pérdidas totales de materia seca deben situarse por debajo del 12 %, el cual es el caso para la mayoría de los ensilados en este estudio. A 55 °C, solo se reportó pérdida de materia orgánica (4 %) para 10 %_{ST}, lo cual es consistente con el hecho de que solo a esa concentración de sólidos se produjeron procesos fermentativos.

Según Borreani *et al.* (2018), además del pH, las pérdidas de materia orgánica (medidas como sólidos volátiles) y la producción biogás son los principales parámetros utilizados para determinar la efectividad del ensilado. Por lo tanto, es posible relacionar la reducción acumulada de sólidos volátiles (Tabla 6.6) y la producción acumulada de biogás (Figura 6.13). Según la Figura 6.13, a 20 °C la producción de biogás mostró inicialmente una fase de latencia de 2 días, lo cual corresponde con la lenta producción inicial de metabolitos y por consiguiente una lenta disminución del pH en ese mismo periodo. La producción específica de biogás al final del periodo de ensilado resultó proporcional a la concentración

de sólidos, con valores de 18, 13 y 6 NL/kg_{SV} (SV alimentados) para 28, 20 y 10 %_{ST}. Así mismo, la rapidez de producción de biogás tuvo un comportamiento proporcional a la concentración de sólidos, registrándose una mayor rapidez de producción a la mayor concentración de sólidos. El hecho de que a 20 °C la producción de biogás no sea proporcional a la reducción de SV se justifica en que a bajas temperaturas el CO₂ producido tiene una mayor solubilidad (Diamond y Akinfiyev, 2003) y, por tanto, la fracción medida como biogás disminuye.

En el ensilado a 35 °C, la producción de biogás igualmente presentó una fase de latencia pero con menos duración que a 20 °C. En este caso el tiempo de latencia fue proporcional a la concentración de sólidos, registrando una menor duración a la menor concentración de sólidos. En cuanto a la producción específica de biogás, el mayor valor se registró a 20 %_{ST} con 20 NL/kg_{SV} mientras que a 10 y 28 %_{ST} la producción fue de 16 y 14 NL/kg_{SV}, respectivamente. La rapidez de producción de biogás a 35 °C resultó similar para las tres concentraciones de sólidos, y mucho mayor a la rapidez registrada a 20 °C. Este comportamiento corresponde con lo observado en los valores de pH y de DQO_s los cuales, a 35 °C, mostraron una rápida disminución producto de una mayor rapidez de fermentación. A 55 °C, debido a la baja intensidad de la fermentación durante todo el tiempo de ensilado, la producción de biogás fue considerablemente más baja que a 20 y 35 °C. En este caso las curvas de producción no muestran una fase de latencia y la producción específica de biogás fue inversamente proporcional a la concentración de sólidos.

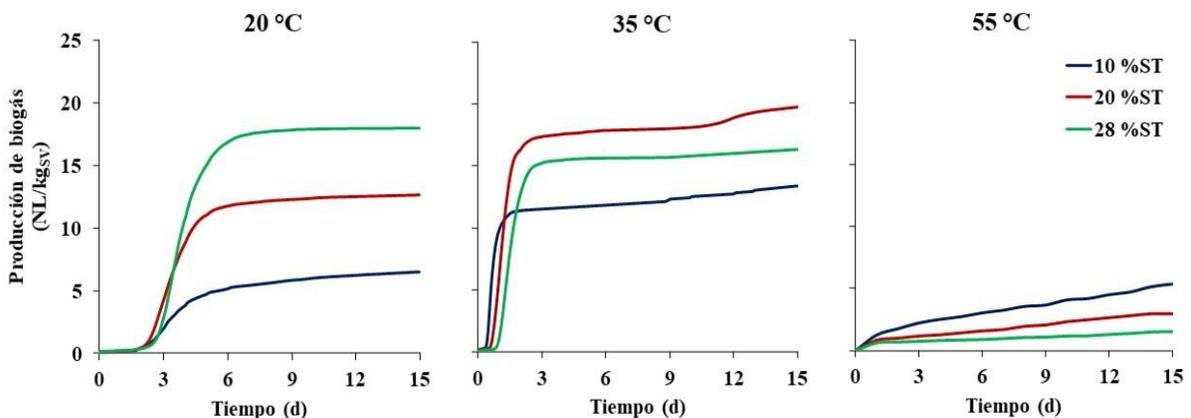


Figura 6.13 Producción de biogás durante el ensilado

6.3.4 Potencial bioquímico de metano de los ensilados

Todos los ensilados de la FORSU a las diferentes temperaturas y concentraciones de sólidos fueron sometidos a la prueba de potencial bioquímico de metano (PBM). A los 21 días de la prueba, para todas las condiciones de ensilado, el valor del PBM resultó menor que el de la FORSU fresca (Figura 6.14). A 20 °C, el PBM de la FORSU ensilada registró una reducción inversamente proporcional a la concentración de sólidos, con valores de 9, 13 y 26 % para 28, 20 y 10 %_{ST}, respectivamente. Para la FORSU ensilada a 35 °C la mayor pérdida de PBM se registró a 20 %_{ST} con una reducción del 15 %, mientras que para 10 y 28 % la reducción fue del 3 %. A 55 °C la reducción del PBM fue del 4 % para la FORSU ensilada a 28 %_{ST} y de 7 % para 10 y 20 %_{ST}. Es importante notar que, a 55 °C, durante los primeros 15 días de la prueba de PBM la producción específica de metano para 10 y 20 %_{ST} fue mayor que para la FORSU fresca, lo cual indica que con el ensilado es posible incrementar el potencial de metano en tiempos de reacción cortos.

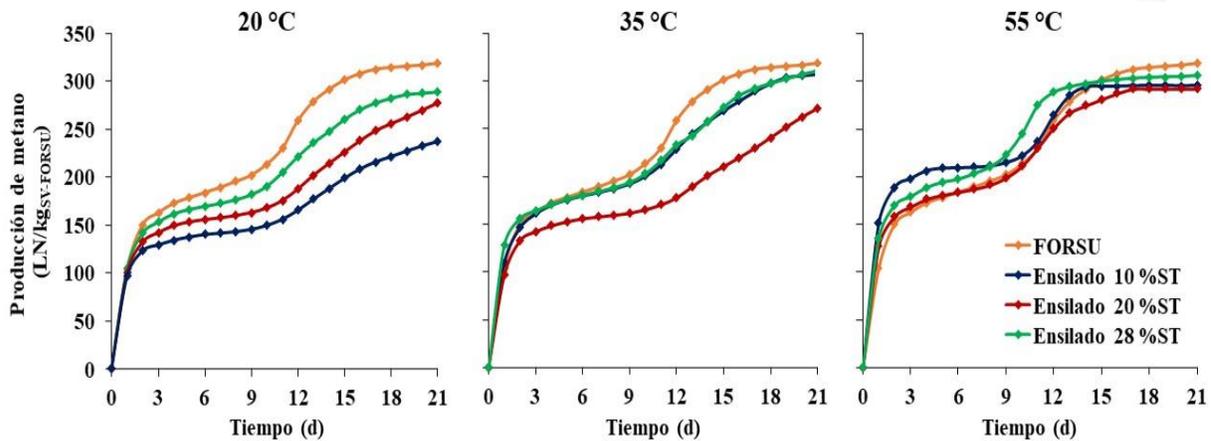


Figura 6.14 PBM de la FORSU ensilada y fresca

En todos los casos se observó un comportamiento diaúxico en las curvas de producción de metano, con una fase de más rápida producción al inicio de la prueba (primeros 3 días), donde los compuestos solubles y de más fácil degradación fueron convertidos a metano. Una segunda fase de rápida producción de metano se registró aproximadamente a partir del día 9. En esta segunda etapa, la producción de metano se realiza a partir de la fracción de la FORSU de más difícil biodegradación.

Si bien la reducción del potencial de metano de un sustrato ensilado se produce tanto por la pérdida de materia orgánica (CO_2) como de energía (H_2), la pérdida de materia orgánica es considerada el principal factor que determina la preservación del PBM de sustratos ensilados. Pakarinen *et al.* (2008), afirman que, a menor pérdida de SV, mayor preservación del PBM. En este estudio, al relacionar la reducción del PBM de la FORSU ensilada (Figura 6.14) con la reducción de la materia orgánica (Tabla 6.6) durante el ensilado es evidente que a mayor reducción de SV mayor fue la reducción del PBM de la FORSU ensilada, con respecto a la FORSU fresca.

De la Figura 6.14 se obtiene que a 20 °C se incrementa la pérdida del PBM de la FORSU ensilada, a pesar de que a esta temperatura se registraron las menores reducciones de materia orgánica. Esto contradice lo afirmado por Borreani *et al.* (2018), quienes afirman que, en sistemas de ensilado para la producción de biogás, las pérdidas de materia orgánica pueden limitarse por debajo del 20 % y el potencial de metano con se puede conservar casi por completo o incluso se puede aumentar respecto al potencial de metano del sustrato fresco.

Contrario a los resultados de este trabajo, diversos autores (Madhukara *et al.*, 1993; Hermann *et al.*, 2011; Lehtomäki, 2006, Pakarinen *et al.*, 2008) han observado incrementos en un rango de 25 – 42 % del potencial de metano de diversos cultivos energéticos, a pesar de reportar pérdidas de sólidos volátiles entre el 18 y 35 %. Según Kreuger *et al.* (2011) dichos resultados se deben a que los rendimientos de producción de metano se han calculado con base en sólidos volátiles sin corregir la pérdida de los compuestos volátiles durante su determinación, lo cual da lugar a un cálculo basado en una masa de sólidos inferior a la que realmente existe, y por tanto se produce la sobre estimación de los rendimientos de metano.

6.4 Aclimatación y producción de inóculos

Con el objetivo de contar con un digestato adaptado a la FORSU y a las diferentes temperaturas de operación se procedió a realizar su aclimatación. La aclimatación tuvo como principal objetivo, que la

biomasa metanogénica se encuentre adaptada al tipo de sustrato y la temperatura. Para la aclimatación de los digestatos de la FORSU se utilizó, como inóculo, lodos granulares de un reactor UASB operado a 35 °C. Las características del inóculo se muestran en la Tabla 6.7. Los lodos presentaron un valor de pH y AGV dentro de los rangos considerados adecuados para la metanogénesis. Así mismo, el 87 % de la materia seca correspondió a la fracción de sólidos volátiles (considerados como la biomasa activa).

Tabla 6.7 Características del inóculo

| Parámetro | Unidades | Lodos anaerobios |
|--------------------------|----------------------|------------------|
| pH | - | 8.1 |
| Sólidos totales | g/kg | 119 |
| Sólidos volátiles | g/kg | 104 |
| DQO | g/kg | 269 |
| AGV | g _{HAc} /kg | 1.3 |
| N-NH₄ | g/kg | 4.1 |

6.4.1 Aclimatación del digestato a 20 °C

El proceso de aclimatación se llevó durante 50 días, dividido en dos etapas. Se inició la alimentación diaria de FORSU, durante 18 días (Etapa 1), con una carga orgánica (CO) de 2.0 kg_{SV}/m³·d a fin de evitar la falla del sistema por sobrealimentación. Una vez alcanzada la estabilidad del proceso en la nueva temperatura de operación, se incrementó la CO a 3.0 kg_{SV}/m³·d (Etapa 2), manteniéndose la operación del reactor en estas condiciones durante otros 32 días.

6.4.1.1 pH, alcalinidad y AGV

Iniciada la operación del reactor, el valor de pH registró una ligera disminución (Figura 6.15), indicando una acumulación de AGV. Una vez que el inóculo se adaptó a la temperatura (día 8) el valor del pH aumentó y se estabilizó en aproximadamente 8.0, sin observarse un efecto por el posterior aumento en la carga orgánica.

Respecto al índice alfa (α), definido como la relación de la alcalinidad bicarbonática sobre la total, desde el día 0 hasta el día 39 registró una constante disminución hasta alcanzar un valor mínimo de 0.42, lo cual se corresponde con la acumulación de AGV registrada para este mismo periodo (Figura 6.15). A partir del día 40, el índice α mostró una recuperación hasta alcanzar un valor de 0.5. En cuanto a los AGV, su concentración inicialmente aumentó debido a la falta de adaptación de los microorganismos a las nuevas condiciones de temperatura. No obstante, una vez iniciada la adaptación (día 8) los AGV acumulados empezaron a ser consumidos. Cuando se aumentó la carga orgánica se produjo una segunda etapa de acumulación de AGV ya que, al alimentarse el reactor con mayor cantidad de sustrato, la tasa de producción de AGV resultó mayor a la capacidad de los microorganismos para consumir los AGV producidos. Diez días después del aumento de la carga orgánica (día 29), la velocidad de acumulación de los AGV fue disminuyendo hasta que, al día 39, la tasa de consumo de AGV fue mayor que la de producción, registrándose una disminución de la concentración de AGV.

El comportamiento del pH y los AGV con respecto a la variación en la carga orgánica registrado en este trabajo coincide con el reportado por Ossa-Arias y González-Martínez (2021) quienes operaron reactores semicontinuos alimentados con FORSU. Después de variar las cargas orgánicas (1.2, 2.0 y 3.0), los autores reportan que, si bien la concentración de AGV aumentó con la carga orgánica, el pH no se vio afectado. Esto se explica en que, la alta solubilidad del CO₂ a bajas temperaturas (Lettinga *et al.*, 2001),

y la presencia de NH_4 en bajas concentraciones (Morozova *et al.*, 2020), permiten mantener la capacidad búfer del sistema al tener lugar la formación de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Liu *et al.*, 2009).

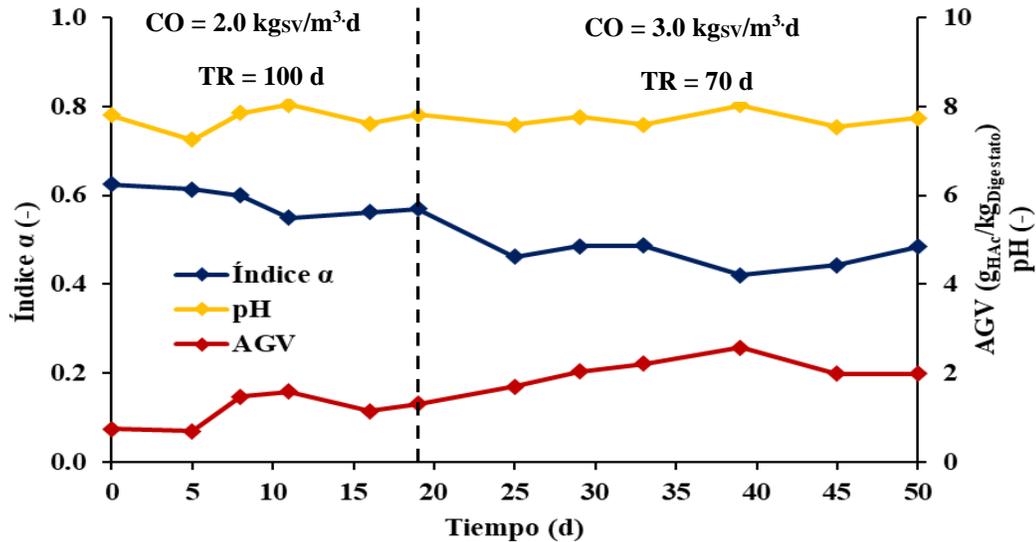


Figura 6.15 pH, índice alfa (α) y AGV en reactor a 20 °C

6.4.1.2 Producción de metano

La Figura 6.16 muestra que inicialmente el cambio brusco de temperatura (de 35 a 20 °C) del inóculo tuvo un efecto sobre el contenido de metano al provocar una disminución del 60 al 50 % de metano en el biogás. Luego, el contenido de metano en el biogás incrementó en la medida en que los microorganismos fueron adaptándose a las nuevas condiciones del medio, estabilizándose en un valor aproximado de 60 %. Contrario al cambio de temperatura, el cambio en la carga orgánica no produjo variaciones significativas en la concentración de metano, pues al aumentar de 2.0 hasta 3.0 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, la concentración de metano en el biogás se mantuvo alrededor de 60 %. Este comportamiento también es reportado por Ossa-Arias y González-Martínez (2021), quienes al aumentar la carga orgánica desde 1.2 hasta 3.0 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, registraron concentraciones de metano superiores al 60 % para todas las cargas evaluadas.

Al aumentar la carga de 2.0 a 3.0 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, con tiempo de retención de 100 y 70 días, la producción de metano se redujo de 273 a 258 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$. Este comportamiento es consistente con lo observado por Martí-Herrero *et al.* (2018), quienes, al evaluar la operación de un reactor de flujo pistón con recirculación de digestato, operado a 21 °C y alimentado con desechos de frutas y verduras, registraron que, al aumentar la carga orgánica de 0.56 hasta 1.06 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ y disminuir el tiempo de retención hidráulica desde 164 hasta 87 días, respectivamente, la producción de metano se redujo desde 146 hasta 112 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$. Se sabe que la disminución de la temperatura de operación durante la digestión anaerobia conduce a una disminución en las tasas máximas de crecimiento específico y utilización del sustrato (Lettinga *et al.*, 2001). Esto implica que en condiciones psicrófilas las reacciones químicas y biológicas se producen más lentamente que en condiciones mesófilas, por lo que, para alcanzar un proceso estable a bajas temperaturas se requiere de mayor tiempo de reacción y bajas cargas orgánicas.

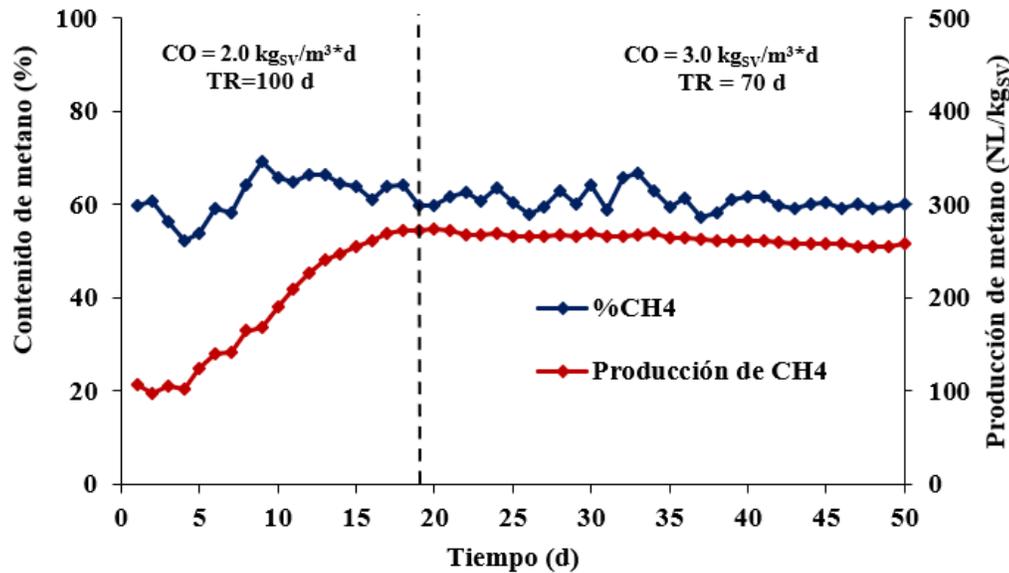


Figura 6.16 Contenido y producción de metano durante la adaptación del inóculo a 20 °C

La disminución de la producción de metano por el aumento de la carga orgánica también ha sido reportada por Ossa-Arias y González-Martínez (2021) quienes operaron reactores semicontinuos a 20 °C alimentados con FORSU, reportando para CO de 1.2, 2.0 y 3.0 kg_{SV}/m³·d, producciones metano de 387, 330 y 306 NL/kg_{SV}, respectivamente. Rajagopal *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la carga orgánica sobre la producción de metano durante la codigestión anaerobia de residuos de alimentos y estiércol de vaca en reactores discontinuos operados a 20 °C. Al evaluar cargas orgánicas desde 1.4 hasta 4.2 kg_{SV}/m³·d, registraron reducciones en la producción de metano desde 457 hasta 401 NL/kg_{SV}. Los valores significativamente mayores de producción de metano reportadas por Ossa- Arias y González Martínez (2021) y Ragajopal *et al.* (2016), comparados con Martí-Herrero *et al.* (2018), son atribuidos por los autores al uso de inóculo adaptado al sustrato y a la temperatura.

