



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

**INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE CARBÓN ACTIVADO
GRANULAR, BIOCARBÓN Y MAGNETITA (Fe₃O₄) EN EL PROCESO
DE DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE
LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN INGENIERÍA

PRESENTA:

M. en C. María Fe Altamirano Corona

Director de tesis:

Dr. Alfonso Durán Moreno - FQ, UNAM

Comité tutor:

Dr. Adalberto Noyola Robles - II, UNAM

Dr. Iván Moreno Andrade - II, UNAM

Dr. Óscar Monroy Hermosillo - UAM Iztapalapa

Ciudad Universitaria, CDMX, septiembre de 2022



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 ASIGNADO

Presidente:	Dr. Óscar A. Monroy Hermosillo
Secretaria:	Dra. Petia Mijaylova Nacheva
Primer vocal:	Dr. Adalberto Noyola Robles
Segundo vocal:	Dr. Iván Moreno Andrade
Tercer vocal:	Dr. Alfonso Durán Moreno

El presente trabajo de tesis se realizó en los Laboratorios 301-303 del Conjunto E de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Director de tesis:

Dr. Alfonso Durán Moreno



AGRADECIMIENTOS

A la Máxima Casa de Estudios de México, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por haberme brindado los recursos humanos, materiales, tecnológicos y financieros para hacer realidad el sueño profesional de formarme como Doctora.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, la cual fue fundamental para poder dedicarme de tiempo completo al Programa de Posgrado.

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 contribuido en la financiación de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Alfonso Durán Moreno, por abrirme las puertas de su grupo de investigación cuando la incertidumbre y la desesperanza nublaron mi panorama. Siempre estaré profundamente agradecida por la confianza que depositó en mí desde el día uno, incluso, en ese breve momento en que perdí la confianza en mí. Gracias por su invaluable apoyo, guía y respaldo en todas mis decisiones, por siempre impulsarme a ser mejor; más crítica, más analítica y más autónoma. Me llevo con cariño y agradecimiento todos sus consejos.

A los Doctores Iván Moreno Andrade, Óscar Monroy Hermosillo y Adalberto Noyola Robles, por acompañarme en este camino siendo mis mentores, que con rigor y respeto me retroalimentaron, siempre en pro de mi crecimiento profesional y personal. Honestamente me siento muy honrada de que hayan conformado mi comité tutorial, les admiro y espero algún día ser un poquito de lo grandes que ustedes son.

A la Dra. María del Carmen Durán de Bazúa y la Dra. Herminia Loza Tavera, por haber sido parte de mi jurado en el examen de Candidatura y a la Dra. Petia Mijaylova Nacheva por integrarse al jurado ampliado para la evaluación de mi examen de grado, me ayudaron enormemente a mejorar la calidad de mi trabajo. Muchas gracias.

A la Maestra Nora Salinas Castillo, por su valiosa amistad y apoyo incondicional durante el trabajo de laboratorio. Gracias infinitas porque gracias a ti todo fue más sencillo y más grato.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, por haberme facilitado los medios para la realización del análisis proteómico, MEB y FTIR. Particularmente al Dr. Jorge Herrera y el Dr. Víctor Zaldívar, por su paciencia e increíble vocación de enseñanza.

A mis amigos del Posgrado, Mario y Jusin, por esas pláticas profundas y reflexiones sobre la vida, los pangolines y los murciélagos (porque COVID-19). Por esas mañanas frías, que, acompañadas de un café con pan y de risas, siempre tenían un mejor sabor. Los quiero mucho, gracias por su amistad franca e incondicional.



DEDICATORIA

El esfuerzo, la disciplina, la dedicación y el amor por lo que hago fueron importantes, pero sin duda, mi familia siempre fue ese grillito en mi cabeza alentándome a dar lo mejor. Les agradezco tanto por haber sido en todo momento mi motor y mi más grande inspiración. Cada vez que me sentí cansada, estresada, desanimada, tan solo pensé en ustedes, y en que estar lejos, trabajando por un sueño, tenía que valer cada segundo.

A mis padres, María Fe y José Luis,
*por sembrar en mí lo mejor de ustedes, por estar incondicionales.
Haber llegado hasta aquí es el fruto de su esfuerzo,
y espero poder retribuirles todo lo que han hecho por mí.*

A mis hermanos, Antonio, Julio César y José Luis,
por ser un ejemplo para mí, cada uno con sus virtudes me han inspirado.

A mi esposo, Uriel,
*por impulsarme siempre a crecer y lograr mis metas,
por ser mi compañero de viaje desde casi 13 años.
Este camino ha sido mucho más fácil y bonito a tu lado.
Te admiro y te amo más que siempre.*

A mi rayito de luz,
*que no llegó ni antes ni después, sino en el tiempo perfecto
que Dios destinó para encontrarnos.
Ansío conocerte y tenerte en mis brazos.
Sé que llegas en un contexto socioambiental complicado,
y quisiera que fuera diferente y decirte
que no hay nada de lo que tengas que preocuparte,
pero, por ti, tu papá y yo lucharemos todos los días,
cada uno desde su trinchera,
para hacer de este mundo un lugar mejor.
Gracias por darme esperanza y fortaleza.*

¡De todo corazón, muchas gracias!



*Aprovecha el día·
No dejes que termine sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz, sin haber alimentado tus sueños·*

*No te dejes vencer por el desaliento·
No permitas que nadie te quite el derecho de expresarte,
que es casi un deber·*

*No abandones tus ansias de hacer de tu vida algo extraordinario...
No dejes de creer que las palabras y la poesía, sí pueden cambiar al mundo;
porque, pase lo que pase, nuestra esencia está intacta·*

*Somos seres humanos llenos de pasión, la vida es desierto y es oasis·
Nos derriba, nos lastima, nos convierte en protagonistas de nuestra propia historia·
Aunque el viento sople en contra, la poderosa obra continúa·
Y tú puedes aportar una estrofa...*

*No dejes nunca de soñar, porque sólo en sueños puede ser libre el hombre·
No caigas en el peor de los errores: el silencio·
La mayoría vive en un silencio espantoso· No te resignes, huye...*

*“Yo emito mi alarido por los tejados de este mundo”, dice el poeta;
valora la belleza de las cosas simples,
se puede hacer poesía sobre las pequeñas cosas·*

*No traiciones tus creencias, todos merecemos ser aceptados·
No podemos remar en contra de nosotros mismos,
eso transforma la vida en un infierno·*

*Disfruta del pánico que provoca tener la vida por delante·
Vívela intensamente, sin mediocridades·
Piensa que en ti está el futuro,
y asume la tarea con orgullo y sin miedo·*

*Aprende de quienes pueden enseñarte·
Las experiencias de quienes se alimentaron de nuestros “Poetas Muertos”,
te ayudarán a caminar por la vida·
La sociedad de hoy somos nosotros, los “Poetas Vivos”·*

No permitas que la vida te pase a ti, sin que tú la vivas...

Walt Whitman



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.....	11
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. MARCO TEÓRICO.....	22
5.1 Contexto de la generación de RSU en México y el mundo.....	22
5.1.1 Características fisicoquímicas y bromatológicas de la FORSU	23
5.2 Digestión anaerobia y sintrofismo	25
5.3 Transferencia extracelular de electrones	27
5.3.1 Transferencia mediada de electrones interespecies (MIET)	28
5.3.2 Transferencia directa de electrones interespecies (DIET)	30
5.4 Proteínas, genes y microorganismos asociados a la transferencia extracelular de electrones	33
5.5 Estrategias para mejorar la producción de biogás	34
5.5 Bioestimulación.....	35
5.5.1 Carbón activado granular.....	38
5.5.2 Biocarbón	40
5.5.3 Magnetita	41
5.6 Inmovilización de materiales bioestimulantes	42
6. METODOLOGÍA.....	47
6.1 Etapa 1. Caracterización y determinación de dosis de material conductor	48
6.1.1 Caracterización de materiales conductores	48
6.1.1.1 Parámetros fisicoquímicos.....	49
6.1.1.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) - Espectrometría de Dispersión de Rayos X (EDS)	49



6.1.1.3 Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	50
6.1.2 Obtención y caracterización de sustrato e inóculo.....	51
6.1.3 Diseño experimental para determinar dosis de material conductor.....	52
6.1.3.1 Pruebas de potencial bioquímico de metano.....	52
6.1.3.1 Análisis de Varianza (ANOVA) unidireccional con prueba post hoc de Dunnett	53
6.1.4 Evaluación de la influencia del tamaño de partícula - dosis de CAG.....	55
6.1.5 Rendimiento del proceso.....	55
6.1.5.1 Modelo cinético modificado de Gompertz.....	55
6.2 Etapa 2. Inmovilización de materiales conductores.....	56
6.2.1 Síntesis de perlas de BC/Fe ₃ O ₄ -alginato.....	56
6.2.2 Síntesis de fibra de poliéster-BC/Fe ₃ O ₄	56
6.2.3 Síntesis de fibra de carbono-BC/Fe ₃ O ₄	57
6.2.4 Caracterización de materiales inmovilizados.....	57
6.2.4.1 Diámetro promedio (sólo para perlas de alginato).....	57
6.2.4.2 MEB-EDS.....	57
6.2.4.3 Análisis termogravimétrico:.....	57
6.2.5 Pruebas de potencial bioquímico de metano.....	58
6.3 Etapa 3. Análisis de la estabilidad del proceso y proteómica.....	58
6.3.1 AGVs, pH y ORP.....	58
6.3.2 Análisis proteómico.....	58
6.3.2.2 Electroforesis en 1D SDS-PAGE.....	59
6.3.2.3 Electroforesis en 2D SDS-PAGE.....	60
6.2.1.3 Análisis de espectrometría de masas e identificación de proteínas por huella peptídica.....	61
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
7.1 Caracterización de los materiales conductores.....	62
7.1.1 Parámetros fisicoquímicos.....	62
7.1.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) - Espectrometría de Dispersión de Rayos X (EDS).....	64
7.1.3 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	66
7.2 Obtención y caracterización de sustrato e inóculo.....	68
7.3 Pruebas de potencial bioquímico de metano para la determinación de la dosis de material conductor.....	70
7.4 Análisis estadístico.....	77
7.5 Evaluación de la influencia del tamaño de partícula y la dosis.....	81



7.5.1	Análisis factorial y superficie de respuesta.....	82
7.6	Modelo modificado de Gompertz	84
7.7	Inmovilización de materiales conductores.....	92
7.7.1	Caracterización de materiales inmovilizados.....	93
7.7.1.2	Termogravimetría	95
7.7.1.3	MEB-EDS	98
7.7.2	Potencial bioquímico de metano con materiales inmovilizados.....	101
7.8	Análisis del pH/AGV/ORP.....	105
7.9	Análisis de la comunidad microbiana	107
7.10	Análisis proteómico.....	110
8.	CONCLUSIONES	115
9.	RECOMENDACIONES	117
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
	ANEXOS	130



ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
1	Generación global de residuos proyectada por el Banco Mundial.	22
2	Composición de los RSU en el mundo por nivel de ingreso.	23
3	Etapas de la digestión anaerobia.	25
4	Línea del tiempo de la transferencia extracelular de electrones.	27
5	Comparación termodinámica de la oxidación de etanol y ácidos orgánicos mediante HIET y DIET.	30
6	Sintrofia fermentador-metanógeno a través de: (A, B) transferencia de electrones interespecies mediada (MIET), (C) transferencia directa de electrones interespecies (DIET), y (D) DIET mediante materiales conductores.	31
7	Estructura multicapa de un gránulo anaerobio.	32
8	Micrografía electrónica de barrido de un co-cultivo metanogénico de <i>P. thermopropionicum</i> y <i>M. thermoautotrophicus</i> con conexiones pili (A) y co-cultivo sintrófico de <i>G. metallireducens</i> y <i>M. barkeri</i> (esferas) que crecen en biocarbón (B).	32
9	Publicaciones sobre estrategias para mejorar la producción de biogás de 2008-2021.	35
10	Representación esquemática de los principales grupos superficiales que pueden encontrarse en un carbón activado.	38
11	Química superficial y mecanismos de adsorción de compuestos orgánicos (A) e inorgánicos (B) sobre biocarbón.	40
12	Estructura química de la magnetita Fe_3O_4 .	42
13	Diagrama general del plan experimental.	47
14	Materiales conductores a utilizar. A) Carbón activado granular, B) Biocarbón y C) Magnetita (Fe_3O_4).	49
15	Medidor multiparamétrico de pH, potencial redox, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto	49
16	Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5900-LV.	50
17	Espectrofotómetro de Infrarrojo Spectrum 400 Perkin-Elmer.	50
18	Sistema Automático de Pruebas de Potencial de Metano de Bioprocess Control.	53
19	Analizador termogravimétrico (TGA/DSC).	58
20	Unidad de electroforesis para 1D SDS-PAGE.	59
21	Unidad de electroforesis para 2D SDS-PAGE.	61
22	Microscopía electrónica de barrido de la superficie de carbón activado granular a aumentos x100 (A), x500 (B) y x5000 (C).	64
23	Espectroscopía de dispersión de rayos X de carbón activado granular.	64
24	Microscopía electrónica de barrido de la superficie de biocarbón a aumentos x100 (A), x750 (B) y x3000 (C).	65
25	Espectroscopía de dispersión de rayos X de biocarbón.	65
26	Microscopía electrónica de barrido de la superficie de magnetita (Fe_3O_4) a aumentos x100 (A), x500 (B) y x5000 (C).	66
27	Espectroscopía de dispersión de rayos X de magnetita (Fe_3O_4)	66
28	Espectros de infrarrojo de los materiales conductores (BC, Fe_3O_4 y CAG).	68
29	Cuarteo de la FORSU para obtención de la muestra (A) y disminución del tamaño de partícula del sustrato <i>in situ</i> (B).	69
30	FORSU pretratada (disminución de tamaño de partícula) y homogenizada (A) y lodo anaerobio granular de un reactor UASB de una planta cervecera (B).	69
31	Configuración de las pruebas de potencial bioquímico de metano.	71

32	Potencial bioquímico de metano del control negativo y los controles de MC.	71
33	Potencial bioquímico de metano de los controles negativo, positivo, FORSU y materiales no conductores.	73
34	Potencial bioquímico de tipo y dosis de MC.	74
35	Gráficas de residuos para rendimiento de metano	77
36	Gráfica de distribución normal para rendimiento de metano.	77
37	Prueba de igualdad de varianzas para rendimiento de metano	78
38	Comparación de análisis de medias para rendimiento de metano.	79
39	Gráfica de valores individuales para rendimiento de metano Vs. tratamientos	79
40	Intervalos de confianza simultáneos de Dunnett.	80
41	Potencial bioquímico de metano para evaluar la influencia del tamaño de partícula y la dosis.	81
42	Gráfica de efectos principales para rendimiento de metano.	83
43	Gráfica de interacción para rendimiento de metano.	83
44	Gráfica de contorno de rendimiento de metano Vs. Tamaño partícula-dosis.	84
45	Gráfica de superficie de rendimiento de metano Vs. Tamaño partícula-dosis.	84
46	Comparación entre los datos experimentales y el modelo modificado de Gompertz para los ensayos tipo de MC-dosis y tamaño de partícula-dosis.	85
47	PBM de los diferentes tratamientos tipo MC-dosis (izquierda) y tamaño de partícula-dosis CAG (derecha) durante los primeros 3 días.	89
48	a) Fibra de poliéster cruda, b) FP+BC (impregnación húmeda), c) FP+BC (impregnación seca), d) FP+Fe ₃ O ₄ (impregnación húmeda), e) FP+Fe ₃ O ₄ (impregnación seca), f) fibra de carbono cruda, g) FC+ Fe ₃ O ₄ (impregnación húmeda), h) FC+ Fe ₃ O ₄ (impregnación seca), i) perlas de alginato+Fe ₃ O ₄ , j) perlas de alginato+biocarbón.	92
49	Análisis TG y análisis DTG de biocarbón.	95
50	Análisis TG y análisis DTG de magnetita.	96
51	Análisis TG y análisis DTG de fibra de carbono.	96
52	Análisis TG y análisis DTG de fibra de poliéster	97
53	Análisis TG y análisis DTG de quitosano.	97
54	Análisis TG y análisis DTG de perlas de alginato-biocarbón.	98
55	Análisis TG y análisis DTG perlas de alginato-magnetita.	98
56	MEB de FC (a), FC+Fe ₃ O ₄ (b), FP (e), FP+ Fe ₃ O ₄ (f). Análisis elemental de FC+Fe ₃ O ₄ (c, d) y FP+ Fe ₃ O ₄ (g, h).	99
57	MEB FC (a), FC+biocarbón y análisis elemental de FC+biocarbón (c, d).	99
58	MEB de PA+Fe ₃ O ₄ (a, b), PA+biocarbón (f, d). Análisis elemental de PA+Fe ₃ O ₄ (c, d), PA+biocarbón (g, h).	100
59	Potencial bioquímico de metano con magnetita y biocarbón inmovilizados.	101
60	Potencial redox (A) y pH (B) con BC, Fe ₃ O ₄ y FC-Fe ₃ O ₄ .	105
61	Producción de ácidos grasos volátiles totales con BC, Fe ₃ O ₄ y FC- Fe ₃ O ₄ .	106
62	Distribución filogenética de los microorganismos del sistema de DA.	107
63	Abundancia relativa de bacterias (A) y arqueas metanogénicas (B) a nivel género con la adición de MC.	109
64	Patrón electroforético 2D del control y el reactor adicionado con magnetita (B).	110
65	Vías de metanogénesis hidrogenotrófica (A), metilotrófica (B) y acetoclástica (C).	111
66	Mapa de calor para las proteínas más abundantes y los microorganismos asociados.	112



ÍNDICE DE TABLAS

No.	Título	Pág.
1	Resumen de las características de la FORSU de 102 muestras (Fisgativa et al., 2016).	24
2	Principales reacciones de metabolismos sintróficos a través de la transferencia de hidrógeno/formiato interespecies y su energía libre de Gibbs (ΔG°) a pH 7.	29
3	Proteínas, genes y microorganismos de interés en el estudio de la transferencia extracelular de electrones en sistemas anaerobios.	33
4	Bioestimulación con materiales conductores.	36
5	Inmovilización de materiales en polvo sobre distintas matrices para la biotransformación de contaminantes.	44
6	Métodos analíticos (fisicoquímicos y bromatológicos).	51
7	Planteamiento del diseño experimental para ANOVA unifactorial	53
8	Matriz experimental para el análisis de la dosis de CAG.	54
9	Matriz experimental del diseño factorial 3^2 para el rendimiento de metano con respecto al tamaño de partícula y la dosis de CAG.	55
10	Caracterización de materiales conductores.	62
11	Resultados de la caracterización fisicoquímica y bromatológica de los sustratos.	70
12	Resultado del PBM de los materiales conductores a distintas dosis.	74
13	Análisis de varianza unidireccional para rendimiento de metano.	78
14	Intervalos simultáneos de Dunnett.	80
15	Pruebas simultáneas de Dunnett.	81
16	Análisis de varianza para rendimiento de metano con tamaño de partícula y dosis de CAG utilizando SC ajustada para pruebas.	82
17	Constantes cinéticas del modelo modificado de Gompertz.	85
18	Fase de latencia con base en el modelo modificado de Gompertz acotado a 72 horas.	88
19	Masa de MC impregnada por técnica de fijación.	93
20	Resultado de PBM con materiales conductores inmovilizados.	101
21	Constantes cinéticas del modelo modificado de Gompertz para materiales inmovilizados.	104
22	Diferencias en la expresión de las proteínas más abundantes con la adición de magnetita respecto al control.	113



ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

ΔG°	Energía libre de Gibbs estándar (T=298 K, P=1 atm, [C]=1 mol, pH=7)
μA	Microamperes
μg	Microgramos
μL	Microlitros
A	Amperios
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGV's	Ácidos grasos volátiles
AMPTS	Authomatic Methane Potential Test System Sistema Automático de Medición de Potencial de Metano
ANOVA	Analysis of variance <i>Análisis de varianza</i>
atm	Atmósfera
BC	Biocarbón
C/N	Relación carbono/nitrógeno
CAG	Carbón activado granular
CE	Conductividad eléctrica
CV	Coefficiente de variación
d	Día
DA	Digestión anaerobia
Da	Dalton
DIET	Direct interespecies electron transfer Transferencia directa de electrones interespecies
DQO	Demanda química de oxígeno
DQOs	Demanda química de oxígeno soluble
DTG	Termogravimetría diferencial
E°	Potencial de reducción estándar (T=298K, P=1 atm, [C]=1 mol, pH=7)
EBA	European Biogas Asociattion <i>Asociación Europea de Biogás</i>
EDS	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
EET	Extracellular electron transfer <i>Transferencia extracelular de electrones</i>
E_{pa}	Potencial de pico de oxidación anódica
E_{pc}	Potencial de pico de oxidación catódica
EPS	Extracellular polymeric substances <i>Sustancias poliméricas extracelulares</i>
exp	Valor constante exponencial (2.7183)
Fe_3O_4	Magnetita
FID	Flame ionization detector Detector de ionización de flama
FORSU	Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy <i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier</i>
g	Gramo
Gwh	Gigawatt hora



IET	Interespecies electron transfer <i>Transferencia de electrones interespecies</i>
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
kJ	Kilojoule
L	Litro
LAERFTE	Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética
LN, mLN	Litros normalizados, mililitros normalizados (T=273.15 K, P=1 atm)
M	Molaridad
MC	Material conductor
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MFC	Microbial Fuel Cell Celda de combustible microbiana
MIET	Mediated interespecies electron transfer Transferencia mediada de electrones interespecies
mL	Mililitro
MSC	Material semiconductor
mV	Milivoltio
N-NH₄	Nitrógeno amoniacal
N_T	Nitrógeno total
PBM	Potencial bioquímico de metano
pH	Potencial de hidrógeno
P_{máx}	Máxima producción acumulada de metano al término del experimento
ppm	Partes por millón
P_T	Fósforo total
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
R²	Coefficiente de correlación
R_{máx}	Máxima velocidad de producción de metano
RSU	Residuos sólidos urbanos
SAO	Syntrophic acetate oxydizing <i>Oxidación de acetato sintrófica</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SDT	Sólidos disueltos totales
SEDEMA	Secretaría de Medio Ambiente de la Ciudad de México
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SF	Sólidos fijos
SRT	Solid retention time <i>Tiempo de retención de sólidos</i>
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
t	Tiempo
T	Temperatura
TG	Termogravimetría
tp	Tamaño de partícula



TWh	Terawatt hora
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket <i>Reactor anaerobio de flujo ascendente</i>
V	Voltio
VC	Voltamperometría cíclica
Y(t)	Producción acumulada de metano
λ	Fase de latencia
σ	Desviación estándar

RESUMEN

La bioestimulación de la digestión anaerobia (DA) por medio de materiales conductores (MC) ha cobrado relevancia en los últimos años, debido a los efectos que pueden tener sobre el rendimiento de metano y la estabilidad del proceso. Las mejoras han sido asociadas principalmente al enriquecimiento del metabolismo sintrófico por medio de la transferencia directa de electrones entre especies (DIET). Sin embargo, los materiales férricos y carbonosos poseen diversas propiedades fisicoquímicas y morfológicas a las cuales se pueden atribuir dichas mejoras y es complejo, encontrar el o los factores que logran hacer más eficiente el proceso sin un análisis profundo y multi enfoque. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de la adición de carbón activado granular, biocarbón y magnetita en la digestión anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), caracterizando la química superficial de los materiales y sus efectos potenciales sobre la DA, el impacto de la dosis, el tamaño de partícula y su incorporación de forma suspendida e inmovilizada. Para ello se determinaron los principales parámetros cinéticos, a partir de pruebas de potencial bioquímico de metano en régimen discontinuo, monitoreando parámetros como pH, ORP y concentración de AGV, así como la comunidad microbiana y la expresión de proteínas indicadoras de rutas metabólicas. Se evidenció que los MC poseen propiedades que permiten mejorar el proceso, como un pH básico, grupos funcionales redox, microelementos como Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} y microporosidad. La adición de biocarbón y magnetita en dosis de 1 g/L y 0.1 g/L respectivamente, mostraron la mayor significancia estadística en comparación con el grupo control, mejorando el rendimiento de metano en un 20 y 30%. La magnetita y el biocarbón permitieron un proceso estable y una rápida recuperación ante la acidificación y las altas concentraciones de AGV, así como mantener valores de potencial redox alrededor de -300 mV, lo cual favoreció la ruta de metanogénesis acetoclástica, evidenciada a su vez, con el enriquecimiento de bacterias oxidantes de acetato sintróficas como *Geobacter spp.* y arqueas de las familias Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae, particularmente las especies *M. soehngenii*, *M. harundinacea* y *M. barkeri*. Asimismo, se pudo constatar la regulación al alza de proteínas clave en esta vía metabólica como acetil coenzima A sintetasa, acetil CoA descarboxilasa sintasa, metil coenzima M reductasa y transferasas transmembrana capaces de oxidar acetato u otros compuestos orgánicos a partir del Fe (III). De tal manera que la mejora no se puede adjudicar únicamente a la conductividad de los materiales ni a la DIET, pues en el proceso de bioestimulación convergen múltiples causas.

Palabras clave: Digestión anaerobia, FORSU, bioestimulación, carbón activado, biocarbón, magnetita.



ABSTRACT

Biostimulation of anaerobic digestion (AD) by means of conductive materials (CM) has gained relevance in recent years, due to the effects they can have on methane yield and process stability. Improvements have been mainly associated with the enrichment of syntrophic metabolism by direct interspecies electron transfer (DIET). However, ferric and carbonaceous materials possess diverse physicochemical and morphological properties to which such improvements can be attributed and it is complex to find the factor(s) that make the process more efficient without a deep and multi-focused analysis. Due to the above, the objective of this work was to analyze the influence of the addition of granular activated carbon, biochar and magnetite in the AD of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), characterizing the surface chemistry of the materials and their potential effects on AD, the impact of the dose, the particle size and their incorporation in suspended and immobilized form. To this end, the main kinetic parameters were determined from batch biochemical methane potential tests, monitoring parameters such as pH, ORP and VFA concentration, as well as the microbial community and the expression of indicator proteins of enhanced metabolic pathways. It was evidenced that the MCs possess properties that allow improving the process, such as basic pH, redox functional groups, microelements such as Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} and microporosity. The addition of biochar and magnetite at doses of 1 g/L and 0.1 g/L, respectively, showed the highest statistical significance compared to the control group, improving methane yield by 20 and 30%. Magnetite and biochar allowed a stable process and rapid recovery from acidification and high VFA concentrations, as well as maintaining redox potential values around -300 mV, which favored the acetoclastic methanogenesis pathway, evidenced in turn, with the enrichment of syntrophic acetate oxidizing bacteria such as *Geobacter spp.* and archaea of the families Methanosaetaceae and Methanosarcinaceae, particularly the species *M. soehngenii*, *M. harundinacea* and *M. barkeri*. Likewise, up-regulation of key proteins in this metabolic pathway such as acetyl coenzyme A synthetase, acetyl CoA decarbonylase synthase, methyl coenzyme M reductase and transmembrane transferases capable of oxidizing acetate or other organic compounds from Fe (III) could be observed. Thus, the improvement cannot be attributed solely to the conductivity of the materials or to DIET, since multiple causes converge in the biostimulation process.

Key words: Anaerobic digestion, OFMSW, biostimulation, activated carbon, biochar, magnetite.

1. INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia (DA) se considera una tecnología prometedora para hacer frente a los problemas energéticos y ambientales actuales debido a su capacidad para convertir una gran variedad de residuos sólidos y líquidos de tipo municipal e industrial en metano (CH_4), un valioso portador de energía (Ampese *et al.*, 2022). A nivel mundial el biogás representa uno de los recursos energéticos más sostenibles y con mayor potencial de crecimiento. Pese a que nuestro país cuenta con una escasa producción, se proyecta un desarrollo derivado de la necesidad de aprovechar fuentes alternativas de energía, y en este sentido, la aún vigente Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética (LAERFTE, 2015) establece como meta la generación del 35% de la energía eléctrica a partir de fuentes alternativas para el año 2024.

De acuerdo con el último reporte de la Asociación Europea de Biogás (EBA) (2020), la cantidad de plantas que producen biogás pasó de 6,227 en 2009 a 18,943 a finales de 2019, es decir, en 10 años se incrementó un 67% el número de plantas, siendo los países con mayor capacidad instalada Alemania (+900 GWh), Francia (+133 GWh) y Suecia (+78 GWh). Es preciso señalar que aproximadamente el 70% de la producción de biogás proviene de sustratos agrícolas (12,446 plantas), el resto de las plantas corresponde a lodos del tratamiento de aguas residuales (2,838), residuos de vertederos (1,604) y otros tipos de residuos (688) (EBA, 2020).

A pesar del potencial de esta tecnología, la digestión anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) todavía es relativamente limitada; en Europa, por ejemplo, la producción de biogás a partir de este sustrato representa alrededor del 12% (EBA, 2020). En este sentido, la literatura refiere que la naturaleza heterogénea de los desechos deriva en una producción inestable de metano, especialmente bajo altas tasas de carga orgánica (Fagbohungebe *et al.*, 2017; Hobbs *et al.*, 2018; Cruz *et al.*, 2022), condición que está relacionada con fallas del sistema debido al desequilibrio entre la acidificación y la metanización, derivando en la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV's) y disminución del pH. Estas limitaciones se han logrado mitigar controlando principalmente parámetros de operación en plantas a escala industrial (Ghanimeh *et al.*, 2018; Uddin y Wright, 2022).

A través de investigaciones a escala laboratorio y piloto, se han realizado grandes esfuerzos para mejorar la viabilidad de la tecnología. Tales esfuerzos se han basado principalmente en la optimización de parámetros de operación y diseño de reactores, co-digestión, pretratamientos, y más recientemente la bioaumentación y la



bioestimulación (Tyagi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Kanaujia y Singh, 2022). Diversas investigaciones plantean la necesidad de comprender y mejorar el proceso a nivel de la comunidad microbiana, dado que un proceso biológico depende básicamente de la actividad sintrófica de los microorganismos involucrados, lo que tiene influencia significativa en el rendimiento del proceso (Nguyen *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022).

En el contexto del metabolismo microbiano, la sintrofia (*syn* unión, *trophe* alimentación) se refiere a la asociación o dependencia para la alimentación de dos especies; aplicado a organismos que combinan sus capacidades metabólicas para catabolizar sustancias que individualmente no podrían transformar. Uno de los procesos sintróficos más estudiados es el proceso de oxidación de productos fermentables finales (acetato, etanol, butirato) por microorganismos como *Syntrophomonas*, donde la oxidación sería energéticamente desfavorable sin la colaboración de los metanógenos hidrogenotróficos, sus parejas sintróficas, que disminuyen las presiones parciales de este gas y permiten superar las barreras energéticas, descomponiendo los sustratos que por sí mismos no podrían digerir (Harichi *et al.*, 2022).