6.4.2 Aclimatación de digestato a 35 °C

Durante 48 días, 3 reactores discontinuos fueron alimentados con FORSU fresca (28 %_{ST}) en relaciones sustrato a inóculo (S/I) de 0.33, 0.50 y 1.00, con base en sólidos volátiles. Un cuarto reactor fue utilizado como testigo conteniendo solamente inóculo.

6.4.2.1 pH, alcalinidad y AGV

En los reactores con las menores relaciones S/I (0.33 y 0.50) el pH, el índice alfa (α) y los AGV, se mantuvieron estables durante todo el experimento (Figura 6.17), indicando una capacidad metanogénica suficiente del inóculo inicial al consumir rápidamente los AGV, previniendo su acumulación y evitando la caída del pH.

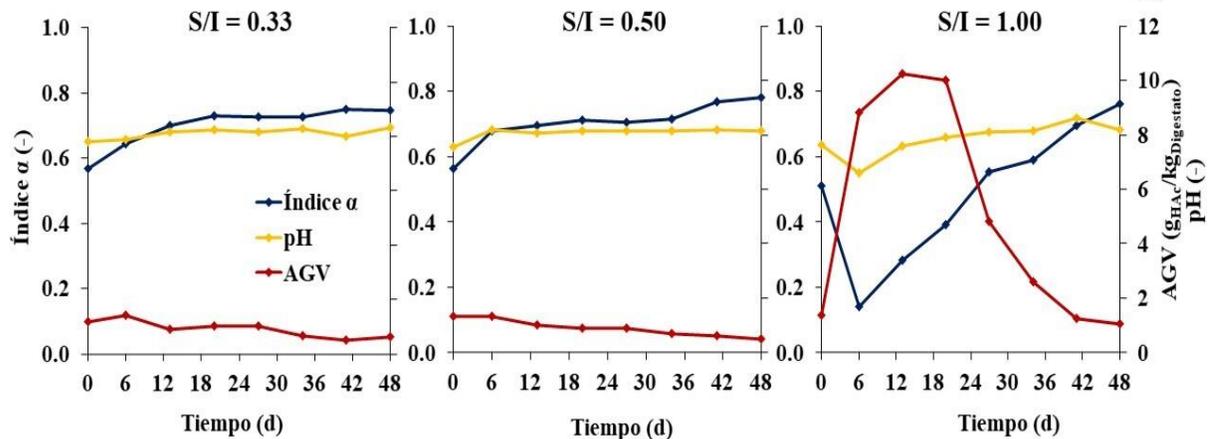


Figura 6.17 pH, índice alfa (α) y AGV en los reactores a 35 °C

Para el reactor con relación $S/I = 1.00$, el pH disminuyó hasta 6.6 al día 6, por efecto de la rápida producción de AGV asociada con una mayor cantidad de sustrato en comparación con los reactores con una menor relación S/I . Este efecto coincide con lo reportado por diversos autores (Motte *et al.*, 2013; Lin y Li, 2017; Girotto *et al.*, 2017; Kawai *et al.*, 2014), quienes, al evaluar diferentes relaciones S/I durante la digestión anaerobia, han registrado un aumento en la concentración de AGV cuando la relación S/I aumenta. Al día 13 se alcanzó una concentración máxima $10 \text{ g}_{\text{HAc}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$, para luego empezar a disminuir de manera sostenida hasta $1.6 \text{ g}_{\text{HAc}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$ al final del experimento.

6.4.2.2 Producción de metano

La Figura 6.18 muestra que la producción específica de biogás fue más rápida para los reactores con menor concentración de sustrato ($S/I = 0.33$ y 0.50), habiéndose obtenido al día 22 aproximadamente el 95 % del metano total producido durante el experimento. Para la relación $S/I = 1.00$ se registró una prolongada fase de latencia, de modo tal que la fase exponencial de producción de metano se produjo entre los días 30 y 39. La producción de metano al final del experimento fue de 280, 311 y 237 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$ para las relaciones S/I : 0.33, 0.50 y 1.00, respectivamente. La relación no lineal entre la relación S/I y la producción de metano obtenida en este estudio coincide con lo reportado por Zhou *et al.* (2011), quienes estudiaron el efecto de la relación S/I sobre la producción de metano a partir de residuos de frijoles. Los autores evaluaron relaciones S/I con valores en un rango de 0.1 a 3.0, registrando la mayor producción de metano para las relaciones S/I entre 0.6 y 0.9.

Resultados opuestos reportan Kawai *et al.* (2014) y Lin y Li (2017), quienes evaluaron la influencia de la relación S/I sobre la producción de metano a partir de residuos de alimentos, observando que la producción óptima de metano se registró a las relaciones S/I más bajas evaluadas. Con respecto a las conclusiones contradictorias sobre el efecto de la relación S/I sobre la producción de metano, Lesteur *et al.* (2010) afirman que cada sustrato tiene una relación S/I óptima, la cual depende de la producción potencial de AGV del sustrato y la capacidad amortiguadora del sistema.

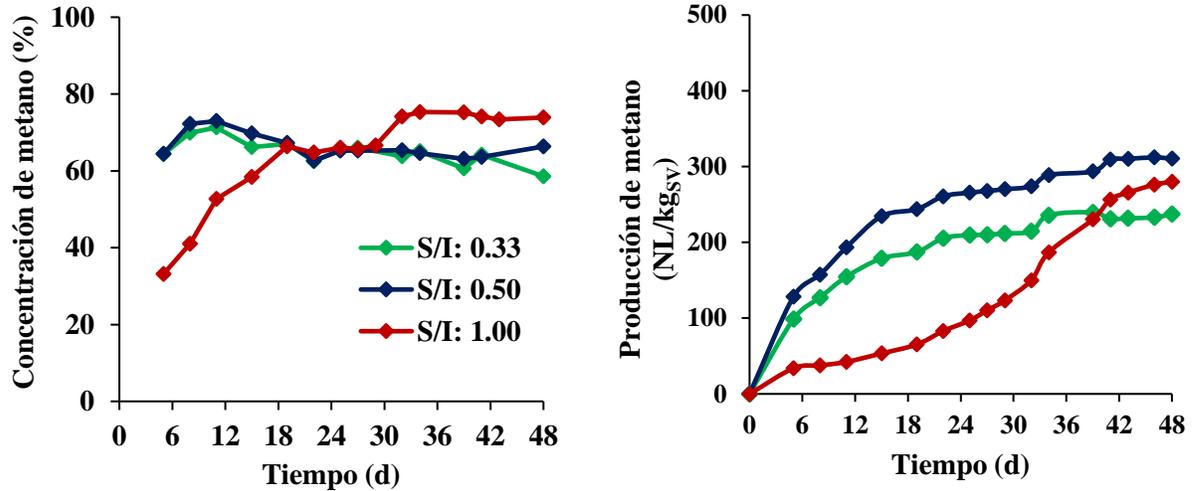


Figura 6.18 Contenido y producción de metano durante la adaptación del digestato a 35 °C

En este estudio, la mayor producción de metano a la relación S/I = 0.50 fue posible gracias a las condiciones de pH y alcalinidad adecuadas para la metanización y al balance entre la cantidad de sustrato alimentada y la biomasa metanogénica activa. La baja producción de metano para la relación S/I = 0.33 puede relacionarse con un decrecimiento de los microorganismos por agotamiento del sustrato (Le Hyaric *et al.*, 2011), mientras que para S/I = 1.0, la alta concentración de sustrato dio lugar a la acumulación de AGV, limitando seriamente la actividad metanogénica durante el arranque del proceso. Al igual que en este trabajo, diversos autores reportan una disminución de la producción de metano a partir de residuos sólidos municipales, asociada a una acumulación de AGV al aumentar las concentraciones de sustrato hasta un nivel en el que la capacidad metanogénica es sobrepasada (Fernández *et al.*, 2018; Motte *et al.*, 2013; Kawai *et al.*, 2014; Lin y Li, 2017).

6.4.3 Aclimatación de digestato a 55 °C

La estrategia de aclimatación consistió en el aumento de temperatura en un solo paso, con el fin de evitar el rango de temperatura en el cual se desfavorece el desarrollo de microorganismos anaerobios (42 a 47 °C) (Boušková *et al.*, 2005) y, a la vez, lograr el rápido establecimiento de la comunidad microbiana termofílica (Cecchi *et al.*, 1993). Al igual que a 20 y 35 °C, para la aclimatación del inóculo a 55 °C, inicialmente fueron operados 3 reactores discontinuos alimentados con FORSU fresca (28 %_{ST}) en relaciones sustrato a inóculo (S/I) de 0.33, 0.50 y 1.00. Sin embargo, debido a los procesos de inhibición presentados en todos los casos durante los primeros días, se inició nuevamente el arranque de un solo reactor mediante alimentación semi continua. Aquí se presentan los resultados del segundo procedimiento.

El tiempo total de operación del reactor fue de 120 días (Figura 6.19). Una vez aumentada la temperatura, se inició la alimentación diaria del reactor con una carga orgánica (CO) de 1.0 kg_{SV}/m³·d y un tiempo de retención (TR) de 100 días (Etapa 1), resultando en una rápida disminución del índice α , provocada por la acumulación de AGV, hasta situarse por debajo del valor considerado adecuado (índice $\alpha > 0.6$) para la actividad metanogénica. El día 18 se detuvo la alimentación (Etapa 2) para evitar una mayor acumulación de AGV y mejorar la actividad metanogénica. Después de 24 días de detenida la alimentación, tanto el pH como el índice α mostraron una recuperación en su valor y, por tanto, se reinició la alimentación diaria del reactor con una carga orgánica de 0.5 kg_{SV}/m³·d, la cual se mantuvo durante 30 días (Etapa 3) hasta que el proceso fue estable ante la nueva carga orgánica. Posteriormente, la CO se aumentó a 1.0 kg_{SV}/m³·d, manteniéndose durante 20 días (Etapa 4). Finalmente, considerando las

condiciones estables en las que operaba el sistema, se aumentó la carga orgánica a $2.0 \text{ kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ (Etapa 5), con la cual se operó el reactor durante 30 días adicionales. En todas las etapas, el reactor fue alimentado con FORSU con $7 \%_{\text{ST}}$, para lo cual la FORSU fresca fue diluida añadiendo agua del grifo. El objetivo de la dilución fue el de disminuir el riesgo de falla del reactor por la acumulación de compuestos inhibitorios como los AGV y el amoniaco (Ghanimeh *et al.*, 2012; Rajagopal *et al.*, 2013).

6.4.3.1 pH, alcalinidad y AGV

La Figura 6.19 muestra que, durante los primeros 18 días, el reactor fue alimentado con una carga orgánica de $1.0 \text{ kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ y un tiempo de retención (TR) de 100 días, resultando en una rápida disminución del índice α provocada por la rápida acumulación de AGV ($10 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$). Como consecuencia, se detuvo la alimentación para dar lugar al consumo de los AGV acumulados y mejorar así la actividad metanogénica. Después de 24 días de detenida la alimentación, tanto el pH como el índice α mostraron una recuperación en su valor hasta valores de 8.2 y 0.71, respectivamente, y la concentración de AGV disminuyó hasta $2.9 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$. Dichas condiciones, consideradas óptimas para la producción de metano, permitieron registrar al final de esta etapa una producción de metano de $250 \text{ LN}/\text{kg}_{\text{SV}}$ (Figura 6.20).

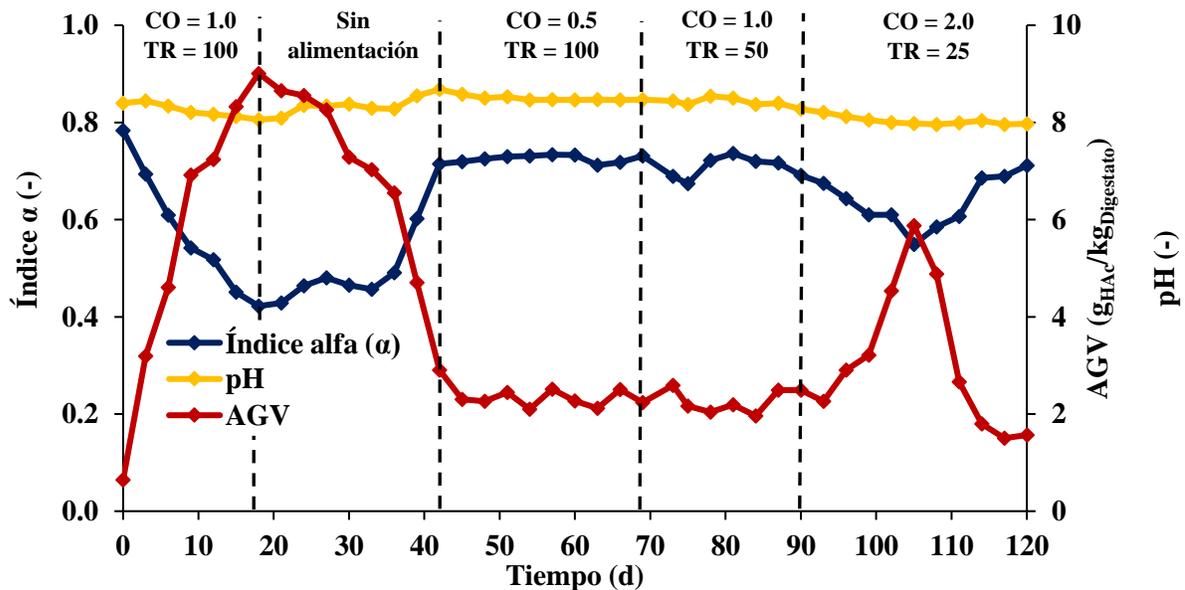


Figura 6.19 pH, índice alfa (α) y AGV en el reactor a $55 \text{ }^\circ\text{C}$

Una vez alcanzadas condiciones consideradas adecuadas para la metanogénesis, se inició nuevamente la alimentación con una carga orgánica más baja ($0.5 \text{ kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$) que la inicial y manteniendo el TR = 100 días. Esta etapa tuvo una duración de 28 días, manteniéndose estables los parámetros de operación: pH = 8.3, índice α = 0.73, AGV = $2.2 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$ y producción de metano de $329 \text{ NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$. Dado que las condiciones de estabilidad se mantuvieron, se incrementó la carga orgánica hasta $1.0 \text{ kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ y se disminuyó el TR a 50 días. Si bien inicialmente se observó una disminución en la alcalinidad bicarbonática, los parámetros de monitoreo se mantuvieron estables después de 20 días: pH = 8.2, índice α = 0.69, AGV = $2.5 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$ y la producción de metano aumentó a $350 \text{ NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$. En la última etapa, con una duración de 30 días, se aumentó la carga orgánica a $2.0 \text{ kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ y se disminuyó el TR a 25 días. Tras el aumento de la carga orgánica, el pH empezó una leve disminución hasta terminar en 8.0 al final de la etapa. El índice α disminuyó hasta 0.58 al día 18 de la etapa, mientras que los AGV se fueron acumulando hasta alcanzar una concentración máxima de $5.9 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$. A partir del día 18

de la etapa, inició un acelerado consumo de los AGV y, por tanto, un aumento en el índice α , registrando valores finales de 1.6 $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{Digestato}}$ y 0.71, respectivamente. La producción de metano en esta etapa aumentó con respecto a las etapas anteriores, alcanzándose 389 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$.

6.4.3.2 Producción de metano

La estrategia del aumento súbito de temperatura para la aclimatación de inóculos termofílicos ha sido reportada por diversos autores (Ossa-Arias y González-Martínez, 2021; Boušková *et al.*, 2005; Bolzonella *et al.*, 2003; Ahring *et al.*, 2003). Al igual que en este trabajo, dichos autores reportaron una acumulación inicial de AGV, y la disminución de la producción de metano, como consecuencia de la reducida comunidad microbiana termofílica presente en el inóculo inicial. La operación estable de los reactores se alcanzó en un periodo de entre 28 y 30 días, una vez que los microorganismos termófilos ya presentes en el inóculo se convirtieron en la comunidad dominante en la nueva temperatura (El-Fadel *et al.*, 2013).

El efecto de la carga orgánica sobre la operación de reactores termofílicos alimentados con FORSU también ha sido estudiado por varios autores, reportando que, a bajas cargas orgánicas, la producción de metano aumenta al aumentar la carga. Ossa-Arias y González-Martínez (2021), reportan un aumento de la producción de metano de 300 a 314 $\text{NL}/\text{kg}_{\text{SV}}$ cuando aumentaron la carga de 0.6 a 1.0 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ durante la operación de un reactor semicontinuo termofílico alimentado con FORSU. Fernández-Rodríguez *et al.* (2014) operaron un reactor de tanque agitado semicontinuo termofílico para el tratamiento de FORSU con 20 %_{ST}, variando la carga orgánica desde 4.8 a 20 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, observando que entre 4.8 y 13 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, la producción de metano aumenta al aumentar la carga orgánica. Angelidaki *et al.* (2006) evaluaron el aumento progresivo de la carga orgánica durante el arranque de un reactor termofílico alimentado con FORSU separada en la fuente. La carga orgánica fue aumentada gradualmente desde 1.7 hasta 15 $\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, registrándose un aumento de la producción de metano cada vez que la carga orgánica fue incrementada.