Con el fin de bioestimar el sintrofismo entre bacterias fermentadoras secundarias y arqueas metanogénicas, mejorando la degradación de metabolitos y la conversión eficiente a metano, se ha evaluado la adición de micronutrientes como hierro, cobre, níquel, manganeso, molibdeno y zinc (Zhang y Jahng, 2012; Choong *et al.*, 2016; Capson-Tojo *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2022) y más recientemente se ha analizado el efecto de materiales conductores (MC) y semiconductores (MSC) como minerales y compuestos a base de carbono (Xiao *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2020; Nabi *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

Múltiples evidencias sugieren que los materiales conductores eléctricos estimulan la transferencia directa de electrones en el metabolismo sintrófico anaerobio, teniendo efectos positivos sobre la tasa de producción y el rendimiento de metano al incrementar la población de bacterias consumidoras de H₂, disminuir la fase de latencia y facilitar su inmovilización (Cheng y Call, 2016; Capson-Tojo *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022). Aunado a lo anterior, algunas investigaciones reportan que es posible mejorar la estabilización del pH, la degradación de los lípidos, la reducción de la inhibición por amoníaco, fenoles, metales pesados y limoneno, además de lograr una mayor eliminación de sólidos volátiles (SV) y demanda química de oxígeno (DQO) (Luo *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2016; Lü *et al.*, 2016; Dang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Capson-Tojo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022).



Es importante destacar que, aunque existe una cantidad importante de investigaciones al respecto, gran parte de los estudios se basan en el análisis de monosustratos como glucosa, etanol, propionato, butirato y acetato (Lu *et al.*, 2020) y es necesario un mayor análisis sobre sustratos complejos como la FORSU. Finalmente, una limitante para el uso a escala industrial de algunos materiales comerciales que favorezcan el metabolismo sintrófico son los costos de producción, tal es el caso del fieltro o los nanotubos de carbono (Zhao *et al.*, 2017). De este modo, la utilización de materiales conductores y semiconductores producidos a partir de residuos orgánicos como el endocarpio de coco, para la elaboración de carbón activado o biocarbón, podría ser una estrategia factible para mejorar el metabolismo sintrófico en el proceso de la digestión anaerobia (Ngo *et al.*, 2022).

La presente investigación busca poner en evidencia el efecto que el carbón activado granular (CAG), el biocarbón (BC) y la magnetita (Fe_3O_4) tienen sobre la conversión metanogénica de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos evaluando los principales parámetros cinéticos del proceso de digestión anaerobia cuando éstos son incorporados de forma suspendida o inmovilizada en los reactores anaerobios.

2. JUSTIFICACIÓN

La producción de metano por digestión anaerobia, aunque es una tecnología madura, sigue teniendo interrogantes sobre su funcionamiento con algunos sustratos, sobre todo aquellos tan heterogéneos como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. Las altas cargas orgánicas de FORSU derivan de inmediato en problemas de acumulación de AGV's e inhibición por amoníaco, provocando un descenso en el pH a valores inadecuados para los microorganismos metanógenos, bajando los rendimientos de recuperación de energía.

El desarrollo de investigación en torno a la digestión anaerobia continúa siendo de gran relevancia, ya que, a pesar de tener importantes beneficios socioambientales, su viabilidad sigue siendo afectada sobre todo en países en vías de desarrollo debido a limitaciones técnicas, económicas, de mercado e institucionales, mismas que impiden el crecimiento de este tipo de tecnología, e incluso con subsidios a la inversión o por unidad de energía producida, tiene periodos de retorno de inversión y valores presentes netos desfavorables (Norouzu y Dutta, 2022). Es entonces que mejorar la calidad y cantidad de biogás es primordial para mejorar la rentabilidad del proceso.

Diversas estrategias para mejorar la eficiencia global del proceso se siguen investigando e implementando a escala laboratorio, piloto e industrial, tal es el caso de la optimización de parámetros de operación, el diseño de nuevas configuraciones de reactores, las co-digestiones de sustratos, los pretratamientos de sustratos lignocelulósicos, la ingeniería genética para mejorar el desempeño de las comunidades microbianas involucradas y la incorporación de aditivos o elementos bioestimulantes (Tyagi *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2020; Kanaujia y Singh, 2022).

Con respecto a la bioestimulación, la adición de materiales conductores en los sistemas de digestión anaerobia con el propósito de mejorar las relaciones sintróficas del sistema a través de la transferencia directa de electrones interespecies constituye una línea de investigación, que si bien se ha explorado en los últimos años con resultados promisorios, se encuentra todavía en desarrollo porque parte de los trabajos reportados han estudiado sustratos simples como glucosa, etanol, propionato y butirato (Lee *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Barua *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). La influencia de la transferencia directa de electrones interespecies en la conversión de residuos más complejos en metano, como es el caso de la FORSU, requiere investigaciones más amplias para sustentar su uso en aplicaciones a escala industrial.

Este trabajo de investigación resulta de importancia, puesto que durante muchos años se creyó que metabolitos como el hidrógeno y formiato eran el único mecanismo de transferencia de electrones para la reducción final a metano en la digestión anaerobia,



y, además, se consideraba el más sostenible para las células desde el punto de vista energético. Ahora se sabe que el proceso de transferencia extracelular de electrones tiene mecanismos mediados y directos (clasificados hasta 2016, por Cheng y Call). El mecanismo directo que tienen las células es el uso de proteínas de transporte transmembrana, las cuales disminuyen la energía libre de Gibbs necesaria para la formación de productos finales, pero a su vez, requiere energía para la biosíntesis de estas biomoléculas, es entonces que la adición de materiales conductores, se presenta como un mecanismo análogo que puede favorecer aún más la conservación y utilización de energía de las células en la conversión de productos de interés como el metano.

Si bien el fenómeno de transferencia extracelular de electrones no ha sido sencillo de dilucidar y ha tenido resultados muchas veces inconclusos y controversiales, específicamente en el área de la digestión anaerobia, es cierto que su análisis sólo puede encontrar evidencias interrelacionadas y concluyentes desde una visión multidisciplinaria; enfoque que pretende llevarse a cabo a través de esta investigación, empleando herramientas de modelación matemática, estadística, biología molecular, microscopía y química de superficies, y no sólo centrarse en evaluar el rendimiento neto del proceso.

3. HIPÓTESIS

La adición de materiales conductores como el carbón activado granular, biocarbón y magnetita en la digestión anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos mejorará el rendimiento de biogás y la estabilidad del proceso debido al incremento en la transferencia directa de electrones entre especies (DIET), que a su vez propicia una mayor sintrofia entre bacterias fermentativas secundarias y arqueas metanogénicas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el rendimiento del proceso de digestión anaerobia a partir de la adición de tres materiales conductores: carbón activado granular, biocarbón y magnetita, incorporados de forma suspendida e inmovilizada en reactores anaerobios operados en lote, para el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar la composición, morfología, grupos funcionales y conductividad eléctrica de los materiales conductores mediante MEB-EDS, FTIR y CE para identificar las propiedades atribuibles a una mejora en el rendimiento de la digestión anaerobia.
- 2) Evaluar la influencia de la dosis, el tamaño de partícula y la adición de los materiales conductores en suspensión e inmovilizados mediante pruebas de potencial bioquímico de metano para determinar el rendimiento del proceso a partir de un modelo cinético y un análisis estadístico.
- 3) Determinar el efecto de los materiales conductores sobre el pH, el potencial redox y la concentración de ácidos grasos volátiles en el sistema para analizar su capacidad amortiguadora, sus propiedades reductoras y las variaciones en la tasa de hidrólisis y formación de productos inhibitorios.
- 4) Identificar cambios en la expresión génica de proteínas de transporte de electrones con el uso de los materiales conductores, a través de un análisis proteómico para obtener evidencia del fenómeno de transferencia directa de electrones entre especies.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Contexto de la generación de RSU en México y el mundo

De acuerdo con las cifras más recientes que proporciona la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a través del Diagnóstico Básico para la Gestión Integral de los residuos, al año 2020 la generación de residuos sólidos urbanos (RSU) llegó a 120,128 t/día en México, con una generación per cápita de 0.944 kg/hab/día. La generación de RSU se ha incrementado notablemente en los últimos años; tan sólo entre 2003 y 2015 creció 61.2%, como resultado principalmente del crecimiento urbano, el desarrollo industrial, las modificaciones tecnológicas y el cambio en los patrones de consumo. Según los últimos datos de SEMARNAT (2020) sobre la composición de RSU, 46.42% corresponde a la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos (FORSU). En el caso particular de la Ciudad de México, de acuerdo con datos de la SEDEMA (2019), los habitantes y la población flotante generaron 13,149 toneladas diarias de RSU (1.4 kg/hab/día), de los cuales entre 6,000 y 6,500 corresponden a la fracción orgánica, es decir, alrededor del 45%.

En el contexto global, el último informe de 2018 del Banco Mundial, estima que actualmente se producen en el mundo 2,010 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos (RSU) por año; y se prevé que para el año 2030 y 2050 esta cantidad se incremente en un 30 y 70% respectivamente (Figura 1) (Kaza *et al.*, 2018).

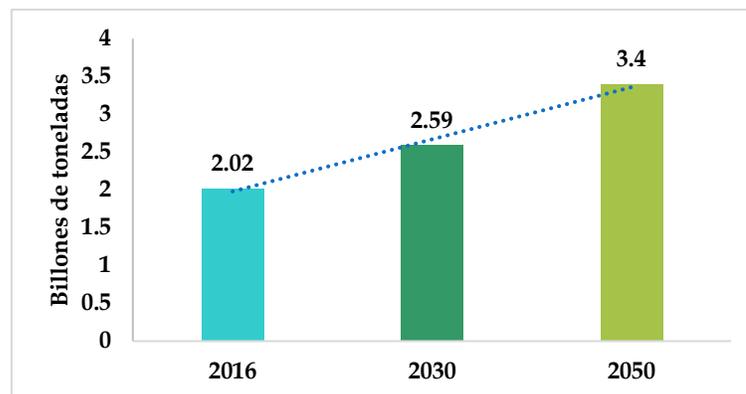


Figura 1. Generación global de residuos proyectada por el Banco Mundial.

Fuente: Adaptado de Kaza *et al.*, 2018.

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) es un sustrato sumamente heterogéneo que varía en función de factores como la ubicación geográfica, el número de habitantes, la cultura gastronómica, la estación del año, las actividades productivas, el poder adquisitivo de la población, la época de muestreo o el método de recolección (Kanaujia y Singh, 2022). En la Figura 2 es posible notar la influencia que tiene el nivel de ingreso sobre el porcentaje de materia orgánica en los desechos. Cabe señalar que México sigue un patrón de composición de RSU muy similar al de países

de ingreso medio-alto y medio-bajo, con tendencia a reducir la cantidad de residuos orgánicos en su matriz de composición, de acuerdo con los datos del Banco Mundial.

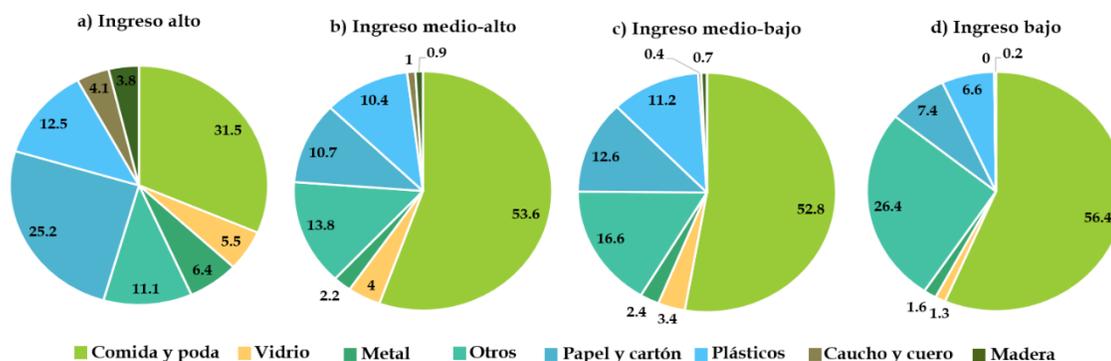


Figura 2. Composición de los RSU en el mundo por nivel de ingreso.

Fuente: Adaptado de Kaza *et al.*, 2018.

5.1.1 Características fisicoquímicas y bromatológicas de la FORSU

Los parámetros físicos, químicos y bromatológicos de la FORSU pueden variar de manera importante, aunque existen características generales que pueden extrapolarse en todo el mundo. Con el objetivo de determinar la variabilidad de las características de la FORSU y analizar su influencia sobre el proceso de digestión anaerobia, Fisgativa *et al.* (2016) compilaron los resultados de 70 investigaciones al respecto y realizaron un análisis estadístico, mismo que se resume en la Tabla 1.

Los resultados indicaron que los valores de las caracterizaciones de FORSU son en efecto muy variables y que el 24% de estas variaciones pueden explicarse por el origen geográfico, el tipo de recolección y la estación del año. De acuerdo con el promedio de sólidos volátiles (SV), la demanda Química de Oxígeno (DQO) y el potencial bioquímico de metano (PBM), la FORSU muestra un buen potencial para el tratamiento por vía anaerobia. Este sustrato se caracteriza por un contenido de humedad de 74 a 90%, una fracción de sólidos volátiles de alrededor de $88 \pm 8.2\%$ y un pH ácido promedio de 5.1 ± 0.7 . La FORSU típica está compuesta principalmente de carbohidratos degradables (41–62%), proteínas (15–25%) y lípidos (13–30%). En general, tiene proporciones variables de nutrientes y micronutrientes, aunque posee una relación C/N relativamente baja, que varía entre 13.2 y 24.5 así como niveles bajos de metales pesados (Fisgativa *et al.*, 2016).

La digestión de la fracción lipídica aumenta el rendimiento de CH_4 hasta 0.7–1.01 L/g_{sv}, sin embargo, requiere un tiempo de digestión más largo (50–65 días) debido a su complejidad estructural (Koch *et al.*, 2015; Awe *et al.*, 2018). Por su parte, las proteínas y la digestión de almidón requieren menos tiempo de retención, de

aproximadamente 15 a 25 días, sin embargo, la tasa de producción de CH₄ con estos sustratos tiene un intervalo de 0.42-0.50 L/g_{sv}, es decir, 50% menos que la de la digestión de lípidos (Raposo *et al.*, 2006), además, los sustratos ricos en proteínas pueden proporcionar capacidad buffer y los sustratos ricos en carbohidratos pueden equilibrar la relación C/N, lo que podría minimizar el riesgo de inhibición (Chiu y Lo, 2018). Debido a sus características fundamentales como la amplia disponibilidad, alta fracción orgánica biodegradable y en particular alto contenido de carbohidratos, la FORSU ha sido considerada como una fuente económica atractiva para la producción de energía, y las características del sustrato influyen en gran medida en el rendimiento de los procesos de digestión anaerobia.

Tabla 1
Resumen de las características de la FORSU de 102 muestras (Fisgativa *et al.*, 2016)

Parámetro	Número de muestras (n)	Media (\bar{X})	Desviación estándar (σ)	Coefficiente de variación (CV %)
Características fisicoquímicas				
pH	65	5.1	0.7	13.9
ST (% WW)	94	22.8	10	43.7
SV (% DM)	73	88.2	8.2	9.3
DQO (g/kg WW)	15	198	89	45
DQO _s (g/kg WW)	14	99	157	158.7
PBM (LNCH ₄ /kg _{sv})	10	460	87.6	19
Composición elemental				
C (% DM)	68	45.5	7.5	16.6
H (% DM)	28	7	3.3	46.5
O (% DM)	21	33.2	6.7	20.1
N (% DM)	79	2.8	1.1	40.3
S (% DM)	23	0.4	0.2	56.9
C/N	68	18.5	5.9	31.8
Características bromatológicas				
Carbohidratos (% SV)	24	36	21	57.2
Hemicelulosa (% SV)	9	9	5	52.8
Celulosa (% SV)	10	9	8	94.5
Lignina (% SV)	11	7	6	92.8
Proteínas (% SV)	26	21	13	62.2
Grasas (% SV)	28	15	8	52.0
Elementos nutricionales				
Nitrógeno Kjeldahl (g/kg DM)	30	16	12	75.8
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	35	731	958	131
N-NO ₃ (ppm DM)	9	105	50	47.4
Ca (% DM)	12	1.6	1.3	85.5
K (% DM)	24	1.2	0.7	57.7
Mg (% DM)	11	0.2	0.2	116.4
Na (% DM)	12	2.2	2.9	132.3
P (% DM)	33	0.5	0.3	62.9
Fe (ppm DM)	16	482	815	168.9
Mn (ppm DM)	15	162.5	48.4	77.5
Mo (ppm DM)	10	1.2	1.1	90.2
Zn (ppm DM)	8	87	110	127.4

*DM= Base seca, WW= Base húmeda

5.2 Digestión anaerobia y sintrofismo

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico que conduce a la conversión de materia orgánica en gases, principalmente metano y dióxido de carbono por medio de las distintas rutas metabólicas de un consorcio microbiano, que tiene a su vez, como subproducto, un digestato con nutrientes en formas minerales fácilmente asimilables (Tambone *et al.*, 2010). El proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo en cuatro etapas clave: 1) hidrólisis, 2) acidogénesis, 3) acetogénesis y 4) metanogénesis (Figura 3), aunque cabe señalar que no son etapas separadas una de otra, sino que existe sintrofia entre ellas, es decir, colaboración de varias especies para realizar una reacción química que, de otra forma, sería desfavorable energéticamente. A continuación, se describe cada etapa.

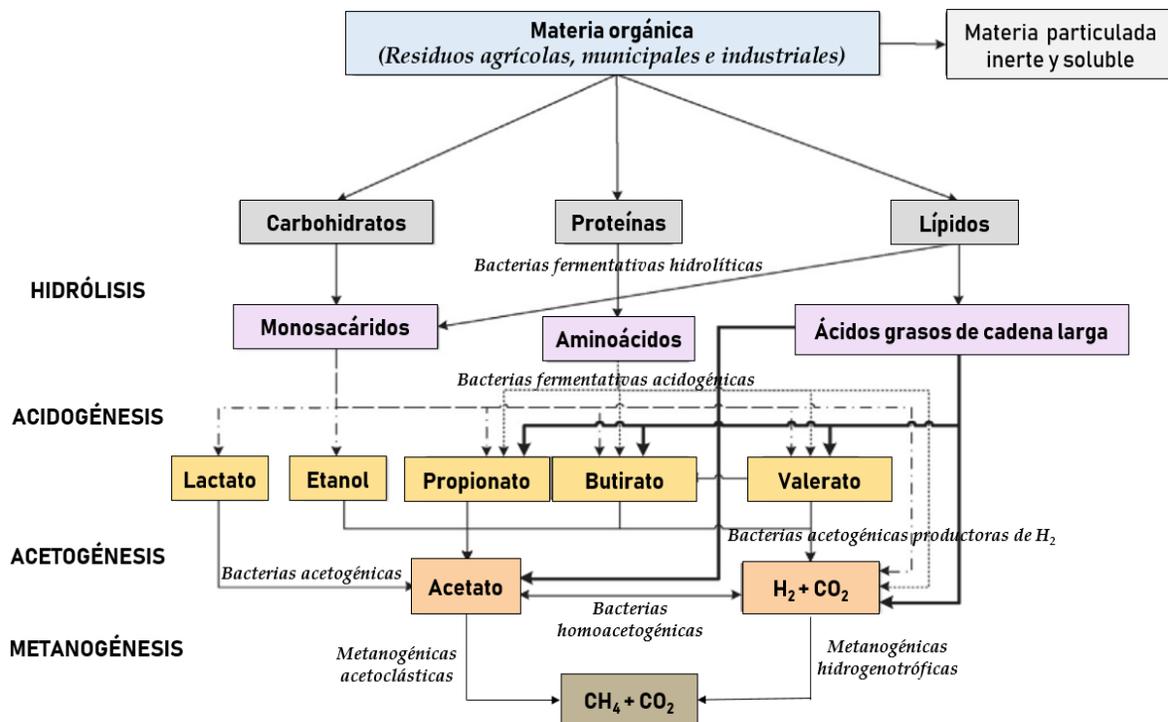


Figura 3. Etapas de la digestión anaerobia.

Fuente: Modificado de Gujer y Zehnder, 1983 y de Ghimire *et al.*, 2015.

- 1) **Hidrólisis:** Los compuestos solubles de alta masa molecular son hidrolizados por exoenzimas hidrolíticas excretadas por bacterias hidrolíticas fermentativas a sus monómeros o dímeros, como los aminoácidos, glúcidos simples y ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Los filos de bacterias hidrolíticas dominantes son Firmicutes (principalmente *Clostridium*), Bacteroidetes y Actinobacteria. Estas bacterias, que pueden descomponer la FORSU en moléculas simples, tienen un tiempo de duplicación rápido y pueden mantenerse en condiciones ambientales más variables comparado con los microorganismos metanógenos (Mata-Álvarez *et al.*, 2014).

Dependiendo de la composición y estructura del sustrato, la hidrólisis o la metanogénesis pueden considerarse como las etapas limitantes. En el caso de compuestos orgánicos complejos, como son los lignocelulósicos, la hidrólisis es por lo general la etapa limitante, incluso, la velocidad de producción, la cantidad y la variedad de enzimas hidrolíticas liberadas por microorganismos hidrolíticos a menudo no son suficientes para degradar adecuadamente un sustrato de este tipo. Por otro lado, en el caso de sustratos orgánicos fácilmente hidrolizables, un paso de acidogénesis rápido e importante puede conducir a una acidificación del medio, inhibiendo a los microorganismos metanogénicos más susceptibles a las variaciones de pH (Fisgativa *et al.*, 2016).

- 2) **Acidogénesis:** En esta etapa los productos de la hidrólisis son convertidos en ácidos orgánicos; acético y otros ácidos grasos volátiles (AGV's) como ácido propiónico y butírico fundamentalmente, alcoholes, aldehídos, hidrógeno y dióxido de carbono. Las proporciones de los diferentes subproductos dependen de las especies de microorganismos y las condiciones ambientales dentro del reactor (Zhao *et al.*, 2017). Los filos de bacterias acidogénicas que más abundan son las Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes y Proteobacteria y desempeñan una función clave en el tercer paso para establecer la asociación sintrófica entre los microorganismos acetógenos y los metanógenos.
- 3) **Acetogénesis:** Se le conoce también como acidogénesis intermediaria en la cual los AGCL son convertidos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. El mecanismo de oxidación anaerobia de los AGCL es la β -oxidación (Mao *et al.*, 2015). Las bacterias acetogénicas pertenecen a los filos Firmicutes (*Syntrophomonas*, *Acetobacterium*), Proteobacteria (*Syntrophobacter* y *Syntrophus*) y establecen una relación sintrófica con los microorganismos metanógenos hidrogenotróficos para facilitar la transferencia interespecies del hidrógeno.

El metabolismo sintrófico es importante para mantener baja la presión parcial de hidrógeno durante el proceso, ya que valores superiores a 10^{-4} atm pueden alterar las interacciones entre las comunidades microbianas y por consiguiente la conversión final a metano de forma eficiente (Tyagi *et al.*, 2018). Además, esto conlleva que la termodinámica de la reacción se vea desfavorecida para que las bacterias fermentativas continúen la degradación de los compuestos orgánicos reducidos, como etanol, propionato, butirato. En algunos entornos metanogénicos, el formiato también se ha identificado como un portador de electrones entre metanógenos y bacterias fermentativas (Barua y Dhar, 2017).

- 4) **Metanogénesis:** La metanogénesis se clasifica en acetoclástica cuando el metano es producido a partir de acetato, que es la fuente de carbono, y, por otra parte, se considera metanogénesis hidrogenotrófica cuando se produce a partir de la reducción del dióxido de carbono, siendo éste la fuente de carbono y el aceptor de

electrones, pero teniendo al hidrógeno como donador de electrones. Los metanógenos acetoclásticos pertenecen a dos géneros: *Methanosaeta* y *Methanosarcina*, esta última puede convertir tanto acetato como hidrógeno (Venkiteshwaran *et al.*, 2016). *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum* y *Methanoculleus* son los metanógenos hidrogenotróficos más comúnmente identificados en el proceso (Wang *et al.*, 2018).

5.3 Transferencia extracelular de electrones

Los microorganismos que tienen la capacidad de producir electricidad se conocen como electrogénicos, lo hacen generando electrones dentro de sus células a partir de procesos como la respiración, mismos que luego deben transferir a través de sus membranas celulares mediante pequeños canales formados por proteínas de superficie, de tal forma que el proceso metabólico no se vea inhibido. Este proceso se denomina transferencia extracelular de electrones (Cheng y Call, 2016) (EET, por sus siglas en inglés) y tiene varios mecanismos para llevarse a cabo (Figura 5).

Sin embargo, es importante mencionar que la mejor comprensión de este fenómeno tuvo lugar en años recientes, con el avance de las ciencias ómicas que permitieron la comparación de genomas, la purificación, caracterización y modelado de la estructura cristalina de proteínas y con ello, el desarrollo de tecnologías que aprovecharon estos procesos biológicos como las tecnologías de biorremediación de suelo, agua y aire, las celdas de combustible microbianas o los biosensores. La Figura 4 presenta mediante una línea del tiempo los sucesos clave que hicieron posible dilucidar el proceso de transferencia extracelular de electrones.

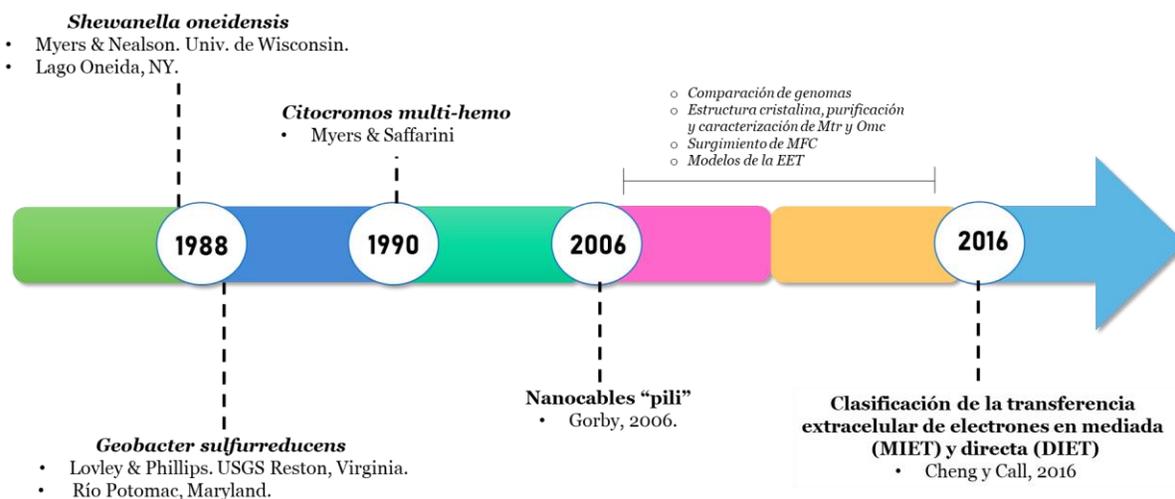


Figura 4. Línea del tiempo de la transferencia extracelular de electrones.

Fuente: Elaboración propia con datos de El-Naggar *et al.*, 2010; Cheng y Call, 2016 y Lovley, 2017.



Desde la década de 1960 y durante muchos años, se creyó que la transferencia de hidrógeno y formiato entre los metanógenos y sus parejas sintróficas era el único mecanismo de transferencia de electrones y además se consideraba que era el más sostenible para las células desde el punto de vista energético. Fue hasta 1988 cuando Myers y Nealson demostraron en investigaciones sobre el sedimento del Lago Oneida, en Nueva York, que la bacteria *Shewanella oneidensis* tenía la capacidad de oxidar materia orgánica y reducir iones metálicos mientras liberaba energía a partir de los electrones generados.

Shewanella oneidensis se encuentra en ambientes anóxicos y se considera uno de los microorganismos más versátiles para la transferencia extracelular de electrones ya que puede utilizar hidrógeno, formiato, lactato, piruvato o algunos aminoácidos como donadores de electrones, los que a su vez pueden ser cedidos a aceptores finales como el oxígeno, nitrato, nitrito, manganeso IV y III, hierro III, fumarato, dimetilsulfóxido, óxido de trimetilamina, azufre, tiosulfato, uranio, cromo, arsénico, selenio, yodo, cobalto, entre otros. Posteriormente Lovley y Phillips, en el mismo año (1988) descubrieron que *Geobacter sulfurreducens* también era una bacteria electrogénica.

En 1990 Myers y Saffarini identificaron varios tipos de citocromos (CymA, MtrA, MtrB y MtrC), que son proteínas que desempeñan la función de transporte de electrones desde el interior hacia el exterior de la célula siendo importantes en la transferencia directa de electrones en conjunto con los “pili”, proteínas filamentosas que fueron puestas en evidencia hasta el año 2006 por Gorby *et al.* En el año 2010, Summers *et al.* revelaron que algunas bacterias podían transferir directamente electrones a través de estos nanocables microbianos a arqueas metanógenas (Figura 6C), en lugar de estar mediados por ciertos metabolitos o sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Figura 6A y 6B). A continuación, se describen los dos mecanismos de transferencia de electrones interespecies: mediado y directo, en el contexto de la digestión anaerobia.

5.3.1 Transferencia mediada de electrones interespecies (MIET)

En entornos metanogénicos, la asociación sintrófica entre las bacterias productoras de hidrógeno y los metanógenos que consumen hidrógeno es la clave para mantener condiciones equilibradas y estables. El lento metabolismo sintrófico del propionato y el butirato en los digestores anaerobios a menudo se ha reportado como un factor limitante crucial para la velocidad de reacción global (Wang *et al.*, 2021). La transferencia de electrones a través del hidrógeno y el formiato como portadores de electrones se conoce como la vía principal para el intercambio de electrones entre microorganismos sintróficos.

La degradación anaerobia de los principales productos intermedios como el propionato y el butirato, es termodinámicamente desfavorable, es decir, es una

reacción endergónica en condiciones estándar de presión y temperatura (Tabla 2). El hidrógeno o el formiato como equivalente reductor deben ser consumidos rápidamente por los metanógenos para el adecuado crecimiento y metabolismo de sus parejas sintróficas; en otras palabras, la reacción se habilita a una baja presión parcial de hidrógeno o concentración de formiato. Por lo tanto, muchos estudios han intentado proporcionar condiciones favorables para comunidades sintróficas en digestores anaerobios (Baek *et al.*, 2018).