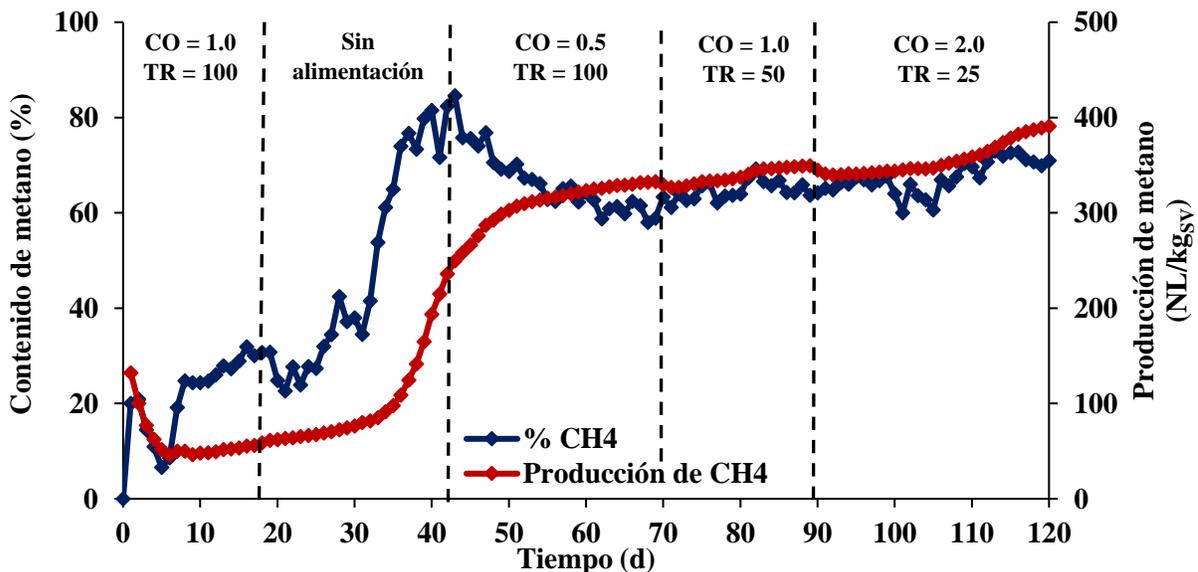


Figura 6.20 Contenido y producción de metano durante la adaptación del digestato a 55 °C

6.4.4 Características de digestatos aclimatados

En la Tabla 6.8 se muestran las características de los digestatos aclimatados a las diferentes temperaturas. Para las tres temperaturas, los digestatos cumplieron con los criterios descritos en el capítulo 5.4.1 para ser considerados como inóculos metanogénicos, excepto en el contenido de AGV para 20 y 55 °C, ya que se excedió la concentración recomendada de 1.5 g_{DQO}/kg_{Digestato} (Saveyn y Eder, 2014). No obstante, todos los digestatos se obtuvieron de reactores operando en condiciones estables.

Tabla 6.8 Características de digestatos aclimatados

| Parámetro | Unidades | Temperatura (°C) | | |
|--------------------------|---|------------------|------|------|
| | | 20 | 35 | 55 |
| pH | - | 7.7 | 8.3 | 8.0 |
| Sólidos totales | g/kg | 120 | 104 | 26 |
| Sólidos volátiles | g/kg | 89 | 75 | 18 |
| SV/ST | - | 0.74 | 0.72 | 0.69 |
| Índice alfa (α) | - | 0.61 | 0.78 | 0.71 |
| Contenido de metano | % | 69 | 70 | 71 |
| DQO | g/kg _{SV} | 307 | 128 | 870 |
| AGV | g _{DQO} /kg _{Digestato} | 2.0 | 1.3 | 1.6 |
| N-NH ₄ | g/kg _{SV} | 12.8 | 18.9 | 30 |

6.5 Metanización de la FORSU ensilada

En este capítulo se muestran los resultados de la prueba de metanización a la que fueron sometidos los productos obtenidos del ensilado de FORSU. La prueba se desarrolló incubando distintas relaciones sustrato a inóculo S/I (0.5, 1.0 y 1.5). Los sustratos son los digestatos ácidos que resultaron de la fermentación de FORSU ensilada a diferentes temperaturas (Capítulo 6.3) y los inóculos son los digestatos metanogénicos obtenidos durante la adaptación de FORSU a las tres diferentes temperaturas (Capítulo 6.4). Durante la prueba de metanización se manejaron las mismas temperaturas que durante el ensilado y la adaptación de FORSU a metanogénesis (20, 35 y 55 °C); no se controló el pH y no hubo mezcla mecánica en los reactores. Antes de introducir los materiales a los reactores bajo las relaciones S/I indicadas, se mezclaron adecuadamente.

6.5.1 Metanización a 20 °C

En la Tabla 6.9 se muestran los valores de pH resultantes de la mezcla de FORSU ensilada y fresca con el inóculo metanogénico. Para las mezclas con FORSU ensilada en las relaciones S/I más altas (1.0 y 1.5), se registraron valores de pH en un rango de 4.8 a 5.9, correspondiendo los valores más bajos a las mezclas con FORSU ensilada a 10 %_{ST}, lo cual se relaciona al mayor grado de fermentación alcanzado durante el ensilado (Figura 6.5). Las condiciones de pH ácido se mantuvieron durante los 25 días de la prueba, lo que se evidenció en valores finales de pH inferiores a 6.0. Para las mezclas con FORSU fresca, el pH inicial resultó en valores ligeramente alcalinos (Tabla 6.9), con excepción de la mezcla a 28 %_{ST} y relación S/I = 1.5, cuyo pH inicial fue de 6.9. Sin embargo, al final de la prueba de metanización se midieron valores de pH inferiores a 6.0, lo cual tuvo como consecuencia que tanto para la FORSU ensilada como para la FORSU fresca, la metanogénesis resultara inhibida por el bajo pH. Según Cecchi (2003), la digestión anaerobia de FORSU es estable en un rango de pH de 6.7 a 7.5. Zhai *et al.* (2015) reporta que, a valores de pH inferiores a 6.0 el proceso falla totalmente, lo cual explica el comportamiento observado en este trabajo, donde la producción de metano a partir de las mezclas resultó inferior a la del inóculo (Figura 6.21).

Tabla 6.9 Variación de pH durante la metanización a 20 °C

| ST en el ensilado (%) | Relación S/I | FORSU ensilada | | FORSU fresca | |
|-----------------------|--------------|----------------|-------|--------------|-------|
| | | Inicial | Final | Inicial | Final |
| 10 | 0.5 | 7.2 | 7.5 | 7.5 | 7.5 |
| | 1.0 | 5.2 | 6.0 | 7.2 | 5.3 |
| | 1.5 | 4.8 | 4.6 | 7.2 | 5.0 |
| 20 | 0.5 | 7.2 | 7.6 | 7.1 | 7.5 |
| | 1.0 | 5.4 | 5.8 | 7.3 | 5.3 |
| | 1.5 | 5.2 | 5.5 | 7.3 | 5.5 |
| 28 | 0.5 | 7.2 | 7.5 | 7.2 | 7.5 |
| | 1.0 | 5.9 | 5.6 | 7.0 | 5.4 |
| | 1.5 | 5.3 | 5.7 | 6.9 | 5.7 |

Tanto para la FORSU ensilada como para la FORSU fresca, solamente para la relación S/I = 0.5 los valores de pH iniciales resultaron ligeramente alcalinos, permitiendo la producción de metano. En todos los casos la mayor rapidez de producción de metano se produjo durante los primeros diez días (Figura 6.21), excepto para el reactor alimentado con la FORSU ensilada a 10 %_{ST}, para el cual la curva de producción de metano presentó su mayor pendiente entre los días 15 y 21. La larga fase de latencia observada para este caso, se relaciona con el mayor grado de fermentación (Figura 6.5) alcanzado para 10 %_{ST} durante el ensilado, lo cual produjo una ralentización de la actividad metanogénica durante el arranque. Independientemente de la fase de latencia observada para FORSU ensilada a 10 %_{ST}, la producción de metano al final de la prueba fue similar a las demás concentraciones de sólidos.

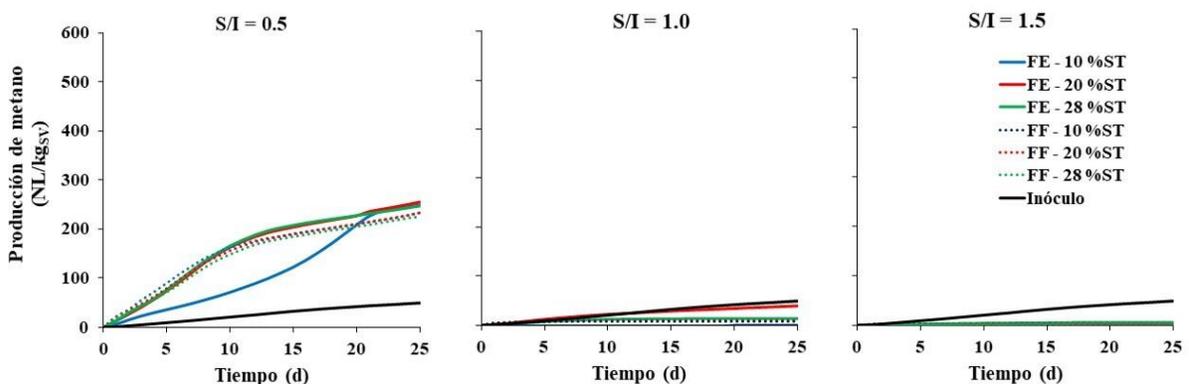


Figura 6.21 Producción bruta de metano de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) a 20 °C

Considerando la variación en los tiempos (tiempo de reacción) en que puede alcanzarse la máxima producción de metano (P_{CH_4}) para las diferentes relaciones S/I, se determinó el tiempo de reacción (T) usando el criterio recomendado por Holliger *et al.* (2016). Estos autores consideran que la máxima producción de metano se alcanza cuando los valores de metano acumulado no aumentan más del 1 % como promedio de tres días consecutivos. Este análisis fue hecho para cada reactor restando la producción del inóculo.

Según la Tabla 6.10, a 20 °C la producción de metano (P_{CH_4}) en los reactores alimentados con FORSU ensilada resultó mayor que cuando se alimentó FORSU fresca, siendo el incremento similar (14 – 16 %) independientemente de la concentración de sólidos a la que la FORSU fue ensilada. Para la FORSU ensilada, la producción de metano mostró una tendencia a aumentar con la disminución la concentración de sólidos durante el ensilado, lo cual se explica en que, a menor %_{ST} durante el ensilado, el grado de fermentación fue mayor y, por tanto, hubo una mayor disponibilidad de metabolitos para ser transformados a metano. Lavagnolo *et al.* (2018) reportan que la fermentación de FORSU previo a la metanización es positiva dado que permite proporcionar un sustrato rico en metabolitos listos para ser digeridos por arqueas metanogénicas.

Tabla 6.10 Producción de metano (P_{CH_4}) a 20 °C

| ST en el ensilado (%) | Relación S/I | Producción de CH ₄ (NL/kg _{SV}) | | ΔCH ₄ (%) | Tiempo de reacción (d) | |
|-----------------------|--------------|--|--------------|----------------------|------------------------|--------------|
| | | FORSU Ensilada | FORSU Fresca | Ensilada/Fresca | FORSU Ensilada | FORSU Fresca |
| 10 | 0.5 | 167 | 144 | +16 | 22 | 16 |
| | 1.0 | ND | ND | ND | ND | ND |
| | 1.5 | ND | ND | ND | ND | ND |
| 20 | 0.5 | 164 | 144 | +14 | 22 | 16 |
| | 1.0 | ND | ND | ND | ND | ND |
| | 1.5 | ND | ND | ND | ND | ND |
| 28 | 0.5 | 156 | 137 | +14 | 22 | 16 |
| | 1.0 | ND | ND | ND | ND | ND |
| | 1.5 | ND | ND | ND | ND | ND |

ΔCH₄ representa la variación en la producción de la FORSU ensilada con respecto a la FORSU fresca. ND: no detectado (La producción de metano del sustrato fue menor a la del testigo).

En la Tabla 6.11 se compara la producción de metano durante la digestión anaerobia psicrófila de diversos residuos sólidos orgánicos en diferentes condiciones de proceso. En este trabajo, las máximas producciones de metano para la FORSU ensilada fueron de 167, 164 y 156 NL/kg_{SV} para 10, 20 y 28 %_{ST}, respectivamente; mientras que para la FORSU fresca la producción de metano fue de 137, 144 y 144 NL/kg_{SV} para 10, 20 y 28 %_{ST}, respectivamente. Estos valores son inferiores a los reportados por Rajagopal *et al.* (2016) y Ossa-Arias y González-Martínez (2021); lo cual se asocia principalmente con las bajas cargas orgánicas y, por tanto, los prolongados tiempos de retención utilizados en sus reactores. Martí-Herrero *et al.* (2018), si bien manejaron largos tiempos de retención, reportan bajas producciones de metano en comparación con Rajagopal *et al.* (2016) y Ossa-Arias y González-Martínez (2021), lo cual se asocia con que el inóculo metanogénico utilizado por Martí-Herrero *et al.* (2018) no fue previamente adaptado a la temperatura.

Al igual que en este estudio, Massé *et al.* (2015) y Browne *et al.* (2015) reportan bajas producciones de metano, como consecuencia de los cortos tiempos de retención utilizados. Wang *et al.* (2019) reportaron una fuerte disminución del contenido de metano en el biogás al disminuir la temperatura del reactor de 25 a 20 °C. Los autores reportan que la falta de adaptación del sustrato a la nueva temperatura de operación redujo el crecimiento específico de los microorganismos metanogénicos, evidenciando la sensibilidad de estos microorganismos a los cambios bruscos de temperatura.

Tabla 6.11 Producción de metano de residuos sólidos orgánicos durante la digestión anaerobia psicrófila

| Sustrato | Tipo de reactor | Parámetros de operación | Producción de CH ₄ (NL/kgsv) | Referencia |
|--|----------------------------|--|---|---------------------------------------|
| Residuos de alimentos y estiércol vacuno | Discontinuo secuencial | 20 °C, CO = 1.4 – 4.2, 13 – 37 % _{ST} | 457 - 401 | Rajagopal <i>et al.</i> (2016) |
| FORSU | Semicontinuo | 20 °C, CO = 1.2 – 3.0, 11 – 14 % _{ST} , TRS = 163, 106 días | 387 - 306 | Ossa-Arias y González-Martínez (2021) |
| Desechos de frutas y verduras | Flujo pistón | 21 °C, CO = 2.0 - 3.0, TRH = 164 y 87 días | 146 - 112 | Martí-Herrero <i>et al.</i> (2018) |
| Estiércol vacuno y paja de trigo | Discontinuo secuencial | 20 °C, TR = 25 días, 27 % _{ST} | 183 | Massé <i>et al.</i> (2015) |
| Estiércol vacuno y paja de trigo | Semicontinuo en dos etapas | 20 °C, TR = 20 días S/I = 0.33 | No detectada | Wang <i>et al.</i> (2019) |
| Purín de vaca ensilado | CSTR | 20 °C, TRH = 25 días, 7 % _{ST} | 165 | Browne <i>et al.</i> (2014) |
| FORSU ensilada | Discontinuo | 20 °C, 10, 20 y 28 % _{ST} , S/I = 0.5, TR = 22 días | 167, 164, 156 | Este trabajo |
| FORSU fresca | Discontinuo | 20 °C, 10, 20 y 28 % _{ST} , S/I = 0.5, TR = 16 días | 137, 144, 144 | |

Diversa literatura reporta que los metanógenos son más sensibles a temperaturas más bajas que otros microorganismos presentes en un digestor anaerobio. De acuerdo con Lettinga *et al.* (2001), la inoculación de un reactor con biomasa no adaptada a la temperatura de operación provocará una drástica caída de la actividad metanogénica, dada la estrecha relación de la temperatura con las tasas de los procesos de conversión durante la digestión anaerobia. Ramana y Singh (2000) afirman que, en condiciones psicrófilas, el metabolismo microbiano es más lento que en las mesófilas o termófilas, por lo que se reduce el crecimiento específico máximo de los microorganismos metanogénicos y las tasas de utilización del sustrato, requiriendo tiempos de reacción más prolongados. Así mismo, se ha reportado que la temperatura no solo afecta las tasas de producción de metano, sino también las vías de producción al cambiar la actividad y abundancia de microorganismos (Kotsyurbenko *et al.*, 2007). A medida que disminuye la temperatura, aumenta la energía libre de Gibbs de degradación de los AGV, lo que conduce a una mayor sensibilidad de las bacterias sintróficas a las bajas temperaturas (Dhaked *et al.*, 2010), reduciendo considerablemente la metanogénesis hidrogenotrófica (Nozhevnikova *et al.*, 2007).

En la Figura 6.22 se muestra la composición y concentración de los metabolitos presentes en los digestatos obtenidos al final de la prueba de metanización, tanto para FORSU ensilada como para la FORSU fresca. Para ambos sustratos, en la relación S/I = 0.5, para la cual sí hubo producción de metano, el ácido propiónico fue el único metabolito detectado al final de la prueba de metanización. La Solamente para FORSU fresca con 28 %_{ST} se detectó la presencia de alcoholes.

En los reactores con las relaciones S/I = 1.0 y 1.5, alimentados con FORSU ensilada a 20 y 28 %_{ST}, se observa que el ácido láctico producido durante el ensilado fue completamente convertido a ácido butírico y ácido acético. Según Pahlow *et al.* (2003), los ácidos butírico y acético son productos primarios de la fermentación butírica y son un claro indicador de actividad de clostridios. Solamente para la relación S/I = 1.5 de la FORSU ensilada a 10 %_{ST}, la concentración de ácido láctico fue mayor en el digestato que en la mezcla inicial, lo cual indica que el pH resultante de la mezcla inicial fue suficientemente bajo para inhibir la actividad de clostridios, dando lugar a una prolongación de la fermentación láctica durante la prueba de metanización.

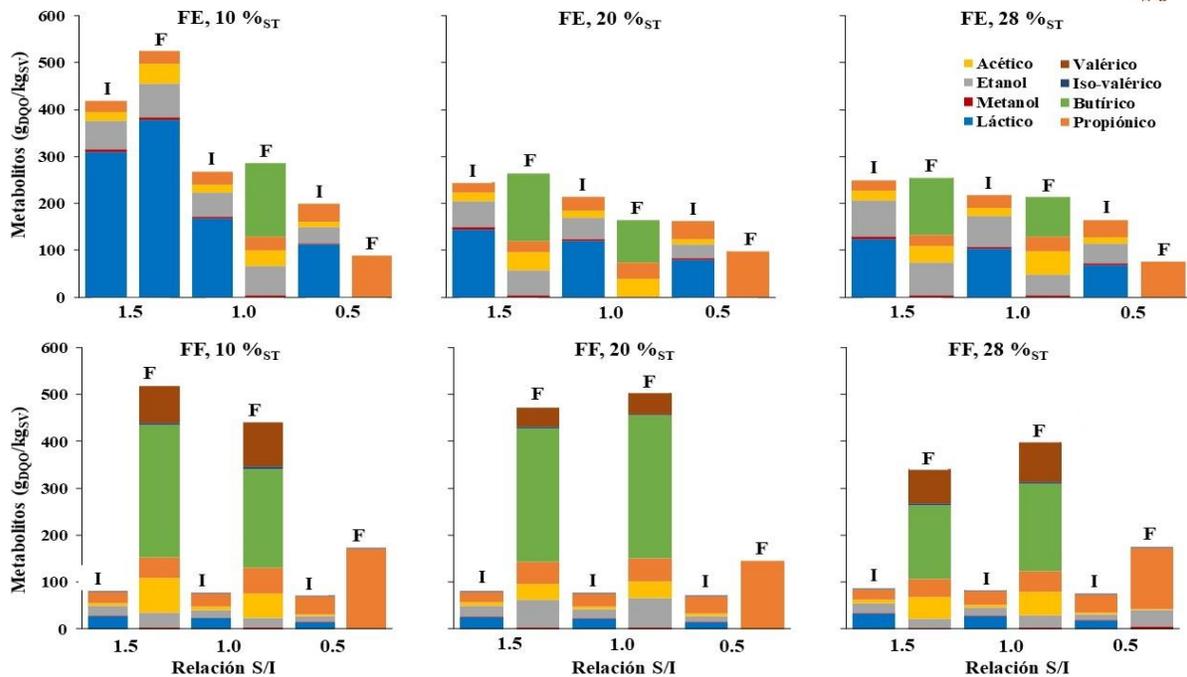


Figura 6.22 Metabolitos en mezclas iniciales (I) y digestatos (F) de la prueba de metanización de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF).