Tabla 2
Principales reacciones de metabolismos sintróficos a través de la transferencia de hidrógeno/formiato interespecies y su energía libre de Gibbs (ΔG°) a pH 7

Portador de electrones	Reacciones principales	ΔG° (kJ/mol)	
Hidrógeno	Degradación de propionato	$\text{Propionato}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	+76.5
	Producción de metano	$3/4 \text{HCO}_3^- + 3/4\text{H}^+ + 3\text{H}_2 \rightarrow 3/4\text{CH}_4 + 9/4\text{H}_2\text{O}$	-101.7
	Reacción general	$\text{Propionato}^- + 3/4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^- + 1/4\text{HCO}_3^- + 1/4\text{H}^+ + 3/4\text{CH}_4$	-25.2
	Degradación de butirato	$\text{Butirato}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acetato}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48.3
Formiato	Producción de metano	$1/2\text{HCO}_3^- + 1/2\text{H}^+ + 2\text{H}_2 \rightarrow 1/2\text{CH}_4 + 3/2 \text{H}_2\text{O}$	-67.8
	Reacción general	$\text{Butirato}^- + 1/2\text{H}_2\text{O} + 1/2\text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{Acetato}^- + 1/2\text{H}^+ + 1/2\text{CH}_4$	-19.5
	Degradación de propionato	$\text{Propionato}^- + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{Acetato}^- + 3\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	+65.3
	Producción de metano	$3\text{HCOO}^- + 3\text{H}^+ \rightarrow 3/4\text{CH}_4 + 9/4\text{CO}_2 + 3/2\text{H}_2\text{O}$	-144.5
Formiato	Reacción general	$\text{Propionato}^- + 2\text{H}^+ + 1/2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^- + 1/4\text{CO}_2 + 3/4\text{CH}_4$	-79.2
	Degradación de butirato	$\text{Butirato}^- + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 \rightarrow 2\text{Acetato}^- + \text{HCOO}^- + 2\text{H}_2$	+38.5
	Producción de metano	$2\text{HCOO}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 1/2\text{CH}_4 + 3/2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-96.3
	Reacción general	$\text{Butirato}^- + \text{H}_2\text{O} + 1/2\text{CO}_2 \rightarrow 2\text{Acetato}^- + 1/2\text{CH}_4$	-57.8

El hidrógeno y el formiato funcionan de manera similar en la mediación de electrones para EET en procesos de digestión anaerobia; sin embargo, tienen diferentes características fisicoquímicas. El hidrógeno tiene una ventaja sobre el formiato en la generación de un gradiente de concentración debido a su solubilidad mucho más baja. Esta diferencia hace que el gradiente de concentración entre microorganismos productores y eliminadores sea significativamente mayor (hasta 1000 veces) con hidrógeno que con formiato (De Bok *et al.*, 2004). Por otro lado, el hidrógeno muestra una velocidad de difusión 30 veces mayor en agua en comparación con el formiato. Debido a estas características, la transferencia de formiato interespecies puede ser superior a la transferencia de hidrógeno cuando las distancias intermicrobianas son grandes, y viceversa, en términos de generar un gradiente de concentración.

5.3.2 Transferencia directa de electrones interespecies (DIET)

En la transferencia directa, los electrones liberados por los microorganismos exoelectrogénicos se transfieren directamente a los microorganismos capturadores de electrones a través de los citocromos asociados a la membrana y los pili conductores que forman conexiones eléctricas entre los socios sintróficos (Figura 6C). Se ha sugerido que la DIET es más rápida y energéticamente más eficiente que la transferencia mediada a través de hidrógeno o formiato como portadores de electrones (Figura 5); por lo tanto, el rendimiento metanogénico puede mejorarse potencialmente promoviendo la DIET en la digestión anaerobia (Cheng y Call, 2016; Mei *et al.*, 2018).

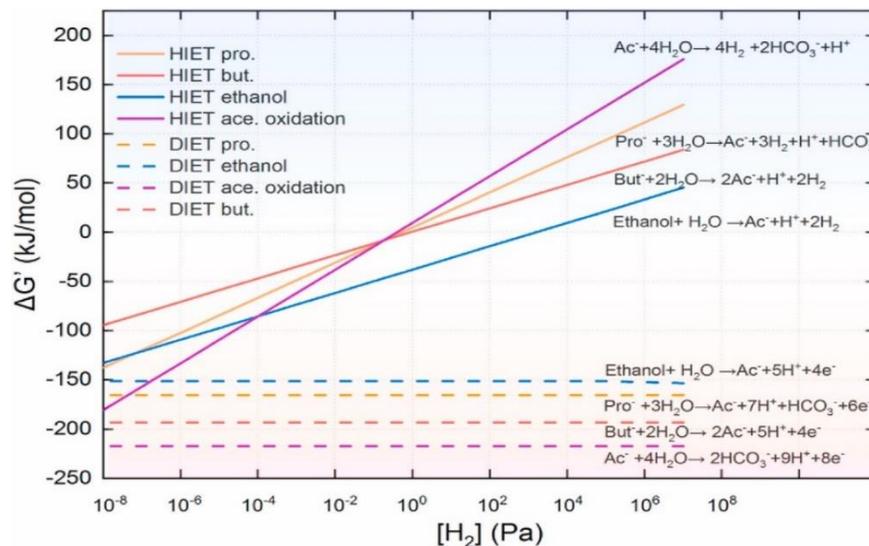


Figura 5. Comparación termodinámica de la oxidación de etanol y ácidos orgánicos mediante HIET y DIET

Fuente: Wang *et al.*, 2021.

El mecanismo de transferencia directa involucra la participación de proteínas filamentosas unidas a la membrana celular llamadas "pili", las cuales, entre otras funciones sirven para conectar físicamente y transferir electrones entre las células, con ayuda de los citocromos, proteínas que contienen un grupo prostético hemo y desempeñan la función de transporte de electrones (McGlynn *et al.*, 2015). Los metanógenos que pueden aceptar directamente los electrones de otras especies se llaman electrotróficos (Lovley *et al.*, 2011). La transferencia directa de electrones tiene una ventaja sobre la transferencia mediada desde un punto de vista termodinámico porque la DIET no necesita pasos enzimáticos complejos para producir, difundir y consumir los mediadores redox.

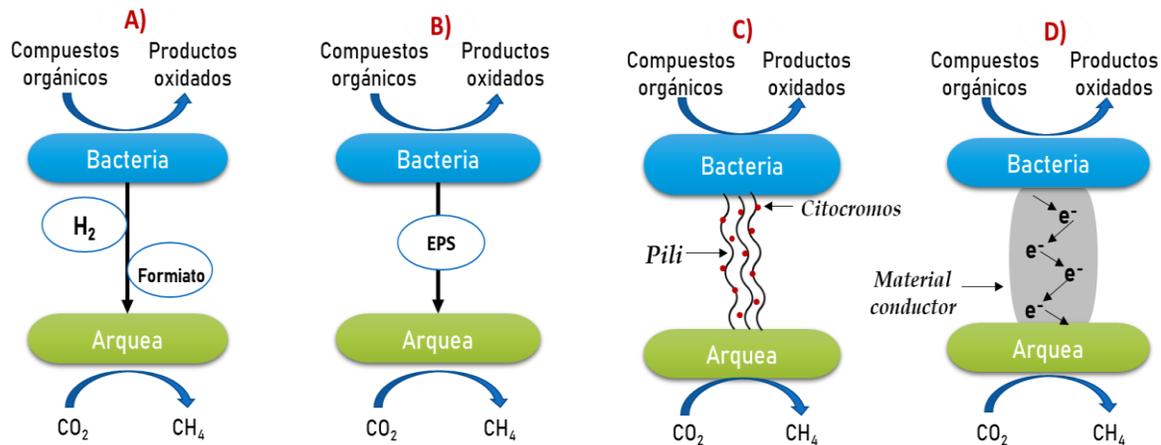


Figura 6. Sintrofía fermentador-metanógeno a través de: (A, B) transferencia de electrones interespecies mediada (MIET), (C) transferencia directa de electrones interespecies (DIET), y (D) DIET mediante materiales conductores.

Fuente: Modificado de Cheng y Call (2016).

Los estudios han demostrado que una amplia variedad de bacterias donadoras de electrones y metanógenos electrotróficos pueden construir una asociación sintrófica basada en la DIET, posiblemente impulsada por condiciones de operación del digestor, como el tipo de sustrato, la carga orgánica, la configuración del reactor, entre otros parámetros (Zhao *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017; Dang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Varias bacterias donadoras de electrones se han aislado de digestores metanogénicos (Barua y Dhar, 2017), entre ellas, las especies *Geobacter* y *Pseudomonas* por su capacidad para producir electricidad en sistemas electroquímicos microbianos a través de transferencia extracelular de electrones (Chang *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2016). Recientemente también ha sido estudiada y comprobada la actividad exoelectrogénica de diversas especies de los filos Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (Modestra *et al.*, 2020).

Se ha deducido que la agregación de especies es esencial para que se pueda dar una adecuada conexión eléctrica, lo que puede ser posible en alguna configuración específica de digestores anaerobios, como el reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés). La formación de gránulos es un factor clave para la metanización como resultado de una transferencia de electrones eficiente ya sea por contacto directo entre células, a través de nanocables, sustancias poliméricas extracelulares, minerales, o transportados por mediadores solubles como hidrógeno y formiato. La arquitectura en capas de los gránulos (Figura 7) proporciona nichos para asociaciones sintróficas y promueve la proximidad física entre esos microorganismos (Ishii *et al.*, 2005).

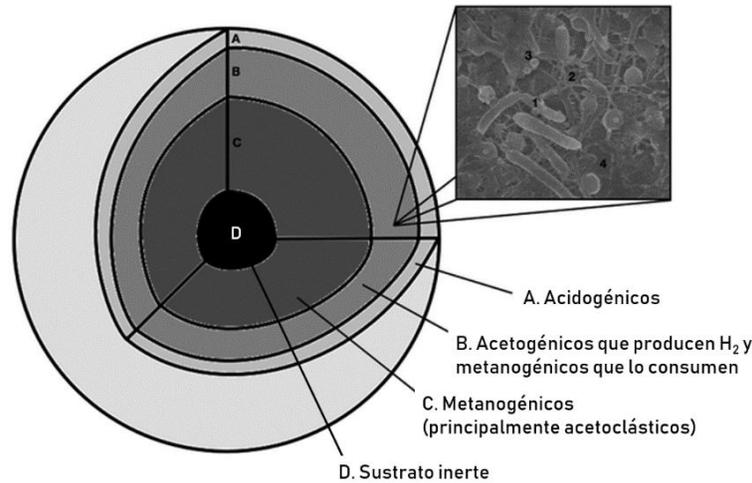


Figura 7. Estructura multicapa de un gránulo anaerobio.

Fuente: Adaptado de Dubé y Guiot, 2015.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la adición de materiales conductores, tales como carbón activado granular (CAG), biocarbón, tela de carbono, nanopartículas de hierro y nanotubos de carbono, en biorreactores metanogénicos puede promover la DIET dentro de una amplia gama de bacterias que no pueden producir pili o nanocables conductores (Figura 8A) (Chen *et al.*, 2014; Cheng y Call, 2016). En general, los materiales a base de carbono poseen una alta conductividad eléctrica, una gran área de superficie específica para mejorar las reacciones y una alta durabilidad contra la corrosión (Abbas *et al.*, 2021). Las parejas simbióticas pueden adherirse a la superficie de estos materiales conductores y usarlos como conductos eléctricos para el intercambio de electrones en múltiples configuraciones de reactores (Figura 8B).

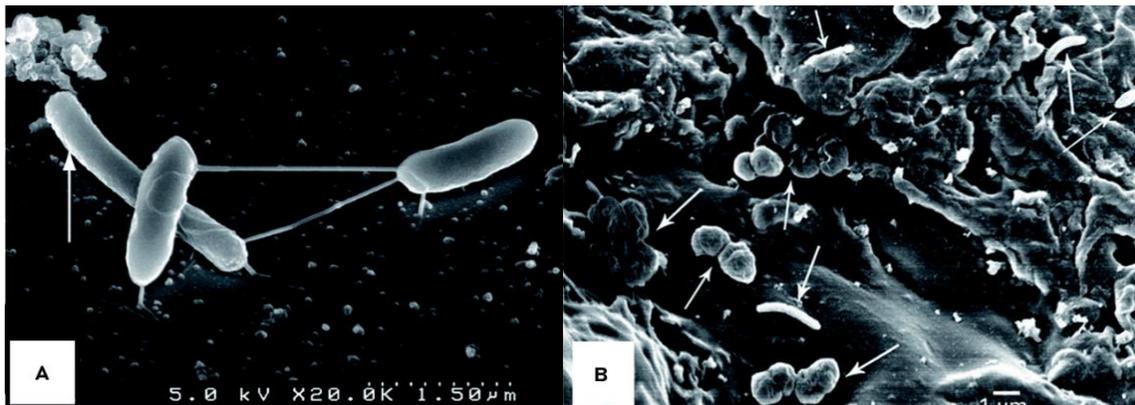


Figura 8. (A) Micrografía electrónica de barrido de un co-cultivo metanogénico de *P. thermopropionicum* y *M. thermoautotrophicus* (flechas) con conexiones pili (A) y co-cultivo simbiótico de *G. metallireducens* (varillas) y *M. barkeri* (esferas) que crecen en biocarbón (B).

Fuente: Gorby *et al.*, 2006; Chen *et al.* (2014).

5.4 Proteínas, genes y microorganismos asociados a la transferencia extracelular de electrones

La detección de genes funcionales o proteínas a través de enfoques ómicos puede identificar potencialmente si ocurren vías de transferencia directa de electrones. Una estrategia consiste en identificar genes, proteínas y transcriptomas asociados (Tabla 3). Sin embargo, es importante señalar que algunos genes y proteínas pueden estar involucrados con otras funciones celulares. En el listado destaca *Geobacter sulfurreducens*, por ser una especie que puede transferir electrones a óxidos de hierro III insolubles, así como a otros aceptores de electrones extracelulares incluyendo óxido de manganeso (MnO_2) y sustancias húmicas. También resultan de importancia las ferredoxinas (f420) y metanofenazinas, cofactores activos redox de arqueas metanogénicas, principalmente del género *Methanosarcina* que llevan a cabo transferencia de electrones (Barua y Dhar, 2017; Park *et al.*, 2018).