Para la FORSU fresca, en todas las relaciones S/I donde no hubo producción de metano (S/I = 1.5 y 1.0) se registró un considerable aumento en las concentraciones de metabolitos de fermentaciones al final de la prueba de metanización. Los AGV fueron los metabolitos más abundantes (butírico, valérico, acético, propiónico e isoalérico.) En menor medida se detectó etanol. Michel-Savin *et al.* (1990a) reportan que durante la digestión anaerobia psicrófila, la baja tasa de crecimiento celular es un parámetro crítico para la estabilidad del rendimiento de producción de metano. En el caso de la fermentación butírica durante la digestión anaerobia, estudios previos han demostrado que la inhibición por los ácidos producidos (butirato y acetato) es una característica dominante de esta fermentación (Michel-Savin *et al.*, 1990b). Otra característica es que la selectividad por butirato (relación de butirato a ácidos totales producidos) se ve fuertemente favorecida a tasas de crecimiento celular más bajas (Michel-Savin *et al.*, 1990a, b).

Además del efecto de la temperatura, en este trabajo, la actividad de clostridios y la consecuente producción de ácido butírico en grandes cantidades observada tanto para la FORSU ensilada como para la FORSU fresca, se asocia con el pH inicial resultante de los sustratos con el inóculo. De acuerdo con Pahlow *et al.* (1993), para que la actividad clostridios sea inhibida se requiere un pH menor a 5.0. Por otra parte, la fuerte acumulación de AGV detectada para las relaciones S/I más altas es considerada la causa de los bajos valores de pH registrados al final de la prueba de metanización (Tabla 6.9) y que provocaron la falla total de la metanogénesis. Tal como se describió antes, a medida que disminuye la temperatura, la energía libre de Gibbs de degradación de los AGV aumenta, lo que conduce a su acumulación (Dhaked *et al.*, 2010). Hill y Holmberg (1988) observaron que existe una relación entre la función de las bacterias hidrogenogénicas y la acumulación de AGV de cadena más larga, puesto que, las bacterias acetogénicas, productoras obligadas de H₂, son capaces de producir acetato, H₂ y CO₂ a partir de ácidos grasos de cadena más larga. Por razones termodinámicas, la conversión de etanol, propionato y butirato en acetato por los acetógenos es factible solo si se consume el hidrógeno producido (Henze *et al.*, 2008). Dado que a bajas temperaturas el hidrógeno es consumido a tasas muy bajas, la

degradación de los AGV de cadena más larga se ve limitada y su acumulación puede reducir o impedir la producción de metano (Nozhevnikova *et al.*, 2007; Kotsyurbenko *et al.*, 1993). Esto explica también la predominancia del ácido propiónico en los digestatos de FORSU fresca metanizada a una relación S/I = 0.5.

6.5.2 Metanización a 35 °C

En la metanización a 35 °C, el pH inicial de las mezclas (Tabla 6.12) registró valores entre 6.0 y 7.0 para la FORSU ensilada; mientras que para la FORSU fresca varió entre 7.1 y 7.6. Tanto para la FORSU ensilada como para la FORSU fresca, el pH inicial fue más alto para relaciones S/I más bajas. Sin excepción, el pH aumentó durante los 25 días de metanización para terminar con valores entre 7.3 y 8.2, lo que indica que no se produjo acumulación de AGV y que la metanización transcurrió sin perturbaciones. Según Forster–Carneiro (2005), cuando se logra un proceso equilibrado, las arqueas metanogénicas convierten los productos de la fermentación a la misma velocidad con la que se produce metano y dióxido de carbono, el pH del medio se estabiliza en valores ligeramente alcalinos (7.4 - 8.5), lo cual coincide con los resultados de este trabajo.

Tabla 6.12 Variación de pH durante la metanización a 35 °C

| ST en el ensilado (%) | Relación S/I | FORSU ensilada | | FORSU fresca | |
|-----------------------|--------------|----------------|-------|--------------|-------|
| | | Inicial | Final | Inicial | Final |
| 10 | 0.5 | 6.6 | 8.2 | 7.6 | 8.1 |
| | 1.0 | 6.3 | 8.1 | 7.3 | 8.0 |
| | 1.5 | 6.0 | 7.3 | 7.2 | 8.1 |
| 20 | 0.5 | 6.8 | 8.2 | 7.6 | 8.2 |
| | 1.0 | 6.5 | 8.1 | 7.3 | 8.1 |
| | 1.5 | 6.2 | 8.2 | 7.1 | 8.1 |
| 28 | 0.5 | 7.0 | 8.1 | 7.6 | 8.0 |
| | 1.0 | 6.8 | 8.1 | 7.3 | 8.1 |
| | 1.5 | 6.3 | 8.0 | 7.1 | 8.0 |

Como era previsible, por su alto grado de fermentación (Capítulo 6.3.2.2), las mezclas de FORSU ensilada registraron la mayor disminución del pH inicial en comparación con las mezclas con FORSU fresca. Lo anterior explica el hecho de que, según la Figura 6.23, las curvas de producción de CH₄ a partir de la FORSU ensilada presenten inicialmente una menor pendiente que las curvas de la FORSU fresca, lo cual se explica en que, los valores de pH iniciales más altos para la FORSU fresca favorecieron una mayor rapidez en la producción de metano y el consiguiente consumo del sustrato. No obstante, al final de la prueba de metanización, la producción de metano para la FORSU ensilada termina siendo mayor que para la FORSU fresca.

Resultados similares a los de este estudio fueron reportados por Schievano *et al.* (2014), quienes determinaron un aumento entre 23 y 43 % en la recuperación de energía a través de la producción de metano en un proceso de codigestión anaerobia de ensilado de maíz y residuos de frutas y verduras en un proceso de dos etapas. Liu *et al.* (2006) observaron un aumento del 21% en la producción de metano a partir de la digestión de residuos sólidos domésticos en reactores discontinuos operados en dos etapas (fermentación–metanización). Voelklein *et al.* (2016) registraron un aumento del 23 % en la producción de metano cuando utilizaron ensilados como sustrato para la digestión en dos etapas de un reactor metanogénico.

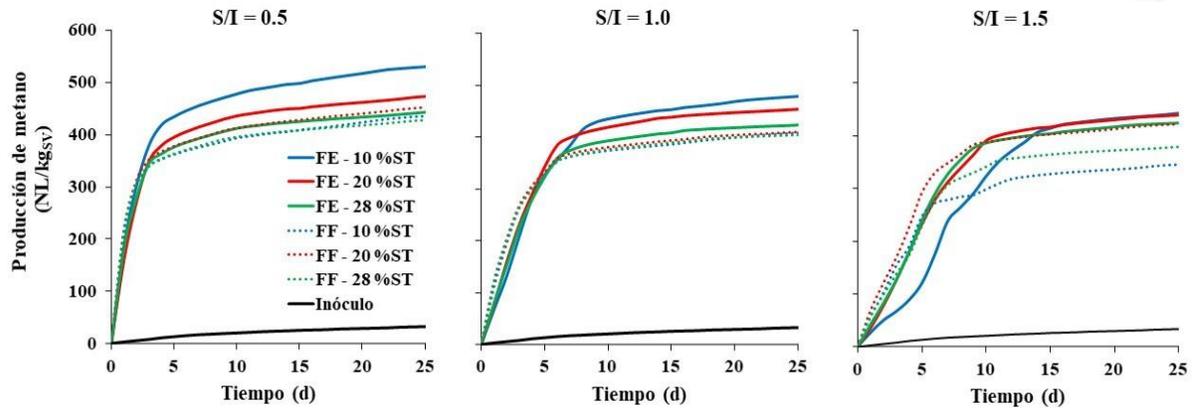


Figura 6.23 Producción bruta de metano de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) a 35°C

En la Tabla 6.13 se muestran los valores de producción de metano (P_{CH_4}) para las diferentes condiciones de concentración de sólidos durante el ensilado y de las relaciones S/I. Al igual que a 20 °C, la producción máxima de metano se determinó de acuerdo con el criterio recomendado por Holliger *et al.* (2016). Los resultados indican un aumento de entre 5 y 29 % en la producción de metano de la FORSU ensilada con respecto a la FORSU fresca, siendo mayor el aumento para la FORSU ensilada a 10 %_{ST} (17 – 29 %), mientras que, para 20 y 28 %, el aumento oscila entre 5 y 12 %.

Tabla 6.13 Producción de metano (P_{CH_4}) a 35 °C

| ST en el ensilado (%) | Relación S/I | Producción de CH ₄ (NL/kg _{sv}) | | ΔCH_4 (%) | Tiempo de reacción (d) | |
|-----------------------|--------------|--|--------------|-------------------|------------------------|--------------|
| | | FORSU Ensilada | FORSU Fresca | | FORSU Ensilada | FORSU Fresca |
| 10 | 0.5 | 431 | 349 | +23 | 11 | 6 |
| | 1.0 | 412 | 353 | +17 | 11 | 9 |
| | 1.5 | 406 | 314 | +29 | 17 | 14 |
| 20 | 0.5 | 383 | 364 | +5 | 10 | 10 |
| | 1.0 | 395 | 353 | +12 | 10 | 9 |
| | 1.5 | 393 | 374 | +5 | 13 | 11 |
| 28 | 0.5 | 361 | 345 | +5 | 10 | 10 |
| | 1.0 | 367 | 349 | +5 | 10 | 9 |
| | 1.5 | 378 | 339 | +12 | 12 | 12 |

ΔCH_4 representa la variación en la producción de la FORSU ensilada con respecto a la FORSU fresca

La mayor producción de metano a partir de FORSU ensilada es atribuida a que, durante el ensilado (hidrólisis-fermentación), se logra mejorar la biodisponibilidad de la fracción más difícilmente biodegradable del sustrato. Este efecto es reportado por Buffière *et al.* (2018), quienes investigaron las condiciones de hidrólisis durante la codigestión anaerobia de la mezcla de ganado y ensilado de maíz en sistemas de dos etapas. Reportan que el ensilado mejora significativamente la producción de metano dado que aumenta la accesibilidad de los microorganismos al material orgánico sin provocar necesariamente su solubilización. En cuanto al efecto de la concentración de sólidos, en la metanización de FORSU ensilada tanto a 20 °C como a 35 °C se observó una clara tendencia de una mayor producción de metano a menor %_{ST} durante el ensilado, lo cual indica que el mayor grado de fermentación alcanzado durante el ensilado afecta positivamente la producción de metano. Para la FORSU fresca no es posible establecer una tendencia ya que a 20 °C la producción de metano fue igual para 10 y 20 %_{ST}, mientras que a 35 °C la mayor producción se registró para 20 %_{ST}. Al respecto diversos autores (Motte *et al.*,

2013; Fernández *et al.*, 2008; Forster-Carneiro *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010; Abbassi-Guendouz *et al.*, 2012; Campuzano, 2015) reportan una mayor producción de metano a menor concentración de sólidos durante la digestión anaerobia de la FORSU. Sin embargo, en sus trabajos, la concentración de sólidos fue evaluada como un parámetro operacional aislado. Motte *et al.* (2013), evaluaron el efecto simultáneo de la concentración de sólidos, la relación S/I y el tamaño de partícula sobre la producción de metano a partir de paja de trigo, encontrando interacción negativa entre la concentración de sólidos y la relación S/I, lo cual indica que altas concentraciones de sólidos y altas relaciones S/I son desfavorables para la producción de metano.

De la Tabla 6.13 también se observa que para la FORSU ensilada a 10 %_{ST} los tiempos de reacción son mayores que para la FORSU fresca, lo cual explica que el alto contenido de metabolitos producto de la fermentación presentes en la FORSU ensilada y, por tanto, una transformación más lenta de estos a metano. A 20 y 28 %_{ST} no se observaron diferencias significativas en los tiempos de reacción para los dos sustratos. De acuerdo con Dasgupta y Chandel (2020), el tiempo de reacción durante la prueba de metanización, sirve como una guía para definir el tiempo de retención para el diseño de los reactores a gran escala. Esto es especialmente importante considerando que, con el ensilado de la FORSU a 20 y 28 %_{ST}, es posible aumentar la producción de metano sin que los tiempos de retención aumenten en comparación con la FORSU fresca, lo cual mejora la eficiencia del proceso al reducir el volumen de los reactores.

6.5.3 Metanización a 55 °C

La Tabla 6.14 muestra que los valores iniciales de pH para la FORSU ensilada fueron ligeramente alcalinos, con valores entre 6.9 y 7.5; mientras que para la FORSU fresca, los valores de pH iniciales fluctuaron entre 7.3 y 7.7. El hecho de que, a diferencia de la metanización a 35 °C, los valores de pH de las mezclas de FORSU ensilada a 55 °C no disminuyeran considerablemente, se debe a los bajos grados de fermentación (Figura 6.5) alcanzados durante el ensilado a 55 °C. Después de los 25 días de la prueba de metanización, los valores de pH oscilaron entre 7.8 y 8.1 para la FORSU ensilada y, entre 8.0 y 8.2 para la FORSU fresca. Dichos valores de pH indican que, al igual que a 35 °C, durante la prueba de metanización los AGV no se acumularon y que la metanogénesis fue posible sin ninguna perturbación.

Tabla 6.14 Variación de pH durante la metanización a 55 °C

| ST en el ensilado (%) | Relación S/I | FORSU ensilada | | FORSU fresca | |
|--------------------------|-----------------|----------------|-------|--------------|-------|
| | | Inicial | Final | Inicial | Final |
| 10 | 0.5 | 7.4 | 8.1 | 7.6 | 8.1 |
| | 1.0 | 7.0 | 8.1 | 7.5 | 8.2 |
| | 1.5 | 6.9 | 8.0 | 7.3 | 8.1 |
| 20 | 0.5 | 7.5 | 8.1 | 7.7 | 8.0 |
| | 1.0 | 7.4 | 8.0 | 7.5 | 8.1 |
| | 1.5 | 7.0 | 8.0 | 7.3 | 8.0 |
| 28 | 0.5 | 7.3 | 8.0 | 7.7 | 8.0 |
| | 1.0 | 7.2 | 8.0 | 7.6 | 8.1 |
| | 1.5 | 7.1 | 7.8 | 7.4 | 8.2 |

De las curvas de producción de metano mostradas en la Figura 6.24 se puede observar un comportamiento igual que para 20 y 35 °C, donde la producción de metano aumenta al disminuir la relación S/I. Sin embargo, la rapidez de producción sí muestra un comportamiento diferente, puesto que, la mayor pendiente inicial corresponde a las curvas de FORSU ensilada; mientras que a 20 y 35 °C; la mayor pendiente se observó para la FORSU fresca. Solamente para la relación S/I = 1.5, las pendientes

iniciales de las curvas de producción de metano resultaron mayores para la FORSU fresca que para la FORSU ensilada, siendo la curva de FORSU fresca con 10 %_{ST} la que presentó la mayor pendiente inicial.

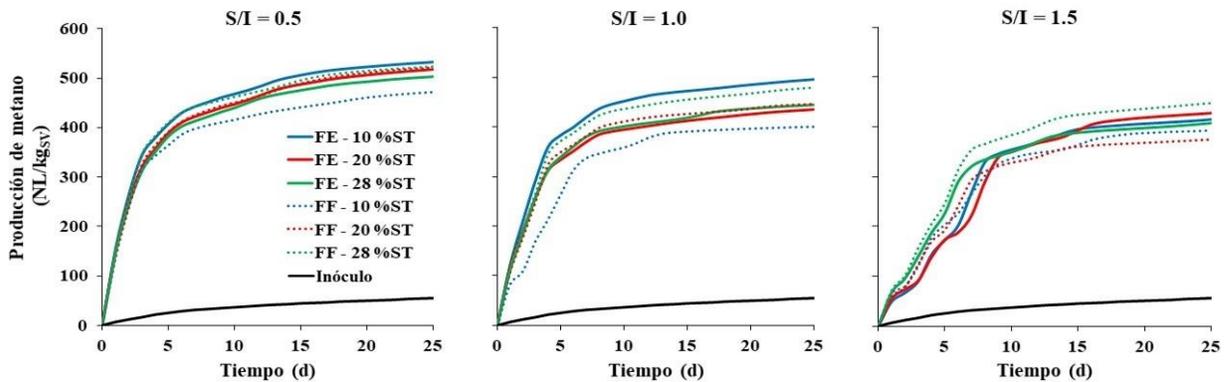


Figura 6.24 Producción bruta de metano de FORSU ensilada (FE) y FORSU fresca (FF) a 55 °C

En la Tabla 6.15 se muestra que, a diferencia de la metanización a 35 °C, a 55 °C la producción de metano a partir de FORSU ensilada solo resultó superior a la FORSU fresca para los ensilados con 10 %_{ST}, y a 20 %_{ST} con la relación S/I = 1.5. Lo anterior reafirma el efecto positivo del ensilado sobre la producción de metano, de modo que, a mayor grado de fermentación de la FORSU durante el ensilado, aumenta la producción de metano. Para 20 y 28 %_{ST}, la producción de metano a partir de FORSU fresca fue mayor que para FORSU ensilada, salvo para 20 %_{ST} con la relación S/I = 1.5.

Tabla 6.15 Producción de metano (P_{CH_4}) a 55 °C

| ST en el ensilado (%) | Relación S/I | Producción de CH ₄ (NL/kg) | | ΔCH_4 (%) | Tiempo de reacción (d) | |
|-----------------------|--------------|---------------------------------------|--------------|-------------------|------------------------|--------------|
| | | FORSU Ensilada | FORSU Fresca | | FORSU Ensilada | FORSU Fresca |
| 10 | 0.5 | 372 | 329 | +13 | 8 | 8 |
| | 1.0 | 407 | 340 | +20 | 10 | 14 |
| | 1.5 | 366 | 320 | +14 | 16 | 12 |
| 20 | 0.5 | 350 | 354 | -1 | 8 | 8 |
| | 1.0 | 348 | 364 | -4 | 9 | 10 |
| | 1.5 | 377 | 327 | +15 | 18 | 15 |
| 28 | 0.5 | 343 | 368 | -7 | 8 | 8 |
| | 1.0 | 354 | 390 | -9 | 9 | 10 |
| | 1.5 | 354 | 390 | -9 | 15 | 15 |

ΔCH_4 representa la variación en la producción de la FORSU ensilada con respecto a la FORSU fresca

De la Tabla 6.15 también se observa que para la relación S/I = 0.5, a pesar de que sí hubo diferencias en la producción de metano para la FORSU ensilada y fresca, no hubo diferencias entre los tiempos de reacción, lo cual indica que, en ambos casos, la cantidad de inóculo añadida fue suficiente para permitir la rápida conversión de los compuestos orgánicos a metano. Para las relaciones S/I = 1.0 y 1.5, los tiempos de reacción varían para cada sustrato, pero el comportamiento es opuesto al observado durante la metanización a 35 °C, puesto que a 55 °C los mayores tiempos de reacción se observaron para la FORSU fresca. Esto se explica los bajos grados de fermentación alcanzados a 55 °C (Figura 6.5) y por

tanto no hubo grandes concentraciones de metabolitos fermentativos en la mezcla inicial de la FORSU ensilada con el inóculo.