Tabla 3
Proteínas, genes y microorganismos de interés en el estudio de la transferencia extracelular de electrones en sistemas anaerobios

Código UniProt	Proteína	Gen	Microorganismo	Masa (Da)
Q39X52	Cytochrome c	omcZ	<i>Geobacter metallireducens</i> (strain GS-15 / ATCC 53774 / DSM 7210)	50,445
Q74BG5	Cytochrome c	omcZ	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)	49,379
B5E889	Cytochrome c	omcZ	<i>Geobacter bemidjensis</i> (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622)	51,262
A0A2Z5SKU9	C-type multiheme cytochrome omcZ	Gmet_0930	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	49,031
K7S6G0	Cytochrome c (Fragment)	GSU2076	<i>Kocuria</i> sp. BVB03	45,937
K7S182	Cytochrome c (Fragment)	omcZ	<i>Bacillus</i> sp. BVB01	47,633
Q74A86	C-type cytochrome OmcS (Outer membrane cytochrome S)	omcS	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)	45,389
B5EH34	Cytochrome c	omcS-1	<i>Geobacter bemidjensis</i> (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622)	45,602
B5EHE9	Cytochrome c	Gbem_1116	<i>Geobacter bemidjensis</i> (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622)	45,842
B5EHF0	Cytochrome c	omcS-2	<i>Geobacter bemidjensis</i> (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622)	49,150
A0A2Z5SXB0	C-type multiheme cytochrome omcS	Gbem_2679	<i>Geobacter bemidjensis</i> (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622)	45,304
Q8EG34	Extracellular iron oxide respiratory system surface decaheme cytochrome c component MtrC	Gbem_2680	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	71,237
Q8EG32	Extracellular respiratory system surface decaheme cytochrome c component MtrF	YM18_2417	<i>Shewanella oneidensis</i> (strain MR-1)	67,447
		mtrC SO_1778	<i>Shewanella oneidensis</i> (strain MR-1)	
		mtrF SO_1780	<i>Shewanella oneidensis</i> (strain MR-1)	

Q8EG33	Extracellular iron oxide respiratory system surface decaheme cytochrome c component OmcA	omcA SO_1779	<i>Shewanella oneidensis</i> (strain MR-1)	78,616
Q8EGE5	Surface localized decaheme cytochrome c lipoprotein	SO_1659	<i>Shewanella oneidensis</i> (strain MR-1)	79,083
A0A2W5FU43	Cytochrome C	DI594_10550	<i>Shewanella oneidensis</i>	79,591
A0A2W5DW03	Cytochrome C	DI594_07960	<i>Shewanella oneidensis</i>	67,572
A0A2W5E1F3	Cytochrome C	DI594_07970	<i>Shewanella oneidensis</i>	68,228
A0A2W5FYX6	Cytochrome C	DI594_07965	<i>Shewanella oneidensis</i>	77,670
Q74FJ0	Cytochrome C	omcE GSU0618	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)	23,816
A0A0M4DKA8	Putative multiheme cytochrome c	omcE DSOUD_2954	<i>Desulfuromonas soudanensis</i>	21,681
Q74A86	C-type cytochrome OmcS (Outer membrane cytochrome S)	omcS GSU2504	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)	45,389
Q74A87	Cytochrome c	omcT GSU2503	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)	45,534
A0A2Z5SFA8	C-type multiheme cytochrome omcT	YM18_2416	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	45,639
A0A2U3QGJ1	Cytochrome c (OmcT)	NBG4_270007	<i>Candidatus Sulfohalobium mesophilum</i>	48,694
Q8PZ67	Ferredoxina/F(420)	fpoF	<i>Methanosarcina mazei</i> (strain ATCC BAA-159 / DSM 3647 / Goe1 / Go1 / JCM 11833 / OCM 88)	38,359
P96797	Dihidrometanofenazina	hdrD	<i>Methanosarcina barkeri</i> (strain Fusaro / DSM 804)	45,055
A0A0E3NEE1	Dihidrometanofenazina	hdrD	<i>Methanosarcina thermophila</i> (cepa ATCC 43570 / DSM 1825 / OCM 12 / VKM B-1830 / TM-1)	45,454
Q8TM02	Ferredoxina/F(420)	hdrA2	<i>Methanosarcina acetivorans</i> (strain ATCC 35395 / DSM 2834 / JCM 12185 / C2A)	86,918

5.5 Estrategias para mejorar la producción de biogás

Aunque la primera aplicación de la digestión anaerobia data del año 1895 en Inglaterra y el primer digester anaerobio fue patentado en 1907, en Alemania (Melosi, 2008), hoy en día siguen desarrollándose un sinnúmero de estrategias para mejorar el rendimiento del proceso. De acuerdo con una búsqueda en la base de datos Scopus (Figura 9), del año 2008 al 2012 la co-digestión, el diseño de biorreactores y los pretratamientos destacaron en ese orden como estrategias para mejorar la producción de biogás.

Sin embargo, en los últimos años (2013-2021) destaca un importante crecimiento de las técnicas de bioaugmentación y bioestimulación donde el avance y accesibilidad de las ciencias ómicas ha tenido gran relevancia. La presente investigación se fundamenta en la bioestimulación y en la siguiente sección se detalla su aplicación y estado del arte.

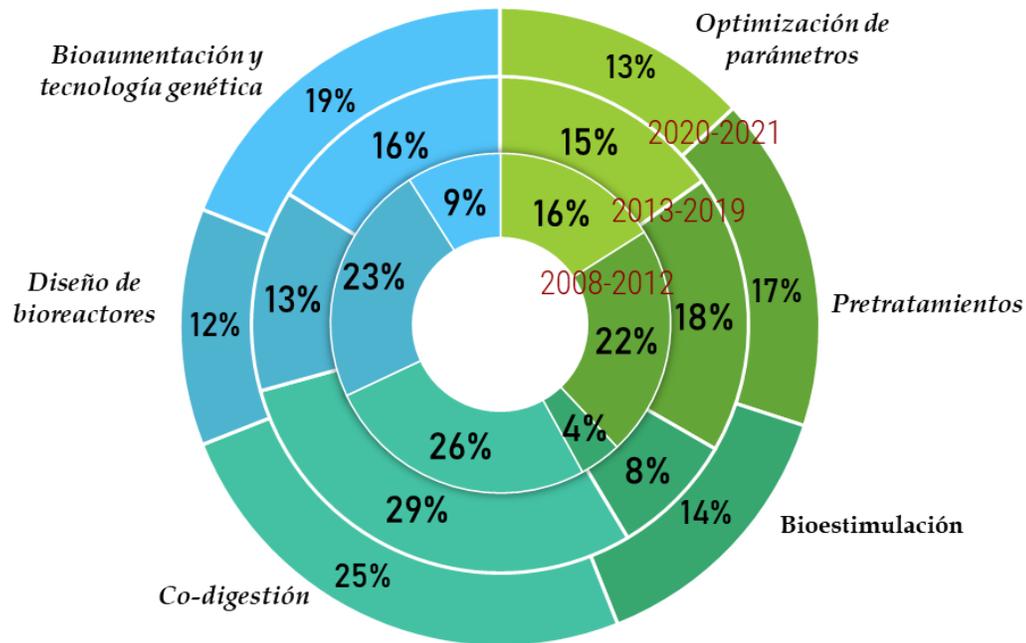


Figura 9. Publicaciones sobre estrategias para mejorar la producción de biogás de 2008-2021.
Fuente: Elaboración propia con datos de Scopus (2021).

5.5 Bioestimulación

La bioestimulación es una técnica de biorremediación que consiste en la adición de nutrientes u otros componentes suplementarios para mejorar la tasa de degradación de un consorcio microbiano autóctono (Tyagi *et al.*, 2011). La digestión anaerobia requiere nutrientes esenciales para lograr el crecimiento microbiano, mantener la diversidad y las tasas metabólicas adecuadas, y, en consecuencia, una deficiencia de estos puede limitar las funciones catalíticas de las enzimas que impulsan las reacciones de metanogénesis. Estos elementos pertenecen a dos categorías i) macronutrientes como nitrógeno y fósforo, y ii) micronutrientes que se requieren en cantidades traza, tales como cobalto (Co), hierro (Fe), níquel (Ni), molibdeno (Mo) y selenio (Se) y que forman parte de cofactores enzimáticos que participan en el proceso (Mehariya *et al.*, 2018).

Es difícil definir una concentración estándar de oligoelementos que pueda ser adecuada para cada digester anaerobio que trate diversos sustratos, puesto que la dinámica y biodisponibilidad de estos elementos en el sistema se ven afectados por factores físicos y químicos, siendo necesario analizar distintos parámetros en cada condición de funcionamiento, tomando en cuenta que, estos micronutrientes también podrían ser tóxicos bajo concentraciones específicas (Angelidaki *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2015).

Por otra parte, desde 2012, un gran número de estudios han informado que, en el proceso de digestión anaerobia, la bioestimulación con materiales conductores, principalmente materiales a base de carbono como carbón activado granular, biocarbón, telas, fieltros y nanotubos de carbono, además de óxidos de hierro como la magnetita y la hematita, puede promover la transferencia de electrones interespecies (IET) para una conversión más eficiente de los sustratos en metano.

Diversas investigaciones (Cheng y Call, 2016, Lovley, 2017; Jin *et al.*, 2019; Yun *et al.*, 2021) han demostrado que la IET no está basada únicamente en mediadores o portadores de electrones difusos como el hidrógeno o el formiato, sino que los microorganismos fermentativos secundarios poseen mecanismos para transferir electrones de forma directa a las arqueas metanogénicas a través de materiales conductores. Se estima que los materiales conductores de electricidad logran reducir los tiempos de arranque del proceso, incrementan la resistencia a las condiciones inhibitorias, la tasa de producción y el rendimiento neto del proceso. La Tabla 4 muestra una síntesis de los resultados obtenidos al respecto en los últimos años con carbón activado granular, biocarbón y magnetita, probados en la mayoría de las investigaciones con sustratos simples como el etanol, acetato, propionato, butirato, glucosa, entre otros.

Tabla 4
Bioestimulación con materiales conductores

Material	Dosis	Sustrato	Operación	Efecto en la producción de biogás	Fuente
Carbón activado granular	5 g/L	Etanol	Lote	+2.5 veces tasa de producción de CH ₄	Liu <i>et al.</i> , 2012
	1 g/L	Acetato	Continuo	+34% rendimiento de CH ₄	Lee <i>et al.</i> , 2016
		Agua residual	Continuo	+1.8 veces rendimiento de CH ₄	Lee <i>et al.</i> , 2017
	5 g/L	sintética			
	10 g/L	Glucosa	Lote	Menor acumulación de AGV's +2.4 tasa de producción de CH ₄	Yan <i>et al.</i> , 2017
	0.5-5 g/L	Lodos de PTAR	Lote	+17.4% rendimiento de CH ₄ -6.1% producción de lodo	Yang <i>et al.</i> , 2017
	6 g/L	Acetato y etanol	Lote	+31% rendimiento de CH ₄ +72% tasa de producción de CH ₄	Park <i>et al.</i> , 2018
	6 g/L	Agua residual	Lote	-29.8% fase lag +23% tasa de producción de CH ₄	Park <i>et al.</i> , 2020
	0-33 g/L	Agua residual rica en lípidos	Lote	Consumo más rápido de AGV y AGCL. -20-50% rendimiento de CH ₄ con más de 8 g/L de CAG.	Tan <i>et al.</i> , 2021
	5 g/L	Agua residual sintética	Continuo	+21-28% eliminación de DQO +32-78% rendimiento de CH ₄ Mayor reducción de sulfato y resistencia a la toxicidad.	Zhang <i>et al.</i> , 2022
10 g/L	Estiércol de pollo	Lote	Consumo más rápido de AGV +13.3% tasa de producción CH ₄	Ziganshina <i>et al.</i> , 2022	

Biocarbón	10 mg/L	Glucosa Etanol	Lote	-38% fase lag +70.6% tasa de producción CH ₄ Mayor capacidad para elevar la carga orgánica	Luo <i>et al.</i> , 2015
	2.5 g/L	Agua residual sintética	Continuo	+10% remoción de DQO (93%) +1.3 veces rendimiento de CH ₄	Zhao <i>et al.</i> , 2015
	5 g/L	Propionato Butirato	Continuo	+16% tasa de producción CH ₄ +25% rendimiento de CH ₄	Zhao <i>et al.</i> , 2016
	10 g/L	Propionato	Lote	+44% rendimiento de CH ₄	Jing <i>et al.</i> , 2017
	10 g/L	Estiércol bovino		+32.2% rendimiento de CH ₄	Jang <i>et al.</i> , 2018
	1 g/L	Etanol	Lote	10.7-12.3 veces rendimiento de CH ₄	Yuan <i>et al.</i> , 2018
	1.7 g/L	Estiércol porcino	Lote	+25% rendimiento de CH ₄ -35% fase lag +16% tasa de producción de CH ₄	Yang <i>et al.</i> , 2021
	5 g/L	Rastrojo maíz + lodos PTAR	Lote	-69% fase lag	Li <i>et al.</i> , 2022
	4 g/L	Lodos aceitosos	Lote	+2.4 veces rendimiento de CH ₄ Mayor tasa de hidrólisis y acidogénesis	Shi <i>et al.</i> , 2022
	15 g/L	Lodos PTAR		+43.4% rendimiento de CH ₄ +51.3 tasa de producción de CH ₄	Wang <i>et al.</i> , 2022
Magnetita	0.35 g/L	Propionato	Lote	+33% tasa de producción de CH ₄	Viggi <i>et al.</i> , 2014
	10 mg/L	Glucosa Etanol	Lote	-38% fase lag +70.6% tasa de producción de CH ₄ Mayor capacidad para elevar la carga orgánica	Luo <i>et al.</i> , 2015
	2.5 g/L	Agua residual sintética	Continuo	+10% remoción de DQO (93%) +1.3 veces rendimiento de CH ₄	Zhao <i>et al.</i> , 2015
	5 g/L	Propionato Butirato	Continuo	+16% tasa de producción de CH ₄ +25% rendimiento de CH ₄	Zhao <i>et al.</i> , 2016
	10 mg/L	Propionato	Lote	+44% rendimiento de CH ₄	Jing <i>et al.</i> , 2017
	50 mg/g _{ST}	Lodos de PTAR	Lote	Menor acumulación de AGV's +26.6 tasa de producción de CH ₄	Wang <i>et al.</i> , 2018
	1 g/L	Etanol	Lote	10.7-12.3 veces rendimiento de CH ₄	Yuan <i>et al.</i> , 2018
	10 g/L	Etanol	Lote	Menor acumulación de AGV's Reducción de ORP. Mayor remoción de DQO.	Wang <i>et al.</i> , 2019
	100 g/L	Aguas residuales de alta salinidad	Continuo	+17% remoción de DQO +35% tasa de producción de CH ₄	Chen <i>et al.</i> , 2020
	20 mg/L	Estiércol de pollo	Lote	+73.9 rendimiento de CH ₄ +55.5 tasa de producción de CH ₄	Aguilar-Moreno <i>et al.</i> , 2020
10 g/L	Agua residual sintética	Continuo	+7-483% rendimiento de CH ₄ Mayor conversión de AGV	Ma <i>et al.</i> , 2021	
5 g/L	Rastrojo maíz + lodo PTAR	Lote	+60.4% rendimiento de CH ₄ Mejor degradación de propionato	Li <i>et al.</i> , 2022	

5.5.1 Carbón activado granular

El carbón activado es un material que posee una estructura cristalina reticular similar a la del grafito; es extremadamente poroso y dependiendo de la temperatura de pirólisis y su proceso de activación, ya sea térmico o químico, puede llegar a desarrollar áreas superficiales del orden de 500 hasta 1500 m²/g. La composición química del carbón activo es aproximadamente un 73-99% en carbono, 1-20% en hidrógeno, 1-22% oxígeno y 1-20% cenizas, estas últimas están constituidas por elementos no volátiles, como Na, K, Ca, S, Fe, Si, Al y P, su cantidad suele disminuir cuando el proceso de activación química es ácido (Xu *et al.*, 2015).

La superficie de los carbones puede encontrarse combinada en mayor o menor proporción con otros átomos distintos al carbono (heteroátomos), dando lugar a diferentes grupos superficiales (Figura 10). La mayoría de estos grupos son grupos oxigenados, debido a la tendencia de los carbones a oxidarse incluso a temperatura ambiente. De acuerdo con Zhang *et al.* (2018), existe evidencia de que la presencia y/o introducción de grupos funcionales con propiedades redox en la superficie de los carbones activados, como los grupos quinónicos, han mejorado la biotransformación anaerobia de colorantes azo o compuestos nitroaromáticos (Van Der Zee *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008).