6.5.4 Análisis comparativo de las condiciones de metanización

6.5.4.1 Producción de metano

A partir de los datos de producción-máxima de metano mostrados en las tablas 6.13 y 6.15 se realizaron análisis de regresión múltiple para la FORSU ensilada y para la fresca, con el fin de establecer la relación entre las variables independientes (temperatura, concentración de sólidos durante el ensilado y la relación S/I durante la metanización) y su efecto sobre la producción máxima de metano. Para realizar los análisis de regresión múltiple se utilizó la herramienta de análisis Solver del programa Microsoft Excel. Los datos para 20 °C no se consideraron en el análisis porque no se produjo metano en todas las condiciones de análisis. Para el análisis de regresión se estableció un nivel de confianza del 95 %.

En la Tabla 6.16 se muestran los *valores p* del análisis de varianza (ANOVA) de las regresiones, así como los respectivos modelos de regresión y sus coeficientes de correlación (R^2) ajustados. De los ANOVA se obtuvo que para la FORSU ensilada, la concentración de sólidos (%_{ST}) durante el ensilado es el parámetro operacional con la mayor influencia para alcanzar una mayor producción de metano, de modo que cuando la FORSU es ensilada a bajas concentraciones de sólidos es posible producir más metano. Esto reafirma el efecto positivo del ensilado mejorando la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos de la FORSU para la posterior etapa de metanización. Para la FORSU fresca, a 35 °C, tanto para la concentración de sólidos (%_{ST}) como para la relación S/I el *valor p* resultó mayor a 0.05, lo cual indica que ninguno de los dos parámetros es influyente sobre la producción de metano. Solo para 55 °C fue posible establecer un modelo de predicción de la producción de metano para la FORSU fresca, resultando que, al igual que para la FORSU ensilada, la concentración de sólidos (%_{ST}) es el parámetro que influye significativamente sobre la producción de metano. Sin embargo, para la FORSU fresca el efecto de la concentración de sólidos sobre la producción de metano es opuesto que para la FORSU ensilada. Para la FORSU ensilada la producción de metano aumenta al disminuir la concentración de sólidos (%_{ST}), mientras que la FORSU fresca la producción de metano aumenta al aumentar la concentración de sólidos (%_{ST}).

Tabla 6.16 Modelos de regresión para la producción de metano

| Temperatura (°C) | Sustrato | Variable | valor-p | Modelo | R ² ajustado |
|------------------|----------------|------------------------|------------------|--|-------------------------|
| 35 | FORSU Fresca | % _{ST} S/I | 0.6447 0.5163 | - | -0.1921 |
| | FORSU Ensilada | % _{ST} S/I | 9.4E-05 0.941 | $P_{CH_4} = -2.647 \cdot \%_{ST} + 442.44$ | 0.8111 |
| 55 | FORSU Fresca | % _{ST} S/I | 7.1E-03 0.741 | $P_{CH_4} = 2.893 \cdot \%_{ST} + 301.97$ | 0.6459 |
| | FORSU Ensilada | % _{ST} S/I | 0.046 0.419 | $P_{CH_4} = -1.759 \cdot \%_{ST} + 386.49$ | 0.3851 |

De los modelos de regresión se puede observar que del ensilado y metanización de la FORSU a 35 °C resulta una mayor producción de metano que a 55 °C. Estos resultados son especialmente importantes como base para recomendar un proceso de ensilado y metanización de la FORSU a 35 °C, puesto que,

además de permitir una mayor producción de metano, también presenta la ventaja de menores requerimientos de energía con respecto al proceso en condiciones termofílicas. Vindis *et al.* (2009) afirman que la metanización mesófila es más efectiva que la psicrófila o termófila porque los microorganismos se adaptan mejor a esta temperatura y logran una mejor hidrólisis que a otras temperaturas. Así mismo, a temperaturas medias los microorganismos pueden tolerar variaciones de temperatura de $\pm 3^\circ\text{C}$ sin afectar el proceso (Zupančić y Grilc, 2012). Según De Baere y Mattheeuws, (2012), debido a que la digestión anaerobia mesófila es más estable y versátil que a otras temperaturas, la mayoría de las instalaciones que producen metano operan en estas condiciones.

En la literatura se reportan diversos estudios comparativos de la digestión anaerobia en condiciones mesofílicas y termofílicas para diferentes residuos sólidos orgánicos (Tabla 6.17). Contrario a los resultados de producción de metano a partir de FORSU fresca en este trabajo, en general, se reporta que en condiciones termofílicas se mejora la biodegradabilidad de los sustratos, lo cual se refleja en mayores tasas de producción de metano y un mayor contenido de metano en el biogás.

Tabla 6.17 Producción de metano de residuos sólidos orgánicos durante la digestión anaerobia mesofílica y termofílica

| Sustrato | Parámetros de operación | Temperatura (°C) | Producción de CH ₄ (NL/kgsv) | Referencia |
|-----------------------------------|---|------------------|---|--|
| Ensilado de maíz | 34 – 38 % _{ST} , S/I = 0.04 | 35 | 457 - 401 | Vindi <i>et al.</i> (2009) |
| | | 55 | 494 - 611 | |
| FORSU | 18 % _{ST} | 37 | 591 | Gallert y Winter (1997) |
| | | 55 | 541 | |
| FORSU | 20 % _{ST} , S/I = 0.2 | 35 | 0.0072 * | Fernández - Rodríguez <i>et al.</i> (2013) |
| | | 55 | 0.0149 * | |
| FORSU | 20 % _{ST} | 35.8 | 200 | Cecchi <i>et al.</i> (1993) |
| | | 55 | 240 | |
| FORSU | 20, 25 y 30 % _{ST} | 35 | 350, 210, 30 | Li <i>et al.</i> (2014) |
| | | 55 | 350, 350, 75 | |
| Fracción semi líquida de la FORSU | 18.8 % _{ST} | 37 | 790 | Micolucci <i>et al.</i> (2015) |
| | | 55 | 900 | |

* m³CH₄/gDQO

6.5.4.2 Tiempos de reacción

Al igual que para la producción máxima de metano, para los tiempos de reacción también se realizaron análisis de regresión múltiple para la FORSU ensilada y fresca (Tabla 6.18). Para los dos sustratos y las dos temperaturas, la relación S/I es el parámetro que determina el tiempo de reacción. Al aumentar la relación S/I aumenta el tiempo de reacción.

A 55 °C se obtuvieron los *valores p* más bajos, lo cual indica que a esta temperatura la influencia de la relación S/I sobre los tiempos de reacción es aún más significativa que a 35 °C. De los modelos de regresión se deduce que a 35 °C los tiempos de reacción son mayores para la FORSU ensilada que para la FORSU fresca, mientras que, para 55 °C, no hay diferencias significativas entre los dos sustratos. Esto se explica en los mayores grados de fermentación obtenidos a 35 °C que a 55 °C.

Un comportamiento similar fue reportado por Di Maria *et al.* (2012), quienes evaluaron el aprovechamiento energético de la FORSU procesada en una planta de tratamiento biológico mecánico con recirculación de digestato sólido, operada a 35 °C. Los resultados indicaron que para relaciones de FORSU:inóculo variando desde 1:1 hasta 1:3 (con base en peso húmedo), la producción de energía aumentó de 100 kWh/tonelada a aproximadamente 380 kWh /tonelada. No obstante, desde el punto de

vista económico, se encontró que la recirculación del digestato como inóculo es rentable en proporciones desde 1:1.5 a 1:2.5. Lin y Li (2017) evaluaron relaciones sustrato/inóculo (S/I) de 1, 2 y 3, con base seca, durante la digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos. El experimento se llevó a cabo a 55 °C con 22 %_{ST}. La relación S/I de 1 mostró un mayor rendimiento de metano (hasta un 11.5 %) y productividad volumétrica significativamente mayores.

Tabla 6.18 Modelos de regresión para los tiempos de reacción

| Temperatura (°C) | Sustrato | Variable | valor p | Modelo | R ² ajustado |
|------------------|----------------|------------------------|------------------|--|-------------------------|
| 35 | FORSU Fresca | % _{ST} S/I | 0.664 0.046 | $T_{\text{máx}} = 3.67 \cdot S/I + 5.62$ | 0.3610 |
| | FORSU Ensilada | % _{ST} S/I | 0.098 0.024 | | |
| 55 | FORSU Fresca | % _{ST} S/I | 0.808 4.5E-03 | $T_{\text{máx}} = 6 \cdot S/I + 5.48$ | 0.6857 |
| | FORSU Ensilada | % _{ST} S/I | 0.699 1.5E-03 | | |

Según Karthikeyan y Visvanathan (2013), en la digestión anaerobia de la FORSU se requiere una mayor cantidad de inóculo para un mejor rendimiento de biogás, especialmente para operaciones por lote, con porcentajes de inóculo que oscilan entre 10 y 60% de la masa total por digerir. Tecnologías a gran escala como BEKON utiliza el 50% del residuo digerido como inóculo para iniciar un nuevo lote de digestión en seco. En los procesos DiCOM, el lixiviado procedente de un reactor madurado se utiliza como fuente de microorganismos para sembrar el siguiente lote. En reactores continuos generalmente se usa el 50-70% de recirculación como inóculo (Karthikeyan y Visvanathan, 2013). En un proceso de digestión anaerobia seca se ha demostrado que las relaciones S/I de 0.4 – 0.6 (base seca) minimizan los costos de tratamiento de los digestatos (Di Maria *et al.*, 2012).

6.5.4.3 Cinética de la producción de metano

Con el fin de determinar el efecto de la temperatura sobre la rapidez de producción de metano a partir de FORSU ensilada y fresca metanizada a diferentes concentraciones de sólidos y relaciones S/I, se realizó el ajuste de los datos experimentales utilizando los modelos cinéticos de Tessier y Monod. Las Figuras 6.25 y 6.26 muestran los ajustes a los modelos cinéticos para la producción de metano a 35 °C a partir de FORSU ensilada y FORSU fresca, respectivamente. Las Figuras 6.27 y 6.28 muestran los ajustes a los modelos cinéticos para la producción de metano a 55 °C a partir de FORSU ensilada y FORSU fresca, respectivamente. El ajuste se muestra para los tiempos de reacción determinados de acuerdo con el criterio de Holliger *et al.* (2016). El metano producido más allá del tiempo de reacción es considerado una producción endógena.

En las figuras también se muestran los coeficientes de correlación (R²) para los dos modelos cinéticos empleados, pudiéndose observar que, en todos los casos, el mejor ajuste se obtiene para el modelo de Tessier. De acuerdo con Wang y Witarsa (2016) el modelo de Tessier, también conocido como el modelo exponencial, presenta un mejor ajuste que el modelo de Monod, gracias a que tiene en cuenta que parte de la energía bioquímica se utilizará para mantener funciones celulares distintas del crecimiento celular. En otros estudios sobre digestión anaerobia de la FORSU (Sajeena Beevi *et al.*, 2015; Campuzano, 2015; Nielfa *et al.*, 2015) también se ha reportado que el modelo exponencial es útil y adecuado para predecir la producción de metano.

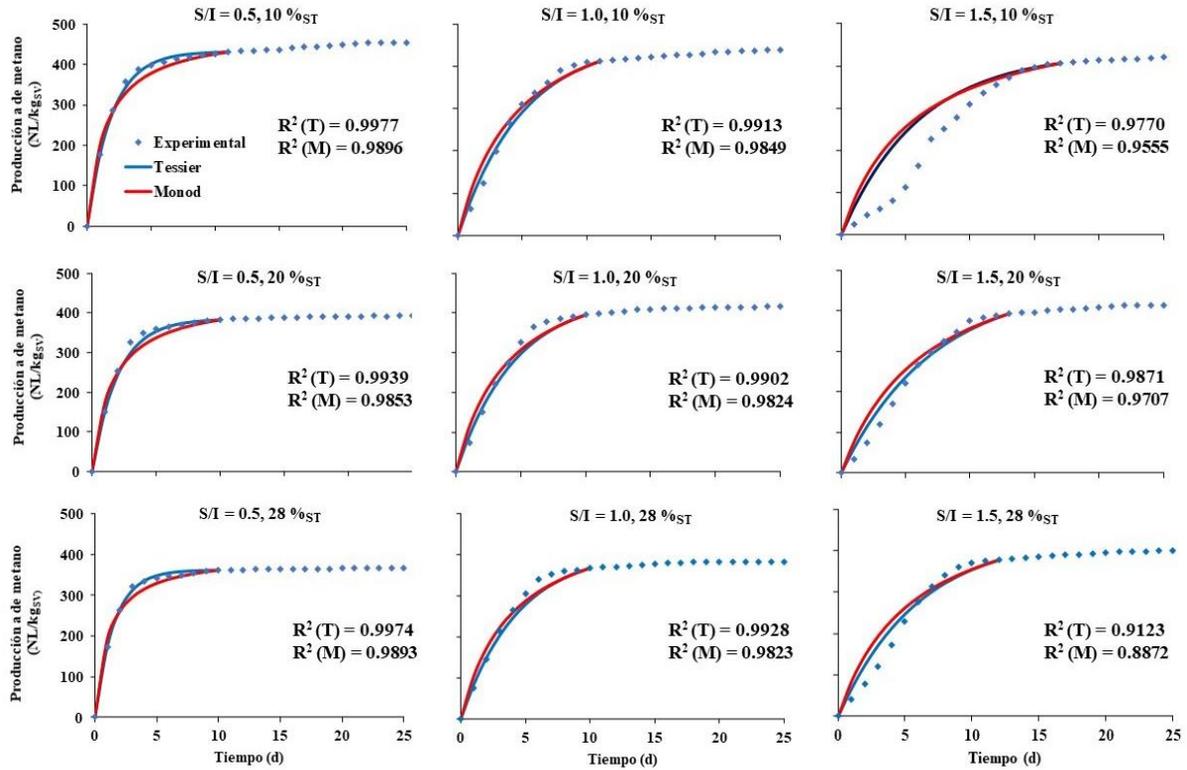


Figura 6.25 Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU ensilada metanizada a 35 °C

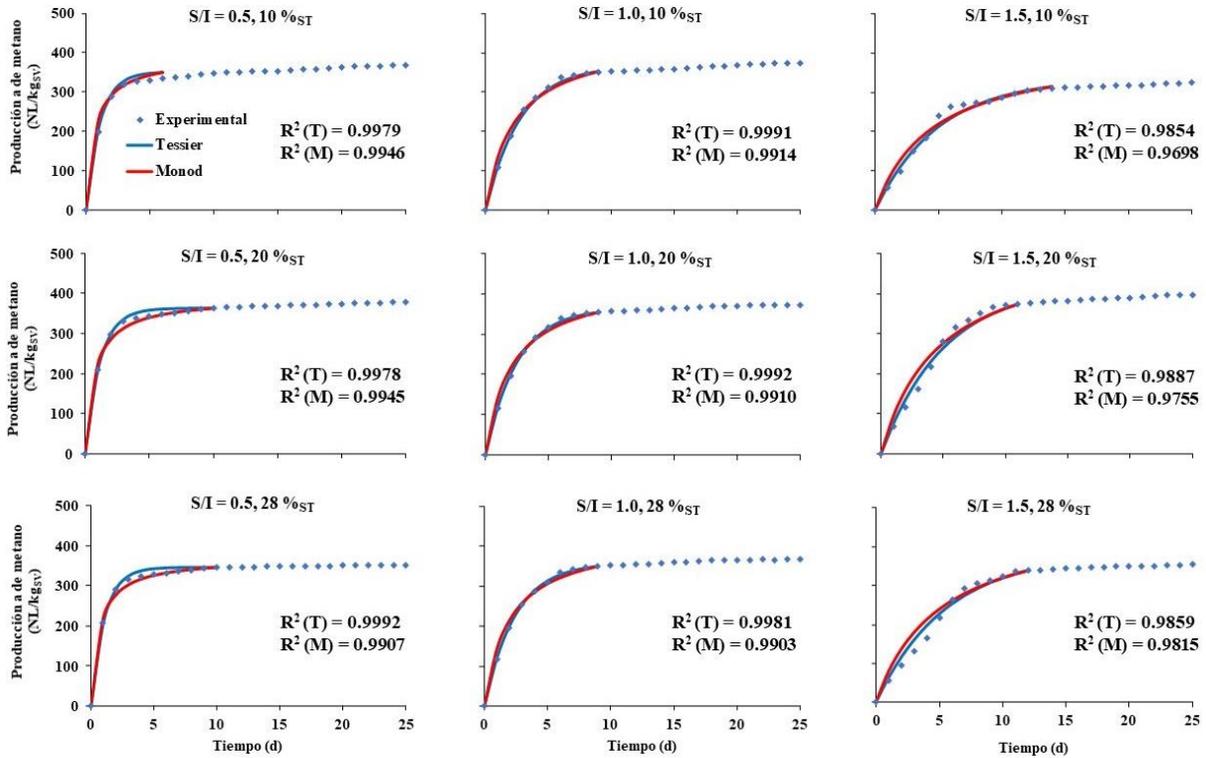


Figura 6.26 Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU fresca metanizada a 35 °C

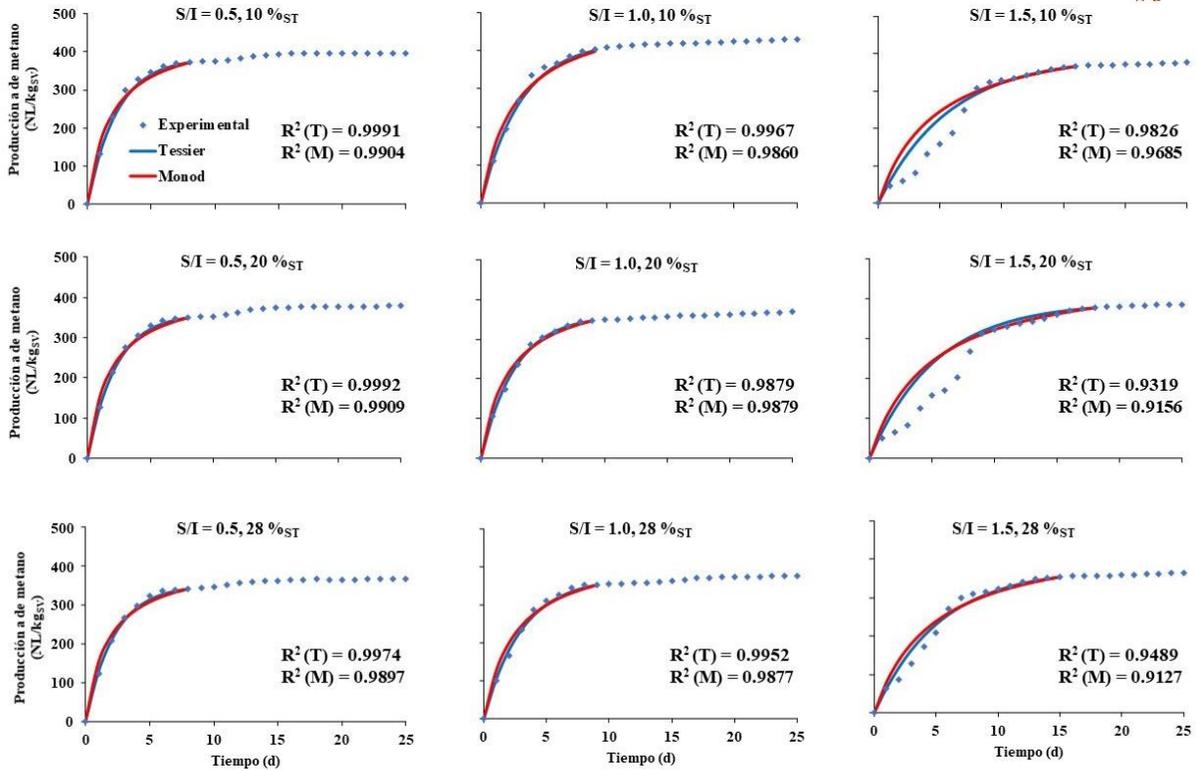


Figura 6.27 Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU ensilada metanizada a 55 °C