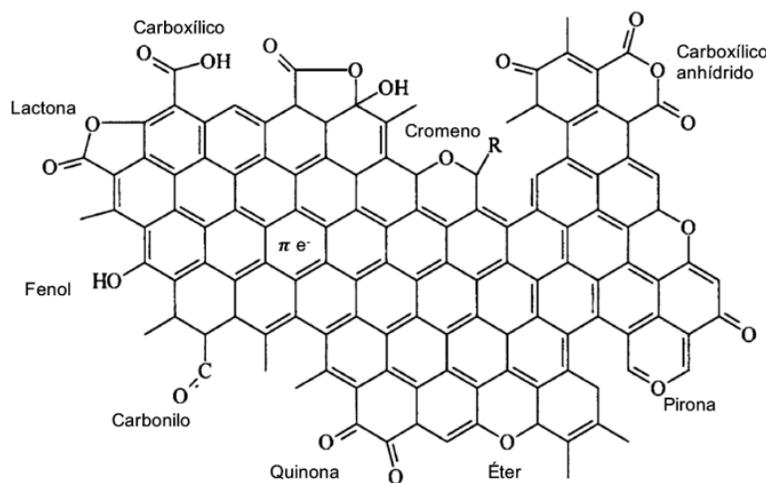


Figura 10. Representación esquemática de los principales grupos superficiales que pueden encontrarse en un carbón activado.

Fuente: Adaptado de Bandosz y Ania (2006).

El carbón activado se utiliza comúnmente como medio de soporte para la retención de biomasa en diversas configuraciones de biorreactores, además, ha servido como un mediador redox eficiente para varias aplicaciones ambientales (Tao *et al.*, 2017). Debido a la gran área superficial y conductividad eléctrica que posee, se ha utilizado como electrodo



en varios sistemas electroquímicos microbianos debido a que hay una amplia variedad de microorganismos que pueden aceptar electrones de CAG (Liu *et al.*, 2012). Inicialmente este material se comenzó a utilizar en la digestión anaerobia para adsorber compuestos fenólicos y metales pesados que podrían inhibir la producción de metano (Barua y Dhar, 2017); mientras que estudios recientes han investigado su capacidad para estimular la DIET en digestores metanogénicos (Romero *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021).

Liu *et al.* (2012) plantearon la primera hipótesis de que el CAG podría facilitar la DIET entre bacterias fermentadoras secundarias y arqueas metanogénicas, describieron que su adición redujo sustancialmente la fase de latencia y aumentó la producción de metano a partir de etanol en co-cultivos de *G. metallireducens* y *M. barkeri*. El análisis microscópico del co-cultivo modificado con CAG en su estudio mostró que ambas especies estaban fuertemente adheridas a la superficie del carbón activado sin realizar agregados para establecer conexiones eléctricas a través de los conductores pili. Esta observación sugiere que el desarrollo de comunidades microbianas activas en DIET en la superficie sólida conductora de CAG puede compensar el papel de los pili y los citocromos tipo c de la membrana externa. Por su parte, Zhao *et al.* (2015) afirman que la biosíntesis de los citocromos tipo c y los pili requiere una inversión significativa de energía por parte de los microorganismos, por lo que la presencia de materiales conductores puede permitir que las células conserven más energía.

Para promover la DIET, se ha aplicado CAG en digestores anaerobios continuos y discontinuos alimentados con diversos sustratos orgánicos, como etanol, acetato, butirato, propionato, lodos activados de desecho y alimentos comerciales para perros (Zhao *et al.*, 2017; Barua y Dhar, 2017). De acuerdo con Lee *et al.* (2016), la incorporación de CAG en un digestor anaerobio en continuo aumentó significativamente la tasa de producción de metano 1.8 veces. Además, la producción específica de metano ($\text{mL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV}}$) a partir de biomasa unida a CAG fue 3.7 veces mayor que la de la biomasa suspendida en su estudio.

Park *et al.* (2018b) evaluaron también el efecto del CAG, donde en comparación con las muestras de control, este material aumentó la producción de metano y su tasa de producción en un 31% y 72%, respectivamente. El análisis de secuenciación de 16S rRNA reveló un cambio en la composición de la comunidad arqueal; la proporción de *Methanosarcina* disminuyó 17%, mientras que la proporción de *Methanosaeta* aumentó un 5.6%. Además, los análisis sugirieron una ruta metabólica de reducción vía dióxido de carbono en lugar de una descarboxilación con acetato para la formación de CH_4 .

5.5.2 Biocarbón

El biocarbón se produce a través de la pirólisis de biomasa residual, principalmente de actividades agroforestales y residuos orgánicos urbanos (Ahmad *et al.*, 2014). Posee una gran cantidad de usos, por ejemplo, en la agricultura como mejorador de suelos por su capacidad de retención de agua, la aireación del suelo y la liberación prolongada de nutrientes a través del incremento del pH, en la industria de la construcción como aislante, en los sistemas de tratamiento de efluentes líquidos y gaseosos utilizado en procesos de adsorción y filtración y en el campo de la electrónica por sus propiedades semiconductoras (Luz *et al.*, 2018).

El biocarbón consiste en carbono fijo, carbono lábil y otros compuestos volátiles, además de componentes de humedad y cenizas. La superficie del biocarbón es heterogénea debido a las fracciones carbonizadas y no carbonizadas coexistentes en las que se producen diferentes mecanismos de sorción (Figura 11). El proceso de adsorción se ve facilitado por enlaces de hidrógeno, atracción electrostática, intercambio iónico y efecto hidrofóbico. Las superficies de biocarbón generalmente están cargadas negativamente, debido a la disociación de los grupos funcionales que contienen oxígeno y cuando la temperatura pirolítica excede los 450 °C, el biocarbón se vuelve menos polar y más aromático debido a la pérdida de los grupos funcionales que contienen oxígeno e hidrógeno, haciéndolo a su vez más hidrofóbico (Qambrani *et al.*, 2017).

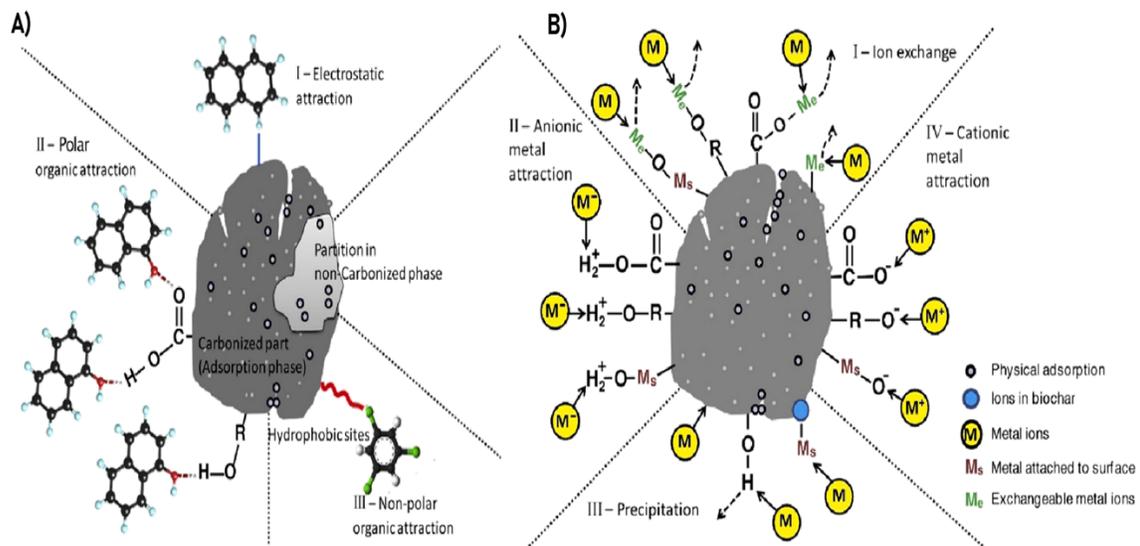


Figura 11. Química superficial y mecanismos de adsorción de compuestos orgánicos (A) e inorgánicos (B) sobre biocarbón.

Fuente: Masebinu *et al.* (2019).

Recientemente el biocarbón se ha usado como aditivo para la digestión anaerobia con el objetivo de reducir la inhibición de la metanogénesis por el amoníaco o el exceso de ácidos (Fagbohunge *et al.*, 2017; Bona *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). También se demostró que el biocarbón también puede promover la DIET entre los metanógenos y sus parejas sintróficas con un mecanismo análogo al carbón activado, a pesar de su menor conductividad con respecto del carbón activado (Chen *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015).

Wang *et al.* (2018) añadieron biocarbón a un digestor anaerobio mesófilo con residuos complejos (lodos de PTAR y una mezcla sintética de residuos de comida). En este caso la adición de biocarbón acortó la fase lag del proceso 27.5-64.4% y aumentó la tasa máxima de producción de metano en un 22.4-40.3%. Además, el material mostró una notable capacidad para compensar la disminución del pH causada por la acumulación de AGV's. Se identificó que la degradación sintrófica de butirato como sustrato modelo a acetato se produjo en niveles altos de PpH_2 y mediante el análisis de la comunidad microbiana, se reveló que el biocarbón provocó el enriquecimiento de *Anaerolineaceae* y *Methanosaeta*, microorganismos típicos de la DIET.

Recientemente Shi *et al.* (2022) investigaron el efecto de la dosis de biocarbón en la digestión mesófila de lodos aceitosos que contenían naftaleno (un compuesto altamente recalcitrante) y almidón (sustrato fácilmente biodisponible). El exceso de BC mostró efectos negativos con un menor rendimiento de metano y una fase de latencia más prolongada. Sin embargo, una dosis de 4 g/L incrementó 2.19 veces el rendimiento de metano y favoreció la hidrólisis y la acidogénesis. Por otro lado, plantean que el BC media la transferencia de electrones entre *Clostridium* (bacteria electroactiva) y arqueas acetoclásticas como *Methanosaeta*.

5.5.3 Magnetita

La magnetita es un óxido mixto de hierro ya que se encuentra formada por dos compuestos, el primero es el FeO (óxido de hierro (II) u óxido ferroso) y Fe₂O₃ (óxido de hierro (III) u óxido férrico). Su composición elemental corresponde a 72.4% hierro y 27.6% oxígeno. Cristaliza en un sistema cúbico centrado en las caras, con estructura de espinela inversa, como se ilustra en la Figura 12. En su celda unitaria de 56 átomos, 32 son de oxígeno y 24 son cationes de hierro, de los cuales 16 están en forma férrica (Fe³⁺) y 8 en forma ferrosa (Fe²⁺), las posiciones tetraédricas corresponden específicamente a cationes Fe³⁺ y en las posiciones octaédricas se alojan cationes Fe³⁺ y Fe²⁺ por igual (Yang *et al.*, 2011).

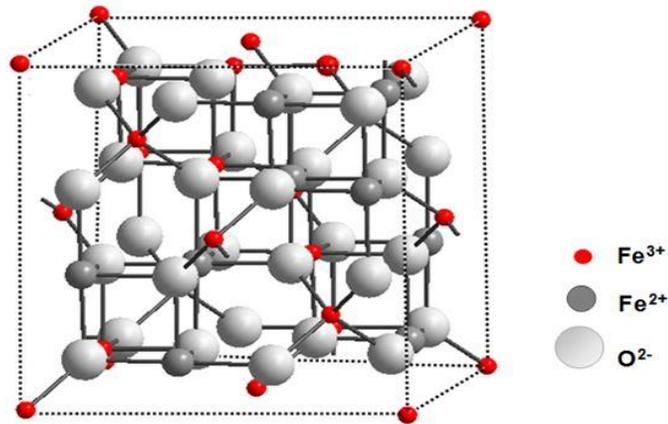


Figura 12. Estructura química de la magnetita Fe_3O_4 .

Fuente: Yang *et al.* (2011).

En los últimos años, la síntesis de nanopartículas de hierro, como la magnetita (Fe_3O_4) y la hematita (Fe_2O_3), ha tenido una atención significativa debido a sus diversas aplicaciones en catálisis heterogénea, bioseparación y biosensores (Wu *et al.*, 2015), aunque la magnetita y la hematita tienen diferentes composiciones químicas y conductividades eléctricas (la magnetita tiene 10^6 veces más conductividad que la hematita (Guskos *et al.*, 2002). Estos minerales también son abundantes en la naturaleza, y su presencia en suelos y sedimentos subsuperficiales puede facilitar el transporte de electrones extracelulares por microorganismos reductores de hierro, como las especies de *Geobacter* (Liu *et al.*, 2015; Cheng y Call, 2016).

Kato *et al.* (2012) descubrieron por primera vez que la adición de hematita y magnetita en los digestores anaerobios puede reducir significativamente la fase de latencia y mejorar la tasa de producción de metano debido a la simbiosis basada en la DIET. Sin embargo, los estudios sugirieron que el mecanismo de estimulación de la DIET mediante nanopartículas de hierro sería diferente de otros materiales conductores (Baek *et al.*, 2017) ya que se adhieren a los conductores pili y principalmente compensan el requerimiento de citocromos de tipo c (Liu *et al.*, 2015).

5.6 Inmovilización de materiales bioestimulantes

La adición de distintos agentes bioestimulantes, principalmente carbonosos y férricos a bajas dosis posee importantes ventajas cuando son incorporados al proceso de digestión anaerobia. Sin embargo, su solubilidad y su reducido tamaño de partícula, especialmente en el caso del biocarbón y magnetita, implica su adición continua a biorreactores anaerobios para mantener la capacidad mediadora redox activa y con ello, la transferencia directa de electrones interespecies (DIET) dentro de la reacción anaerobia. Lo anterior hace que un proceso a mayor escala y operado en régimen

continuo emplee estos aditivos como consumibles y sean descargados a través del digestato con cada salida del efluente, lo que disminuye la viabilidad técnica, económica y ambiental del proceso.

En el aspecto ambiental, el problema radicaría en la magnetita, ya que, al ser un material recalcitrante y muy resistente a la degradación microbiana o química, podría resultar en la contaminación secundaria debido a su descarga continua en el ambiente. La situación del biocarbón sería distinta, ya que incluso éste podría mejorar la calidad del digestato como mejorador de suelo. Existe evidencia de que el biocarbón incrementa la fertilidad del suelo, favorece la actividad microbiana, reduce la densidad aparente y mejora la capacidad de retención de agua y nutrientes (Ayaz *et al.*, 2021). Además, se ha sugerido como ideal para recuperar suelos degradados y/o contaminados y su aplicación en el campo agrícola ha demostrado ser segura (Zhang *et al.*, 2021).

Por tanto, se requieren estrategias alternativas para inmovilizar materiales férricos y/o carbonosos sobre diferentes soportes, de modo que puedan permanecer en el biorreactor durante varios ciclos. Algunos materiales de soporte reportados en la literatura para fijar materiales con propiedades morfológicas similares al biocarbón y la magnetita han sido ceramsita, espuma de poliuretano, fibras de poliéster, alginato de calcio, resinas de intercambio iónico, fieltro de carbono, alcohol polivinílico, agar, entre otros (Martínez *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2016).