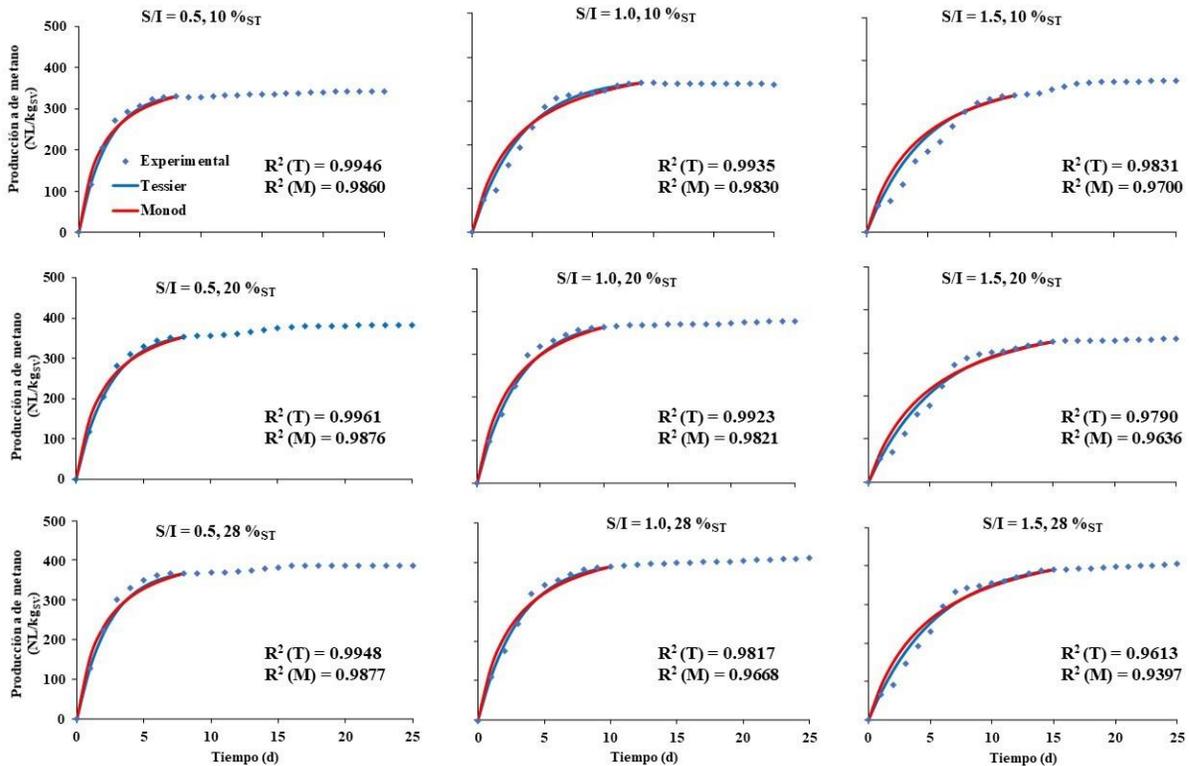


Figura 6.28 Ajuste de modelos cinéticos de Tessier (T) y tipo Monod (M) para FORSU fresca metanizada a 55 °C

En la Figura 6.29 se muestran las constantes de velocidad de reacción (Capítulo 5.7) obtenidas del ajuste al modelo de Tessier para FORSU ensilada y fresca a diferentes temperaturas según la concentración de sólidos durante el ensilado y la relación S/I durante la metanización. Puede observarse que durante la metanización a altas relaciones S/I, las constantes de reacción no muestran diferencias significativas cuando se compara entre temperaturas y entre FORSU ensilada y FORSU fresca. A bajas relaciones S/I, las constantes de velocidad son mayores a 35 °C que a 55 °C. A 35 °C y relación S/I = 0.5, la constante de velocidad es mayor para la FORSU fresca que para la FORSU ensilada, mientras que a 55 °C no se observan diferencias significativas entre ambos sustratos, lo cual se explica en el grado de fermentación (Figura 6.5) alcanzado durante el ensilado a cada temperatura.

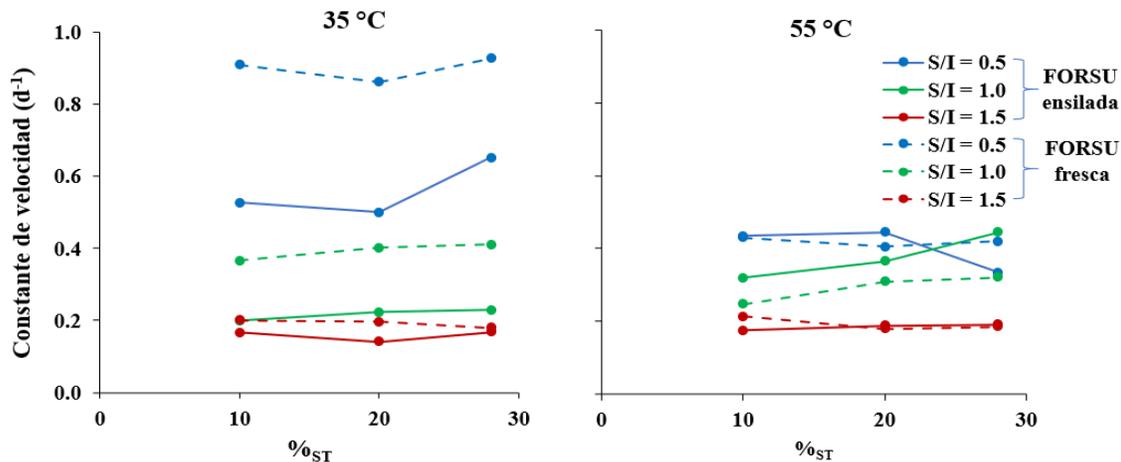


Figura 6.29 Constantes de velocidad de producción de metano

Por otra parte, se observa que, tanto a 35 como a 55 °C, la concentración de sólidos no tiene un efecto notable sobre la velocidad de producción de metano. A 55 °C, se observa un efecto menos pronunciado de la relación S/I y la concentración de sólidos sobre las constantes de velocidad en comparación a lo observado a 35 °C.

A partir de los valores de las constantes de velocidad de producción de metano para cada temperatura mostrados en la Figura 6.29 se realizaron análisis de regresión múltiple para determinar la interacción entre las variables de operación (concentración de sólidos durante el ensilado y la relación S/I durante la metanización) y su efecto sobre las constantes de velocidad (Tabla 16.9).

Tabla 6.19 Modelos de regresión para las constantes de velocidad

| Temperatura (°C) | Sustrato | Variable | valor p | Modelo | R ² ajustado |
|------------------|----------------|-----------------|---------|---------------------------|-------------------------|
| 35 | FORSU Fresca | % _{ST} | 0.863 | K = - 0.7 · S/I + 1.187 | 0.9160 |
| | FORSU Ensilada | S/I | 8.0E-05 | | |
| 55 | FORSU Fresca | % _{ST} | 0.539 | K = - 0.4 · S/I + 0.659 | 0.7703 |
| | FORSU Ensilada | S/I | 1.8E-03 | | |
| 35 | FORSU Fresca | % _{ST} | 0.618 | K = - 0.225 · S/I + 0.514 | 0.9292 |
| | FORSU Ensilada | S/I | 4.8E-05 | | |
| 55 | FORSU Fresca | % _{ST} | 0.368 | K = - 0.257 · S/I + 0.562 | 0.9692 |
| | FORSU Ensilada | S/I | 3.9E-06 | | |

Con un nivel de confianza de 95 %, los análisis ANOVA de la regresión (Tabla 6.19) arrojaron que a 35 y 55 °C, para la FORSU ensilada y fresca, la relación S/I es el parámetro que determina la rapidez con la que el metano es producido. Esto se observa también en los modelos de predicción generados del análisis de regresión, de modo tal que, a menor relación S/I aumenta la rapidez de producción de metano. Estos resultados son congruentes con los encontrados para los tiempos de reacción (Tabla 6.18), donde al aumentar la relación S/I aumenta el tiempo de reacción.

Al comparar entre temperaturas, se observa que las constantes de velocidad de producción de metano a partir de FORSU ensilada es mayor a 55 °C que a 35 °C. Resultados similares son reportados por Fernández-Rodríguez *et al.* (2013), quienes al comparar la digestión anaerobia mesofílica y termofílica de FORSU observaron una mayor velocidad de producción de metano en condiciones termofílicas, debido a que a mayor temperatura la actividad microbiana se ve favorecida y aumentan las tasas de degradación del sustrato (Krause *et al.*, 2018). En este trabajo, para la FORSU ensilada debe considerarse además que a 35 °C se produjo un mayor grado de fermentación (Figura 6.5) durante el ensilado, lo cual afecta la velocidad inicial con que los metabolitos acumulados en la etapa fermentativa son transformados a metano.

Para la producción de metano a partir de FORSU fresca se observó un comportamiento opuesto al observado para la FORSU ensilada, ya que la rapidez de producción de metano resultó mayor a 35 °C que a 55 °C. Este comportamiento puede asociarse con la mayor relación de SV/ST del inóculo adaptado a 35 °C (0.72) comparado con el inóculo adaptado a 55 °C (0.69), lo cual implicó una mayor actividad metanogénica a 35 °C que a 55 °C. Este efecto es reportado por diversos autores (Alibardi y Cossu, 2015; Browne y Murphy, 2013) quienes obtuvieron valores más altos de las constantes de velocidad cuando utilizaron inóculos con una mayor relación SV/ST.

7. CONCLUSIONES

Este trabajo trata sobre la evaluación del almacenamiento controlado de la FORSU, como proceso de ensilado, que permita su mayor aprovechamiento para mejorar la posterior producción de metano. El trabajo experimental incluyó la evaluación de diferentes condiciones de ensilado de la FORSU y de metanización de la FORSU ensilada y fresca, y se desarrolló en tres etapas:

1. **Ensilado de la FORSU.** Se evaluaron diferentes temperaturas (20, 35 y 55 °C) y concentración de sólidos (10, 20 y 28 %_{ST}) con el fin de determinar en cuáles de ellas el ensilado es más efectivo.
2. **Aclimatación de inóculos metanogénicos.** Se llevó a cabo la adaptación de microorganismos en FORSU a tres diferentes temperaturas (20, 35 y 55 °C) para su posterior uso como inóculos metanogénicos.
3. **Metanización de la FORSU ensilada.** Utilizando como inóculos los digestatos preparados en la etapa anterior, se evaluó la metanización a diferentes temperaturas (20, 35 y 55 °C) y relación sustrato a inóculo (0.5, 1.0 y 1.5) a fin de determinar con cuál combinación de ellas se logra una mayor producción de metano a partir de la FORSU ensilada.

A continuación, se presentan las conclusiones para cada etapa.

Ensilado de la FORSU

- Independientemente de la temperatura de ensilado, el grado de fermentación de la FORSU aumenta al disminuir la concentración de sólidos, lo cual comprueba parcialmente la hipótesis planteada para el ensilado de la FORSU.
- El ácido láctico es el principal metabolito producido para todas las condiciones de temperatura y concentración de sólidos evaluadas. Etanol y ácido acético son los metabolitos de mayor producción después del ácido láctico.
- La energía de activación para la fermentación de la FORSU durante el ensilado guarda una relación lineal con la concentración de sólidos. Al disminuir la concentración de sólidos disminuye la energía requerida para que las reacciones de fermentación se produzcan.
- A 20 y 35 °C la FORSU alcanza grados de fermentación similares. Sin embargo, a 35 °C la fermentación ocurre más rápidamente que a 20 °C. A 55 °C la fermentación de la FORSU solo es significativa en el ensilado a bajas concentraciones de sólidos.
- Durante el ensilado, la pérdida de materia orgánica asociada con la producción de biogás es proporcional al grado de fermentación que alcanza la FORSU.
- Bajo todas las condiciones de ensilado realizadas en este trabajo, el potencial bioquímico de metano (PBM) de la FORSU ensilada es menor que el PBM de la FORSU fresca. El menor valor del PBM de la FORSU ensilada se registra a 20 °C, debido a que a esta temperatura la fermentación ocurre más lentamente.

- El ensilado de la FORSU resulta ser más efectivo a 35 °C y 10 %_{ST} que, bajo cualquier otra condición, ya que, bajo estas condiciones, la FORSU alcanza el mayor grado de fermentación y el ensilado requiere el menor tiempo para alcanzar la fase estable.

Aclimatación de FORSU a diferentes temperaturas para ser usada como inóculo metanogénico

- Durante la aclimatación de FORSU como digestato metanogénico a 20 °C, la producción de metano disminuye al aumentar la carga orgánica debido a la acumulación de ácidos grasos volátiles.
- De las tres temperaturas, a 35 °C la aclimatación del inóculo se lleva a cabo sin incidentes, observándose una operación estable de los reactores. Esto se debe a que los microorganismos usados como inóculo ya estaban adaptados a esa temperatura, aunque no al sustrato.
- El aumento súbito de temperatura y el aumento gradual de la carga orgánica es una estrategia efectiva para la aclimatación del inóculo termofílico a partir de la FORSU.
- El tiempo de aclimatación de inóculos metanogénicos a utilizando FORSU como sustrato, resultó en 38, 25 y 114 días para 20, 35 y 55 °C, respectivamente.
- A 20 y 55 °C, una vez que los reactores alcanzaron condiciones estables de operación, el aumento de la carga orgánica no afectó significativamente el pH y el contenido de metano en el biogás (mayor al 60 %).

Metanización de-FORSU ensilada y fresca

- Utilizando como inóculo el digestato previamente adaptado, a 20 °C la metanización de FORSU ensilada y fresca a altas relaciones S/I resulta inhibida por la acumulación de ácidos grasos volátiles, asociada con el lento crecimiento de los microorganismos metanogénicos.
- A 35 y 55 °C, la producción de metano de FORSU ensilada a 10 %_{ST} muestra, bajo todas las condiciones de temperatura y relación S/I, una mayor producción de metano que la de FORSU fresca. La producción de metano aumenta al disminuir la relación S/I, lo cual comprueba la segunda hipótesis del este trabajo.
- Durante la metanización de FORSU ensilada y fresca, la concentración de sólidos es el parámetro determinante para aumentar la producción de metano. Al disminuir la concentración de sólidos aumenta la producción de metano.
- La relación S/I es el parámetro que más influye sobre los tiempos de reacción durante la metanización de FORSU ensilada y fresca. Al disminuir la relación S/I disminuye el tiempo de reacción.
- A 55°C se observa una mayor rapidez en la producción de metano que a 35 °C para la FORSU ensilada y fresca. A 55 °C la actividad microbiana se ve favorecida y la producción de metabolitos durante el ensilado es menor que a 35 °C.
- A 35 °C, la producción de metano a partir de la FORSU ensilada es mayor que a partir de la FORSU fresca para todas las condiciones de concentración de sólidos durante la fermentación previa y relación S/I durante la metanogénesis.
- A 35 y 55 °C, la metanización de la FORSU fresca utilizando digestato como inóculo resulta en una producción de metano mayor al potencial bioquímico de metano (PBM) de la FORSU fresca (318 NL/kg_{SV}). Este efecto se debe a que, en los lodos granulares utilizados como inóculo en la PBM el contenido de materia orgánica (SV) está constituido principalmente por microorganismos, mientras que, en el digestato de la FORSU, además de microorganismos también está contenida materia orgánica residual no degradada.

8. REFERENCIAS

- Abbassi-Guendouz, A., Brockmann, D., Trably, E., Dumas, C., Delgenès, J. P., Steyer, J. P., Escudié, R. 2012. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresource Technology*, 111, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.174>
- Adekunle, K. F., Okolie, J. A. 2015. A review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(3), 205–212. DOI: 10.4236/abb.2015.63020
- Adesogan, A. T., Newman, Y. C. 2014. Silage harvesting, storing, and feeding. IFAS Extension, University of Florida, Gainesville. Accessed May 19, 2017. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AG/AG18000.pdf>
- Ahmad, F., Tariq Jameel, A., Hider Kamarudin, M., Mel, M. 2011. Study of growth kinetic and modeling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 16(81), 18842-18846. DOI: 10.5897/AJB11.2763
- Ajay, K. J., Jianzheng, L., Loring, N., Liguó, Z. 2011. Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes. *African Journal of Biotechnology*, 10(65), 14242–14253. DOI: 10.5897/AJB11.1277
- Alibardi, L., Cossu, R. 2015. Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Management*, 36, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>
- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Janssen, R. 2008. Biogas Handbook. University of Southern Denmark. Esbjerg, Denmark
- Amiri, L., Ali Abdoli, M., Gitipour, S., Madadian, E. 2017. The effects of co-substrate and thermal pretreatment on anaerobic digestion performance. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 38(18), 2352-2361. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2016.1260643>
- André, L., Pauss, P., Ribeiro, T. 2017. Solid anaerobic digestion: State-of-art, scientific and technological hurdles. *Bioresource Technology*, 247, 1027-1037. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.003>
- Angelidaki, I., Chen, X., Cui, J., Kaparaju, P., Ellegaard, L., 2006. Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: Start-up procedure for continuously stirred tank reactor. *Water Research*. 40 (14), 2621–2628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.015>
- Appels, L., Lauwers, J., Degrève, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Van Impe, J., Dewil, R. 2011. Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (9), 4295-4301. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.121>
- Asia, I., Oladoja, N. 2006. Treatment of textile sludge using anaerobic technology. *African Journal of Biotechnology*, 5 (18), 1678- 1683.
- ASTM Standard Test Method for Determination of the Composition of Unprocessed Municipal Solid Waste. 2016. ASTM D5231-92 ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Banco Mundial. 2018. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050, Washington D.C., EE UU.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Vavilin, V. A. 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, 45(10), 65–73. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.678>
- Benabdallah El Hadj, T., Astals, S., Galí, A., Mace y S., Mata-Alvarez, J. 2009. Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW. *Water Science and Technology*, 59, 1153–1158. DOI: 10.2166/wst.2009.100
- Bochmann, G., Montgomery, L. 2013. Pretreatment of feedstock for enhanced biogas production. Energy Technology Network. IEA Bioenergy.
- Bolsen, K. K., Ashbell, G., Weinberg, Z. G. 1996. Silage fermentation and silage additives-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 9(5), 483-493. DOI: 10.5713/ajas.1996.483
- Bolzonella, D., Innocenti, L., Pavan, P., 2003. Semi-dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction

- of municipal solid waste: focusing on the start-up phase. *Bioresorce Technology*, 86 (2), 123–129. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00161-X)
- Bolzonella, D., Pavan, P., Mace, S., Cecchi, F. 2006. Dry anaerobic digestion of differently sorted organic municipal solid waste: A full-scale experience. *Water Science and Technology*, 53(8), 23–32. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.232>
- Borshchevskaya, L.N., Gordeeva, T., Kalinina, A.N. Pavlovich, S. 2016. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), 755-758. <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., Muck, R. E. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101, 3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Boušková, A., Dohányos, M., Schmidt, J. E. Angelidaki, I. 2005. *Water Research*, 39, 1481-1488. DOI: 10.1016/j.watres.2004.12.042
- Braguglia, C. M., Gallipoli, A., Gianico, A., Pagliaccia, P. 2017. Anaerobic bioconversion of food waste into energy: A critical review. *Bioresource Technology*, 248, 37-56. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.145
- Browne, J., Murphy, J. 2013. Assessment of the resource associated with biomethane from food waste. *Applied Energy* 104, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.017>
- Browne, J., Gilkinson, S., Frost, J. P. 2015. The effects of storage time and temperature on biogas production from dairy cow slurry. *Biosystems Engineering*, 129, 48-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.09.008>
- Buffière, P., Dooms, M., Hattou, S., Benbelkacem, H. 2018. The hydrolytic stage in high solids temperature phased anaerobic digestion improves the downstream methane production rate. *Bioresource Technology*, 259, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.037>
- Burke, D. A. 2001. Dairy waste anaerobic digestion handbook. Option for recovering beneficial products from dairy manure. Environmental Energy Company. Olympia Washington, EEUU. Pp. 16-35
- Cajigas, A., Pérez, A., Torres, P. 2005. Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción del almidón de yuca. *Csientia et Technica*, (27), 243-248
- Campuzano, R. 2015. Lixiviación de residuos sólidos orgánicos urbanos para incrementar la rapidez de producción de biogás. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Campuzano, R. González-Martínez, S. 2015. Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase Methane production. *Bioresource Technology*, 178, 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.042>
- Campuzano, R., González-Martínez, S. 2016. Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, 54, 3 -12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>
- Cao, X., Jiang, Z., Cui, W., Wang, Y., Yang, P. 2016. Rheological properties of municipal sewage sludge: dependency on solid concentration and temperature. *Procedia Environmental Sciences*, 21, 113-121. DOI: 10.1016/j.proenv.2016.02.016
- Cavinato, C., Da Ros, C., Pavan, P., Bolzonella, D. 2017. Influence of temperature and hydraulic retention on the production of volatile fatty acids during anaerobic fermentation of cow manure and maize silage. *Bioresource Technology*, 223, 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.041>
- Cecchi, F., Bolzonella, D., Pavan, P., Mace, S., Mata – Álvarez, J. 1993. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste for methane production: Research and industrial application. *Comprehensive Biotechnology*, 6, 463 – 472. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00332-9
- Cecchi, F., Traverso, P., Pavan, P., Bolzonella, D., Innocenti, L. 2003. Characteristics of the OFMSW and behaviour of the anaerobic digestion process. *ChemInform*, 34(13), 141-168. DOI: 10.1002/CHIN.200313272
- Cesaro, A., Belgiorno, V. 2014. Pretreatment methods to improve anaerobic biodegradability of organic municipal solid waste fractions. *Chemical Engineering Journal*, 240, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.055>
- Chandler, R. The effect of temperature and water activity on microbial growth rate and food spoilage. Doctoral Thesis. University of Tasmania. Hobart, Australia.
- Chaudhary, B. K. 2008. Dry continuous anaerobic digestion of municipal solid waste in thermophilic conditions. Tesis de maestría. Asian Institute of Technology. School of Environment, Resources and Development. Thailand.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource*

- Technology*, 99(10), 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Choi, H.-J., Lee, S.-Y. 2019. Advances in microalgal biomass/bioenergy production with agricultural by-products: Analysis with various grow rate models. *Environmental Engineering Research*, 24(2), 271–278. <https://doi.org/10.4491/eer.2018.193>
- Colombatto, D., Mould, F. L. 2004. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Animal Feed Science and Technology*, 111(1-4), 111–128. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2003.08.010
- Cummins, C. S., Johnson, J. L. 1992. The genus *Propionibacterium*. p. 834–849. In A. Balows *et al.* (ed.) *The prokaryotes*. 2nd ed. Springer Verlag, New York.
- Daeschel, M.A., Andersson, R. E., Fleming, H. P. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 357–367 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02472.x>
- Daniel, R. M., Danson, M. J. A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 584–591. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.05.001
- Dasgupta, A., Chandel, M. 2020. Enhancement of biogas production from organic fraction of municipal solid waste using alkali pretreatment. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 22, 757–767. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-00970-2>
- DBFZ, 2016. DBFZ (Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH). Annual Report 2016, Leipzig.
- De Baere, L. 2000. Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art. *Water Science and Technology*, 41(3), 283–290. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0082>
- De Baere, L., Mattheeuws, B. 2012. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste in Europe. – Status, Experience and Prospects – *Waste Management: Recycling and Recovery*, 3, 517–526.
- Demirel, B., Yenigün, O. 2002. Two-phase anaerobic digestion processes: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(7), 743–755. <https://doi.org/10.1002/jctb.630>
- Dhar, H., Kumar, P., Kumar, S., Mukherjee, S., Vaidya, A.N. 2015. Effect of organic loading rate during anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 217, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.004>
- Dhaked, R. K., Singh, P., Singh, L. Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waste Management*, 30(12), 2490–2496. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.07.015>
- Diamond, L. W., Akinfiyev, N. N. 2003. Solubility of CO₂ in water from -1.5 to 100 °C and from 0.1 to 100 MPa: evaluation of literature data and thermodynamic modelling. *Fluid Phase Equilibria*, 208, 265–290. DOI: 10.1016/S0378-3812(03)00041-4
- Diario Oficial de la Federación de México. 2015. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de mayo de 2015. Ciudad de México, México.
- Di Maria, F., Sordi, A., Micale, C. 2012. Optimization of solid state anaerobic digestion by inoculum recirculation: The case of an existing Mechanical Biological Treatment plant. *Applied Energy*, 97, 462 – 469. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.093>
- Di Maria, F., Barratta, M., Bianconi, F., Placidi, P., Passeri, D. 2017. Solid anaerobic digestion batch with liquid digestate recirculation and wet anaerobic digestion of organic waste: Comparison of system performances and identification of microbial guilds. *Waste Management*, 59, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.039>
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S. 2010. Semi-dry mesophilic anaerobic digestion of water sorted organic fraction of municipal solid waste (WS-OFMSW). *Bioresource Technology*, 101, 2722–2728. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.007>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350 –356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., Thévenot-Sergentet, D. 2013. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182, 1–15. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006
- Egg, R.P., Coble, C.G., Engler, C.R., Lewis, D.H. 1993. Feedstock storage, handling, and processing. *Biomass and Bioenergy*. 5, 71–94. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(93\)90009-S](https://doi.org/10.1016/0961-9534(93)90009-S)
- El-Fadel, M., Saikaly, P., Ghanimeh, S. 2013. Startup and stability of thermophilic anaerobic digestion of OFMSW. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43 (23), 2685–2721. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.694333>
- Hinds, G. 2015. High-Solids Anaerobic Digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste State of the

- Art, Outlook in Florida, and Enhancing Methane Yields from Lignocellulosic Wastes. Master thesis. College of Engineering, University of South Florida.
- Estevez, M. M., Sapci, Z., Linjordet, R., Schnürer, A., Morken, J. 2014. Semi-continuous anaerobic co-digestion of cow manure and steam-exploded *Salix* with recirculation of liquid digestate. *Journal of Environmental Management*, 136, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.028>
- European Environment Agency (EEA). 2020. Bio-waste in Europe — turning challenges into opportunities. EEA Report. Luxembourg, Luxembourg.
- Eklund, T. 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 383–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02632.x>
- El Achkar, J., Lendormi, T., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R., Lainosellé, J-L., Hobaika, Z. 2017. Anaerobic digestion of grape pomace: Effect of the hydraulic retention time on process performance and fibers degradability. *Waste Management*, 71, 137 – 146. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.11.005
- Esposito, G., Frunzo, L., Giordano, A., Liotta, F., Panico, A., Pirozzi, F. 2012. Anaerobic co-digestion of organic wastes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11 (4), 325–341. DOI: 10.1007/s11157-012-9277-8
- EUR-Lex. 2018. DIRECTIVA 2008/98/CE del Parlamento Europeo y la Comunidad Europea de 19 de noviembre de 2008 sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. Última reforma publicada en el Diario Oficial de la Unión Europea el 05 de julio del 2018.
- Fantozzi, F., Buratti, C. 2011. Anaerobic digestion of mechanically treated OFMSW: Experimental data on biogas/methane production and residues characterization. *Bioresource Technology*, 102(19), 8885–8892. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.077>
- Fernández, J., Pérez, M., Romero, L. 2008. Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Bioresource Technology*, 99, 6075–6080. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.048>
- Fernández, J., Pérez, M., Romero, L. I. 2010. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of initial total solid concentration. *Bioresource Technology*, 101, 6322-6328. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.046
- Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., Romero, L. I. 2013. Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis. *Chemical Engineering Journal*, 232, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.066>
- Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., Romero, L., 2014. Dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid wastes: Solid retention time optimization. *Chemical Engineering Journal*, 251, 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.067>
- Fez.-Güelfo, L. A., Álvarez-Gallego, C., Sales Márquez, D., Romero García, L. I. 2011. The effect of different pretreatments on biomethanization kinetics of industrial Organic Fraction of Municipal Solid Wastes (OFMSW). *Chemical Engineering Journal*, 171, 411-417. DOI: 10.1016/j.cej.2011.03.095 I
- Figuroa, L. 2018. Influencia de compuestos lignocelulósicos contenidos en residuos sólidos orgánicos municipales sobre la producción biogás. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Filer, J., Ding, H. H., Chang, S. 2019. Biochemical Methane Potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. *Water*, 11(921). DOI:10.3390/w11050921
- Forster, T. 2005. Digestión anaerobia termofílica seca de residuos sólidos urbanos: Estudio de las variables del proceso en el arranque y estabilización del bio-reactor. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Forster-Carneiro, T., Pérez, M., Romero, L.I. 2008. Anaerobic digestion of municipal solid waste: Dry thermophilic performance. *Bioresource Technology*. 99 (17), 8180-8184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.021>
- Gallert, C., Winter, J. 1997. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 405-410. DOI: 10.1007/s002530051071
- Gameiro, T., Lopes, M., Marinho, R. 2016. Hydrolytic-Acidogenic fermentation of Organic Solid Waste for volatile fatty acids production at different solids concentrations and alkalinity addition. *Water, Air and Soil Pollution*, 227(10), 391-407. DOI 10.1007/s11270-016-3086-6
- Ghanimeh, S., El Fadel, M., Saikaly, P. 2012. Mixing effect on thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 117, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.125>

- García-Bernet, D., Buffière, P., Latrille, E., Steyer, J. P., Escudí, R. 2011. Water distribution in biowastes and digestates of dry anaerobic digestion technology. *Chemical Engineering Journal*, 172(2–3), 924–928. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.003>
- Gashaw, A. 2014. Anaerobic co-digestion of biodegradable municipal solid waste with human excreta for biogas production: A review. *American Journal of Applied Chemistry*, 2(4), 55-62. DOI: 10.11648/j.ajac.20140204.12
- Gautier, M. 2014. *Propionibacterium*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3, 232-237. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00280-9>
- GDF. 2019. Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal. Gobierno del Distrito Federal. Última reforma publicada en la Gaceta Oficial del Distrito Federal el 25 de junio de 2019. Ciudad de México, México.
- Gerardi, M. H. 2003. The microbiology of anaerobic digesters, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- Giroto, F., Lavagnolo, M. C., Pivato, A., Cossu, R. 2017. Acidogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste and cheese whey for bio-plastic precursors recovery – Effect of process conditions during batch tests. *Waste Management*, 70, 71-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.015>
- Hartmann, H., Ahring, B. K. 2006. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: An overview. *Water Science and Technology*, 53(8), 7–22. DOI:10.2166/wst.2006.231
- He, M., Sun, Y., Zou, D., Yuan, H., Zhu, B., Li, X., Pang, Y., 2012. Influence of temperature on hydrolysis acidification of food waste. *Procedia Environmental Sciences*. 16, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.012>
- Henze, M., Van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovi, D. 2008. Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design. IWA Publishing, London.
- Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C. 2011. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource Technology*, 102 (2011), 5153 – 5161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.012>
- Herrmann, A. 2012. Biogas production from maize: current state, challenges, and prospects. 2. Agronomic and environmental aspects. *Bioenergy Research*, 6, 372-387. DOI 10.1007/s12155-012-9227-x
- Hill, D. T., Holmberg, R. D. 1988. Long chain volatile fatty acid relationships in anaerobic digestion of swine waste. *Biological Wastes*, 23, 195-214. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(88\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0269-7483(88)90034-1)
- Holliger, C., Alve, M., Andrade, D. Angelidaki, I. 2016. Toward a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74, 2515–2522. DOI:10.2166/wst.2016.336
- Hongyu, Z., Guiqin, W., Yaxuan, B., Rihui, C., Li, Z. 2019. Physical components and influence factors of municipal solid waste (MSW) in the residential area of Beijing. E3S Web of conferences, 118, 1-4. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/201911804012>
- Hosseini, E., Azizi, A., Bazyar Lakeh, A. A., Hafez, H., Elbeshbishy, E. 2019. Comparison of liquid and dewatered digestate as inoculum for anaerobic digestion of organic solid wastes. *Waste Manage.* 87, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.02.014>
- Huang, W., Huang, W., Yuan, T., Zhao, Z., Cai, W., Zhang, Z., Lei, Z., Feng, C. 2016. Volatile fatty acids (VFAs) production from swine manure through short-term dry anaerobic digestion and its separation from nitrogen and phosphorus resources in the digestate. *Water Research*, 90, 344 – 353. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.044>
- Hussain, A., Kumar, P., Mehrotra, I. 2015. Nitrogen and phosphorus requirement in anaerobic process: a review. *Environmental Engineering and Management Journal*, 14(4), 769-780. DOI: 10.30638/eemj.2015.086
- Jain, S., Jain, S., Wolf, I. T., Lee, J., Tong, Y. W. 2015. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.091>
- Kafle y Kim, 2013 Kafle, G., Kim, S. 2013. Effects of chemical compositions and ensiling on the biogas productivity and degradation rates of agricultural and food processing by-products. *Bioresource Technology*, 142 (2013), 553-561. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.018>
- Kalač, P., 2012. The required characteristics of ensiled crops used as a feedstock for biogas production: a review. *J. Agrobiol.* 28, 85–96. DOI: 10.2478/v10146-011-0010-y
- Kalamaras, S., Kotsopoulos, T. 2014. Anaerobic co-digestion of cattle manure and alternative crops for the substitution of maize in South Europe. *Bioresource Technology*, 172 (2014), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.005>
- Karthikeyan, O. P., Visvanathan, C. 2013. Bio-energy recovery from high-solid organic substrates by dry anaerobic bio-conversion processes: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12 (3), 257–284. DOI: 10.1007/s11157-012-9304-9

- Kawai, M., Nagao, N., Tajima, N., Niwa, C., Matsuyama, T., Toda, T. 2014. The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield. *Bioresource Technology*, 157, 174-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.018>
- Kayhanian, M., Hardy, S. 1994. The impact of 4 design parameters on the performance of a high-solids anaerobic digestion of municipal solid waste for fuel gas production. *Environmental Technology*, 15(6), 557–567. <https://doi.org/10.1080/09593339409385461>
- Kayhanian, M. 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 20(4), 355–365. <https://doi.org/10.1080/09593332008616828>
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L. 2011. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 31(8), 1737–1744. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>
- Khanal, S., 2008. Anaerobic biotechnology for bioenergy production. John Wiley and Sons. Iowa, EEUU. Pp 1-92.
- Kim, S. C., Adesogan, A. T. 2006. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 3122-3132. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72586-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72586-3)
- Koch, K., Hafner, S. D., Weinrich, S., Astals, S. 2019. Identification of critical problems in Biochemical Methane Potential (BMP= test from methane production curves. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 1-8. DOI: 10.3389/fenvs.2019.00178
- Kong, J. 2017. Modeling microbial dynamics: Effects on environmental and human health. Tesis Doctoral. Department of Mathematical and Statistical Sciences. University of Alberta.
- Kothari, R., Pandey, A. K., Kumar, S., Tyagi, V. V., Tyagi, S. K. 2014. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 174 –195. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.011>
- Kotsyurbenko O. R., Friedrich M. W., Simankova M. V., Nozhevnikova A. N., Golyshin P. N., Timmis K. N., Conrad, R. 2007. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2344–2348. DOI: 10.1128/AEM.02413-06
- Krause, M., Chickering, G., Townsend, T., Pullammanappallil, P. 2018. Effects of temperature and particle size on the biochemical methane potential of municipal solid waste components. *Waste Management*, 71, 25 – 30. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.015>
- Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B., Lapp, H.M., 1979. Anaerobic treatment process stability. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 51, 718– 727. <https://www.jstor.org/stable/25039893>
- Kung, L. 2018. Silage fermentation and additives. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 26, 3-4.
- Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J. and Schmidt, R.J. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5) 4020-4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung, Jr. L., Stough, E.C., McDonell, E. E., Schmidt, R. J., Hofherr, M. W., Reich, L. J., Klingerman, C. M. 2010. The effect of wide swathing on wilting times and nutritive value of alfalfa haylage. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1770–1773. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2451>.
- Labatut, R. A., Angenent, L. T. Scott, N. T. 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 102, 2255-2264. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.035
- Lanigan, G. W. 1963. Silage Bacteriology. I. Water activity and temperature relationships of silage strains of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, and *Pediococcus cerevisiae*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16, 606-615.
- Lavganolo, M. C., Giroto, F., Rafieenia, R., Danieli, L. Two-stage anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste – Effects of process conditions during batch tests. *Renewable Energy*, 126, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.039>
- Lee, W., Seak, A., Yeo, H., Cheng, G. 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83 – 99. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>
- Le Hyaric, R., Benbelkacem, H., Bollon, J., Bayard, R., Escudíé, R., Buffière, P. 2012. Influence of moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(7), 1032–1035. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.124>
- Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J.M., Junqua, G., Steyer, J.P. 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: a review. *Process Biochemistry*, 45, 431–440.

- <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.018>
- Lettinga, G., REbac, S., Zeeman, G. 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *TRENDS in Biotechnology*, 19(9), 363-370. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01701-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01701-2)
- Li, C. 2015. Wet and dry anaerobic digestion of biowaste and of co-substrates. Doctoral Thesis.
- Li, Y., Park, S. Y., Zhu, J. 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>
- Li, C., Mörtelmaier, C., Winter, J., Gallert, C. 2014. Effect of moisture of municipal biowaste on start-up and efficiency of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 168, 23-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.118>
- Lin, L., Yu, Z., Li, Y. 2017. Sequential batch thermophilic solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass via recirculating digestate as inoculum – Part II: Microbial diversity and succession. *Bioresource Technology*, 241, 1027–1035. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.011>
- Liu, J, Wang, S., Zhao, B., Tong, H., Chen, C. 2009. Absorption of carbon dioxide in aqueous ammonia. *Energy Procedia*, 1, 933-940. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2009.01.124>.
- Liu, D., Liu, D., Zeng, R., Angelidaki, I. 2006. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research*, 40, 2230–2236. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.047>
- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I. 2011. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102, 8700-8706. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.012
- Luning, L., Van Zundert, E. H. M., Brinkmann, A. J. F. (2003). Comparison of dry and wet digestion for solid waste. *Water Science and Technology*. 48(4), 15-20. DOI: 10.2166/wst.2003.0210
- Lungo Malave', Bernardi M., Fino D. Ruggeri B. 2015. Multistep anaerobic digestion (MAD) as a tool to increase energy production via H₂ + CH₄. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 5050-5061. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.068>
- Malinauskaitė, J., Jouhara, H., Czajczynska, D., Stanchev, P., Katsou, E., Rostkowski, P., Thorne, R., Colon, J., Ponsa, S., Al-Mansour, F., Anguilano, L., Krzyzyska, R., Lopez, I., Vlasopoulos, A., Spencer, N. 2017. Municipal solid waste management and waste-to-energy in the context of a circular economy and energy recycling in Europe. *Energy*, 141, 2013-2044. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.11.128>
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G. 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>
- Martí-Herrero, J., Soria-Castellón, G., Diaz-de-Basurto, A., Alvarez, R. 2019. Biogas from a full scale digester operated in psychrophilic conditions and fed only with fruit and vegetable waste. *Renewable Energy*, 133, 676 -684. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.030>
- Martín-González, L., Font, X., Vicent, T. 2013. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 1-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.016>
- Massé, D. I., Saady, N. M. C., Gilbert, Y. 2015. Psychrophilic dry anaerobic digestion of cow feces and wheat straw: Feasibility studies. *Biomass and Bioenergy*, 77, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.017>
- Mata-Álvarez, J., Mace, S., Llabres, P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource technology*. 74(1), 3-16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)
- Mata- Álvarez, J. 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA Publishing, Cornwall, UK.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., Astals, S. 2014. A critical review on anaerobic codigestión achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Reviews*, 36, 412-427. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>
- Mazurkiewicz, J., Marczuk, A., Pochwatka, P., Kujawa, S. 2019. Maize straw as a valuable energetic material for biogas plant feeding. *Materials*, 12, 3848. DOI:10.3390/ma12233848
- McAllister, T. A., Dunière, L. Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., Zaheer, R. 2018. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science*, 101, 4060-4074. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- McAllister, T. A., Hristov, A.N. 2000. The fundamentals of making good quality silage. *Advances in Dairy Technology: Proceedings of the Western Canadian Dairy Seminar*. 12, 381-399. Lethbridge, Alberta,

- Canada.
- McCarty, P. 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals - Part one - Chemistry and Microbiology. *Public Works*, 95, 9-12.
- McDonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E. 1991. The Biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, UK
- Mei, B., Peng, X. 2016. Evaluation of parameters monitored in the process of food waste anaerobic digestion. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 38 (3), 402 – 409. DOI:10.1080/15567036.2013.780114
- Merry, R.J., Davies, D. R. 1999. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. *Le Lait*, 79:149–164. <https://doi.org/10.1051/lait:1999112>
- Michel-Savin, D., Marchal, R., Vandecasteele, J. P. 1990a. Butyric fermentation: metabolic behaviour and production performance of *Clostridium tyrobutylicum* in a continuous culture with cell recycle. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 172-177. DOI:10.1007/BF00166775
- Michel-Savin, D., Marchal, R., Vandecasteele, J.P. 1990b. Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutylicum*. Effect of end product inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 127-131. DOI:10.1007/BF00176512
- Micolucci, F., Gottardo, M., Malamis, D., Bolzonella, D., Pavan, P., Cecchi, F. 2015. Analysis of meso/thermo AD process applied to pressed biowaste. *Waste and Biomass Valorization*, 6(5), 723-731. DOI 10.1007/s12649-015-9407-y
- Monod, J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Moon, N.J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 454–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01685.x>
- Morozova, I., Nikulina, N., Oechsner, H., Krümpel, J., Lemmer, A. 2020. Effects of increasing nitrogen content on process stability and reactor performance in anaerobic digestion. *Energies*, 13(5), 1139. <https://doi.org/10.3390/en13051139>
- Motte, J., Escudíé, R., Bernet, N., Delgenes, J., Steyer, J., Dumas, C. 2013. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 144, 141 – 148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.057>
- Muck, R.E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300021>
- Muck, R. E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *Journal of Dairy Science*, 71, 2992-3002. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79897-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79897-5)
- Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., Dinka, M. 2020. Comparison of unstructures kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering*, 33, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>
- Neshat, S., Mohammadi, M., Najafpour, G., Lahijani, P. 2017. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 308 – 322. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.137>
- Nilsson, S., Hellman, E., Moestedt, J. 2018. The effect of temperature, storage time and collection method on biomethane potential of source separated household food waste. *Waste Management*, 71 (2018) 636-643. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.05.034.
- Nielfa, A., Cano, R., Fdz-Polanco, M. 2015. Theoretical Methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports*, 5, 14-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.005>
- NMX-AA-015-1985. 1985. Norma Mexicana Protección al ambiente. Contaminación del suelo. Residuos sólidos municipales, muestreo, método de cuarteo. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. México D.F., México.
- Nozhevnikova, A. N., Nekrasova, V., Ammann, A., Zehnder, A., Wehrli, B., Holliger, C. 2005. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 3-13. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.12.009
- Ossa, M. del M. 2020. Efecto de la carga orgánica sobre la producción de metano y características de digestatos durante la digestión anaerobia de FORSU. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Ossa-Arias, M. del M., González-Martínez, S. 2021. Methane production from the Organic Fraction of Municipal Solid Waste under psychrophilic, mesophilic and thermophilic temperatures at different organic loading

- rates. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01354-9>
- Oude, S., Driehuis, F., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F. 2000. Silage fermentation processes and their manipulation. In: Mannelje, L't (Ed.), *Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Smallholders*. Proceedings of the FAO Electronic Conference on Tropical Silage, 1 September-15 December, Rome, Italy
- Oude, S., Driehuis, F., Spoelstra, S. F. 1999. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Conferencia electrónica e la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. L. 't Mannelje. Roma.
- Pahlow, G., Honig, H. 1993. Dry matter losses during storage and unloading as influenced by different types of silage additives. In *Silage Research 1993, Proceedings of the 10th International Conference on Silage Research*, eds. P. O'Kiely, M. O'Connell and J. Murphy, 118-119. Dublin City University, Ireland.
- Pahlow, G. 1991. Role of microflora in forage conservation. *Agricultural Science and Technology Information*, 123, 26-36
- Pahlow, G., Muck, R., Driehuis, F., Oude, S., Spoelstra, S. 2003. Microbiology of ensiling. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, USA.
- Pahlow, G., Weissbach, F. 1996. Effect of numbers of epiphytic lactic acid bacteria (LAB) and of inoculation on the rate of pH-decline in direct cut and wilted grass silages. p. 104-105, In: Jones *et al.*, 1996, q.v
- Pakarinen, A., Maijala, P., Jaakkola, S., Stoddard, F., Kymäläinen, M., Viikari, L. 2011. Evaluation of preservation methods for improving biogas production and enzymatic conversion yields of annual crops. *Biotechnology to Biofuels*, 4, 1-13. DOI: 10.1186/1754-6834-4-20
- Pakarinen, O., Lehtomäki, A., Rissanen, S., Rintala, J. 2008. Storing energy crops for methane production: Effects of solids content and biological additive. *Bioresource Technology*, 99 (2008), 7074 – 7082. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.007>
- Pavan, P., Battistoni, P., Mata-Alvarez, J., Cecchi F., 2000. Performance of thermophilic semi-dry anaerobic digestion process changing the feed biodegradability. *Water Science and Technology*. 41 (3), 75-81.
- Petchsri, P., Towprayoon, S., Chairprasert, P., Nopharatana, A. 2004. Biogas Production from Simulated Lanfill Bioreactor with Leachate Recirculation under Various waste Densities, Proceedings of the Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE), 1-3 December 2004, Hua Hin, Thailand, 390-395
- Pezzolla, D., Di Maria, F., Zadra, C., Massaccesi, L., Sordi, A., Gigliotti, G. 2017. Optimization of solid-state anaerobic digestion through the percolate recirculation. *Biomass and Bioenergy*, 96, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.11.012>
- Pitt, R. E. 1986. Dry matter losses due to oxygen infiltration into silos. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 35, 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0021-8634\(86\)80056-7](https://doi.org/10.1016/S0021-8634(86)80056-7)
- Porter, M.G. and Murray, R.S. 2001. The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry-matter content estimated by different analytical methods. *Grass Forage Science*, 56: 405–411. DOI:10.1046/j.1365-2494.2001.00292.x
- Qian, M. Y., Li, R. H., Li, J., Wedwitschka, H., Nelles, M., Stinner, W., Zhou, H. J. 2016. Industrial scale garage-type dry fermentation of municipal solid waste to biogas, *Bioresource Technology*, 217, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.076>
- Rajagopal, R., Massé, D. I., Singh, G. 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, 143, 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.030>
- Ramana, K. V., Singh, L. 2000. Microbial degradation of organic wastes at low temperatures. *Defence Science Journal*, 50(4), 371-382. <https://doi.org/10.14429/dsj.50.3748>
- Raposo, F., De la Rubia, M. A., Fernández-Cegrí, V., Borja, R. 2012. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 861-877. DOI: 10.1016/j.rser.2011.09.008
- Rapport, J., Zhang, R., Jenkins, B., Williams, R. 2008. Current anaerobic digestion technologies used for treatment of municipal organic solid waste. California Integrated Waste Management Board. Sacramento, EEUU.
- Rittmann, B. E., McCarty, P. L. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications* McGraw- Hill, New York.
- Rockland, L.B., Beuchal, L.R. 1987. *Water Activity: Theory and Applications to Food*. (2nd ed.) Marcell Dekker, New York, EE UU.
- Rojas, O. 1987. *Relación alcalinidad-ácidos grasos volátiles (AGV)*. Universidad del Valle. Colombia.
- Rooke, J. A., Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. *Silage Science and Technology*, 42, 95-139. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c3>

- Sajeena Beevi, B., Madhu, G., Kumar, D. 2015. Performance and kinetic study of semi-dry thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Waste Management*, 36, 93-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.024>
- Saveyn, H., Eder, P. 2014. End-of-waste criteria for biodegradable waste subjected to biological treatment (compost & digestate): Technical Proposals. JRC Scientific and Policy Reports, Sevilla. Available in: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC87124/eow%20biodegradable%20waste%20final%20report.pdf>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2020. Diagnóstico básico para la gestión integral de los residuos. Primera edición. Ciudad de México, México.
- Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA). 2018. Inventario de Residuos Sólidos CDMX. Gobierno de la Ciudad de México. Ciudad de México, México.
- Seppälä, M., Paavola, T., Lehtomäki, A., Pakarinen, O., Rintala, J.M. 2008. Biogas from energy crops—optimal pre-treatments and storage, co-digestion and energy balance in boreal conditions. *Water Science and Technology*, 58 (9), 1857-1863. DOI: 10.2166/wst.2008.503
- Schievano, A., Tenca, A., Lonati, S., Manzini, E., Adani, F. 2014. Can two-stages instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? *Applied Energy*, 124, 335-342.
- Schievano, A., D'Imporzano, G., Malagutti, L., Fragali, E., Ruboni, G. Adani, F. 2010. Evaluation inhibition condition in high-solid anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technology*, 101(14), 5728–5732. DOI: 10.1016/j.apenergy.2014.03.024
- Schievano, A., Pognani, M., D'Imporzano, G., Adani, F. 2008. Predicting anaerobic biogasification potential of ingestates and digestates of a full-scale biogas plant using chemical and biological parameters. *Bioresour. Technol.* 99, 8112–8117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.030>
- Scudamore, K.A., Livesey, C.T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 1-7 DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4
- Silva, F. C., Serafim, L. S., Nadáis, H., Arroja, L., Cápela, I. 2013. Acidogenic Fermentation Towards Valorisation of Organic Waste Streams into Volatile Fatty Acids. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 11(4), 467–476.
- Souza, A., Sandrin, C. Z., Calió, M. F. A., Meirelles, S. T., Pivello, V. R. Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 2010. Seasonal variation of soluble carbohydrates and starch in *Echinochloa inflexa*, a native grass species from the Brazilian savanna, and in the invasive grass *Melinis minutiflora*. *Brazilian Journal of Biology*, 70(2), 395-404. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000200023>
- Spoelstra, S. F. 1986. Degradation of nitrate by enterobacteria during silage fermentation of grass. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 35, 43-54. <https://doi.org/10.18174/njas.v35i1.16757>
- Stürmer, B. 2017. Feedstock change at biogas plants – Impact on production costs. *Biomass Bioenergy*. 98, 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.032>
- Symons, G.E., Buswell, A.M. 1933. The methane fermentation of carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society*, 55, 2028 - 2036. <https://doi.org/10.1021/ja01332a039>
- Teixeira Franco, R., Buffière, P. and Bayard, R. 2016. Ensiling for biogas production: Critical parameters. A review. *Biomass and Bioenergy*, 84, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.014>
- Tyagi, V. K., Fdez-Güelfo, L. A., Zhou, Y., Álvarez-Gallego, C. J., Romero García. 2018. Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 380-399. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.051>
- Verma, S. 2002. Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes. Master Thesis. Department of Earth & Environmental Engineering, Columbia University, New York.
- Vervaeren, H., Hostyn, K., Ghekiere, G. and Willems, B. 2010. Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production. *Renewable Energy*. 35(9), 2089-2093. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.02.010>
- Viéitez, E. R., Mosquera, J., Ghosh, S. 2000. Kinetics of accelerated solid-state fermentation of organic-rich municipal solid waste. *Water Science and Technology*, 41(3), 231-238. DOI:10.2166/wst.2000.0076
- Voelklein, M. A., Jacob, A., O' Shea, R., Murphy, J. D. 2016. Assessment of increasing loading rate on two-stage digestion of food waste. *Bioresour. Technology*, 202, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.001>
- Villadsen, J., Nielsen, J., Lidén, G. 2011. Bioreaction engineering principles (3era ed.) New York: Springer Science & Business Media.
- Vindis, P., Mursec, B., Janzekovic, M., Cus, F. 2009. The impact of mesophilic and thermophilic anaerobic

- digestion on biogas production. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 36(2), 192-198.
- Walker, G. M., Walker, R. S. K. 2018. Enhancing yeast alcoholic fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 105, 87-129. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
- Waltenberger, R., Kirchmayr, R. 2013. Wet and dry anaerobic digestion processes. BDI-Bioenergy International. Grambach, Austria.
- Wang, S., Ma, F., Ma, W., Wang, P., Zhao, G., Lu, X. 2019. Influence of temperature on biogas production efficiency and microbial community in a two-phased anaerobic digestion system. *Water*, 11(1), 133. <https://doi.org/10.3390/w11010133>
- Wang, Y., Witasarsa, F. 2016. Application of Contois, Tessier, and first-order kinetics for modeling and simulation of a composting decomposition process. *Bioresource Technology*, 220, 384-393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.099>
- Wang, G. 2010. Biogas production from energy crops and agriculture residues. Doctoral thesis. National Laboratory for Sustainable Energy, Technical University of Denmark. Roskilde.
- Wang, H., Vuorela, M., Keränen, A-L., Lehtinen, T. M., Lensu, A., Lehtomäki, A., Rintala, J. 2010. Development of microbial populations in the aerobic hydrolysis of grass silage for methane production. *FEMS Microbiology Ecology*, 72, 496-506. DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.00850.x
- Wang, K., Yin, J., Shen, D., Li, N. 2014. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH. *Bioresource Technology*, 161, 395-401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.088>
- Weinberg, Z.G., Ashbell, G. 2003. Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 181-188. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00130-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00130-4)
- Weinberg, Z. G., Szakacs, G., Ashbell, G., Hen, Y. 2001. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 561-566. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01276.x>
- Weissbach, F. 1996. New developments in crop conservation. Proceedings XI International Silage Conference, Aberystwyth, Wales, UK.
- Wellinger, A. 2013. Digestion of municipal solid waste: technical evaluation. Chengdu, China.
- Woolford, M.K. 1975a. The significance of *Propionibacterium* spp. and *Micrococcus lactilyticus* to the ensiling process. *Journal of Applied Bacteriology*, 39, 301-306. DOI:10.1111/j.1365-2672.1975.tb00576.x
- Worrell y Aarne, 2011 Worrell, W., Aarne, P. 2011. Solid Waste Engineering. Second Edition. Cengage Learning. Stamford, USA. Pp. 161-162.
- Wu, Y., Wang, C., Liu X., Ma H., Wu J., Zuo J., Wang K. 2016. A new method of two-phase anaerobic digestion for fruit and vegetable waste treatment. *Bioresource Technology*, 211, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.050>
- Wu, C., Wang, Q., Yu, M., Zhang, X., Song, N., Chang, Q., Gao, M., Sonomoto, K. 2015. Effect of ethanol pre-fermentation and inoculum-to-substrate ratio on methane yield from food waste and distillers' grains. *Applied Energy*, 155, 846-853. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.04.081>
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T. R., Kohli, S., Rana, V. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - A review. *Bioresource Technology*, 95 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.010>
- Yamamoto, Y., P. Gaudu, and A. Gruss. 2011. Oxidative stress and oxygen metabolism in lactic acid bacteria. Pages 91-102 in *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*. K. Sonomoto and A. Yokota, ed. Caister Scientific Press, Norfolk, UK.
- Yang, Y., Zhang, Y., Omairey, E., Cai, J., Gu, F. 2018. Intermediate pyrolysis or organic fraction of municipal solid waste and rheological study of the pyrolysis oil for potential uses as bio-bitumen. *Journal of Cleaner production*, 187, 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.205>
- Zhai, N., Zhang, T., Yin, D., Yang, G., Wang, X., Ren, G., Feng, Y. E. 2015. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. *Waste Management*, 38, 126-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2014.12.027>
- Zhang, Y., Kusch-Brandt, S., Gu, S., Heaven, S. 2019. Particle size distribution in municipal solid waste pretreated for bioprocessing. *Resources*, 8 (4) 166-190. DOI:10.3390/resources8040166
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J., Zhang, Y. 2018. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource Technology*, 248 (2018), 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121>
- Zhou, Y., Drouin, P., Lafrenière, C. 2016. Effect of temperature (5-25°C) on epiphytic lactic acid bacteria

populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 657-671. DOI:10.1111/jam.13198

Zhou, Y., Zhang, Z., Nakamoto, T., Li, Y., Yang, Y., Utsumi, M., Sugiura, N. 2011. Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3251-3256. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.04.002

Zupančič, G. D. Grilc, V. 2012. Anaerobic treatment and biogas production from organic waste. Management of organic waste. Dr. Sunil Kumar (Ed.), InTech. Rijeka, Croatia.