Sin embargo, es importante analizar el rendimiento de estos materiales inmovilizados en la digestión anaerobia de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), ya que en otras aplicaciones ambientales se ha informado que algunas de estas estrategias tienen desventajas, como limitaciones de transferencia de masa, interrupción de la inmovilización debido a propiedades mecánicas débiles, capacidad de inmovilización deficiente, desorción del material inmovilizado e incluso inhibición de la actividad microbiana (Olivo-Alanis *et al.*, 2018).

La Tabla 5 proporciona una recopilación de estudios que informan sobre el impacto de distintos materiales granulares o en polvo, inmovilizados para acelerar la conversión redox o la adsorción de una gran variedad de contaminantes y que, a su vez, ya sea por la similitud física y/o química con los materiales conductores probados en la presente investigación, podrían extrapolarse al proceso de digestión anaerobia.

Tabla 5
Inmovilización de materiales en polvo sobre distintas matrices para la biotransformación de contaminantes

Material	Matriz inmovilizadora	Mecanismo de inmovilización	Aplicación	Fuente
Leonardita	Resina de intercambio aniónico	Atracción electrostática	Fenoles y colorante rojo reactivo 2	Martínez <i>et al.</i> , 2013.
TiO ₂	Fibra de poliamida	Dispersión	Azul de metileno	Saiful <i>et al.</i> , 2019
Carbón activado			Azul de metileno	Kwak <i>et al.</i> , 2018
Antraquinona			Colorante rojo reactivo 3	Su <i>et al.</i> , 2009
Biocarbón de <i>Eichhornia crassipes</i>	Alginato de calcio	Reticulación	Cadmio (II)	Liu <i>et al.</i> , 2020
Biocarbón estiércol de pollo			Plomo (II)	Do & Lee, 2013
CuFe ₂ O ₄ + óxido de grafeno	Espuma de Fe-Ni	Hidrotermal	Arsénico (III) y (V)	Wu <i>et al.</i> , 2018
Nitrógeno + Nanopartículas de Cu	Fibra de carbono	Pirólisis en atmósfera de argón	<i>p</i> -nitrofenol, azul de metileno y rodamina B	Shahzeydi <i>et al.</i> , 2019
Ácidos húmicos	Gel de sílice	Covalencia	Benzopireno	Luo <i>et al.</i> , 2007
	Fibra de carbono	Electropolimerización	Compuestos nitroaromáticos	Li <i>et al.</i> , 2008
AQDS	Espuma de poliuretano	Covalencia	Colorantes azoicos	Lu <i>et al.</i> , 2010
	Ceramsitas	Adsorción/Covalencia	Colorantes azoicos	Yuan <i>et al.</i> , 2012
	Fibra de carbono + quitosano	Impregnación	Arsénico (V)	Zhang <i>et al.</i> , 2010
	Fibra de carbono	Ultrasonido	-	Kornilitsina <i>et al.</i> , 2021
Fe ₃ O ₄	Fibra de carbono + quitosano + polietilenglicol	Impregnación	Arsénico (V)	Zhang <i>et al.</i> , 2010b
	Fibra de poliéster	Impregnación, ultrasonido y termofijación	*Propiedades magnéticas, antibacterianas y catalíticas de Fenton.	Mirjalili, 2019
	Fibra de poliamida	Hidrotermal	*Propiedades morfológicas, térmicas, de tracción y abrasión.	Zhang & Zhu, 2012



Las sustancias húmicas son bien conocidas por su capacidad redox y por incrementar significativamente las tasas de biodegradación anaerobia (Kulikova y Perminova, 2021). Su *et al.* (2009) co-inmovilizaron antraquinonas y quinonas por atrapamiento en alginato de calcio. Las perlas co-inmovilizadas exhibieron una buena actividad catalítica y aumentaron la tasa de decoloración para muchos tipos de colorantes azoicos. La reutilización de las perlas inmovilizadas se evaluó con experimentos de decoloración de lotes repetidos. Después de diez experimentos, la tasa de decoloración de las perlas mantuvo más del 92.8% de su valor original.

Por su parte, Lu *et al.* (2010) investigaron el efecto de antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) inmovilizada covalentemente en espuma de poliuretano (AQS-PUF) para la decoloración de colorantes azo en presencia de *Escherichia coli*. Durante el proceso, muchas de las células de *E. coli* se adhirieron a las paredes de AQS-PUF. Después de 10 experimentos repetidos usando AQS-PUF, la eficiencia de biodecoloración se mantuvo en 98.7%. Estos resultados indicaron que AQS-PUF como soporte biológico exhibió una alta actividad catalítica y una buena estabilidad.

En este sentido, algunos materiales ricos en ácidos húmicos y/o fúlvicos, con características físicas y químicas muy similares al biocarbón, han sido utilizados como sustratos modelo. Por ejemplo, Martínez *et al.* (2013) inmovilizaron leonardita, la cual es materia orgánica asociada al lignito que aún no termina su proceso de conversión a carbón y posee una gran cantidad de ácidos húmicos. La leonardita fue soportada en una resina de intercambio iónico e incorporada a un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) de alta velocidad para la remoción de fenol y el colorante Rojo Reactivo 2 (RR2). En este estudio se incrementó la decoloración de fenol y RR2 en un 90 y 75% respectivamente, logrando además una mayor estabilidad del reactor respecto al control sin moléculas redox inmovilizadas.

En cuanto al biocarbón se refiere, existen pocos estudios, uno de ellos es de Liu *et al.* (2020), donde se analizó la dinámica de sorción de Cd^{2+} de un biocarbón de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) generado a diferentes temperaturas y modificado con sulfato férrico/ferroso encapsulado en alginato. Los resultados de este estudio destacan el potencial de las cápsulas de biocarbón-alginato para ser reutilizadas durante varios ciclos en la eliminación de Cd^{2+} de las aguas residuales. Previamente Do y Lee (2013) ya habían evaluado la reutilización de las cápsulas de biocarbón de estiércol de pollo y alginato a través de ciclos consecutivos de adsorción-desorción, demostrando que las perlas se pueden usar hasta 10 veces manteniendo casi el 70% de la capacidad de adsorción inicial de Pb^{2+} (263.2 mg/g).

La magnetita (Fe_3O_4) posee un gran número de aplicaciones catalíticas, y en los últimos años ha incrementado el interés por incrustarla en diversos materiales para aprovechar



durante periodos más largos sus propiedades. En 2012, Zhang y Zhu inmovilizaron una fina película de Fe_3O_4 nanométrica sobre fibra de poliamida por el método hidrotermal usando N,N-dimetilformamida como agente de hinchamiento y dodecilsulfato de sodio como agente dispersante. En este caso se analizaron propiedades morfológicas, químicas, de magnetización, estabilidad térmica, así como propiedades de tracción y la resistencia a la abrasión. Las propiedades de tracción se mejoraron hasta cierto punto debido principalmente al encogimiento de la tela. La resistencia a la abrasión del tejido revestido con Fe_3O_4 se comportó bien.

Por otra parte, Mirjalili (2019) fijó partículas de magnetita sobre tejidos de poliéster mediante tres mecanismos distintos; impregnación, ultrasonido y alta temperatura. En este caso el objetivo del estudio tampoco fue emplear el material para remover algún contaminante, sino que se evaluaron las propiedades magnéticas y catalíticas de Fenton de los tejidos tratados; los mejores resultados se obtuvieron en los experimentos en los que se utilizó el ultrasonido como mecanismo de fijación.

Los materiales carbonosos, como las telas y fieltros, se utilizan ampliamente en aplicaciones electroquímicas, especialmente en celdas de electrólisis microbiana y reducción de contaminantes en fase acuosa (Le *et al.*, 2017). Tienen una gran superficie específica y porosidad capaces de proporcionar abundantes sitios de reacción redox, excelente eficiencia electrolítica y estabilidad mecánica a un costo relativamente bajo (Dong *et al.*, 2021). Además, dentro del área de investigación de la DIET, Wang y Lee (2021) resumen en su artículo de revisión cómo este tipo de materiales se han probado en digestión anaerobia con incrementos importantes en la tasa de producción de metano, mejor estabilidad con mayores tasas de carga orgánica y menores fases de latencia. Cabe destacar, que las telas y fibras de carbono se han empleado en digestión anaerobia de forma individual, por lo que sería interesante, doparlas con un material férrico que produzca un efecto sinérgico, pues estos mejoran la degradación anaerobia mediante mecanismos distintos.

Finalmente, un estudio de Shahzeydi *et al.* (2019) analizó la reducción de 4-nitrofenol, azul de metileno y rodamina B utilizando una serie de fieltros de carbono de superficie modificada con nanopartículas de nitrógeno y cobre. La eficiencia catalítica de los compuestos sintetizados se atribuyó a la alta distribución de nanopartículas de cobre en la matriz, además de destacar su reciclabilidad. Recientemente, Kornolitsina *et al.* (2021) también usaron el método ultrasónico de inmovilización, pero en este caso modificaron una fibra de carbono con partículas de magnetita. El análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) mostró que la mayor parte de la superficie de la fibra estaba recubierta de manera uniforme por partículas de Fe_3O_4 . También se observó cierta aglomeración en cada etapa, lo que posiblemente esté relacionado con la alta energía superficial de estas partículas.

6. METODOLOGÍA

Para la realización de este proyecto se ha propuesto una estrategia experimental dividida en tres etapas (Figura 13) y a continuación se describen las actividades que se realizarán en cada una de ellas.

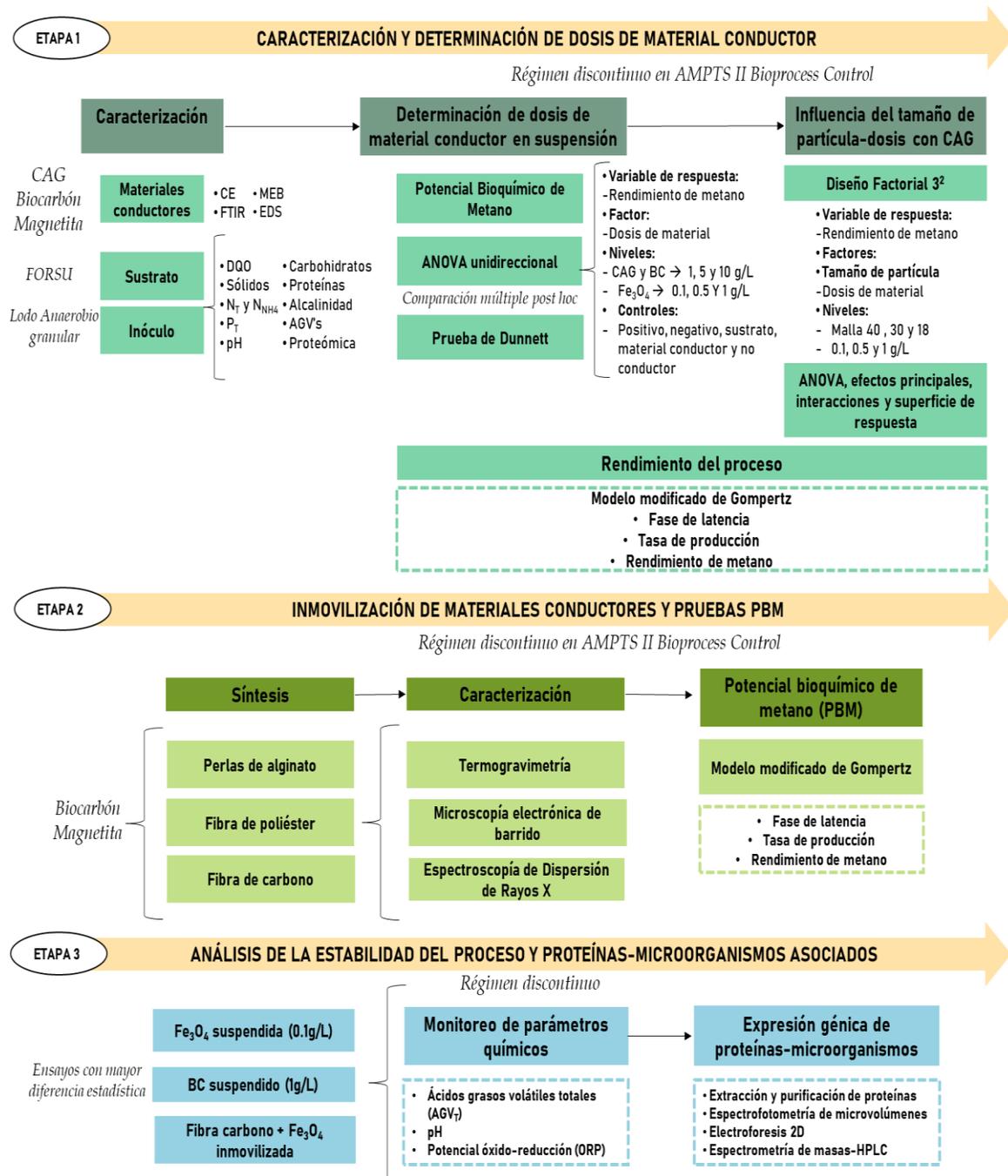


Figura 13. Diagrama general del plan experimental.

6.1 Etapa 1. Caracterización y determinación de dosis de material conductor

La primera etapa consistió en realizar una caracterización fisicoquímica y morfológica de los materiales conductores (carbón activado granular, biocarbón y magnetita), además de un análisis fisicoquímico y bromatológico del sustrato y el inóculo. Posteriormente, mediante un análisis estadístico se determinó, en régimen discontinuo, la dosis de material conductor que propicia una mejor respuesta sobre la variable de rendimiento de metano, comparando con varios controles que fueron sometidos también a pruebas de potencial bioquímico de metano (control endógeno, control positivo de 1 g_{DQO}/L de glucosa, control de FORSU, control de materiales conductores sin sustrato y materiales no conductores con sustrato: sílice y esferas de vidrio de 1.5 mm de diámetro), lo anterior con la finalidad de poder descartar o diferenciar un posible incremento en la producción de biogás. Finalmente, en esta etapa se evaluó la influencia del tamaño de partícula en conjunto con la dosis de carbón activado granular mediante un análisis factorial 3².

6.1.1 Caracterización de materiales conductores

Los materiales a evaluar fueron de tipo comercial; el carbón activado granular (Micro 4®) marca Carbotecnia, de origen vegetal cuyo precursor es el endocarpio de coco se obtuvo a través de un proceso de activación térmica en una atmósfera reductora saturada con vapor de agua. Este CAG cumple con las especificaciones y recomendaciones de la American Water Works Association (AWWA) y cabe destacar que no contiene metales u otros contaminantes típicamente presentes en carbones minerales, con lo cual se reduce la probabilidad de inhibición por toxicidad.

Por su parte, el biocarbón (Bio-C) de Carbotecnia es un producto elaborado mediante la pirólisis controlada del endocarpio de coco, la temperatura máxima fue de 500 °C, a una velocidad de calentamiento lento, y en un tiempo suficientemente largo para obtener un alto grado de carbonización (no especificado por el proveedor). El carbón resultante tiene una buena microporosidad, con un bajo contenido de compuestos volátiles y una alta proporción de carbono fijo. Por su origen, este carbón contiene minerales que estabilizan el pH, no dañan el equilibrio osmótico ni provoca toxicidad.

Finalmente, la magnetita es un mineral de hierro de la marca QR Minerales, constituido por óxido ferroso-diférrico (Fe₃O₄). Es un polvo fino de color negro, soluble en ácidos e insoluble en agua que contiene 64% de hierro, 6% de óxido de silicio, 0.5% de carbono y 0.045% de azufre.

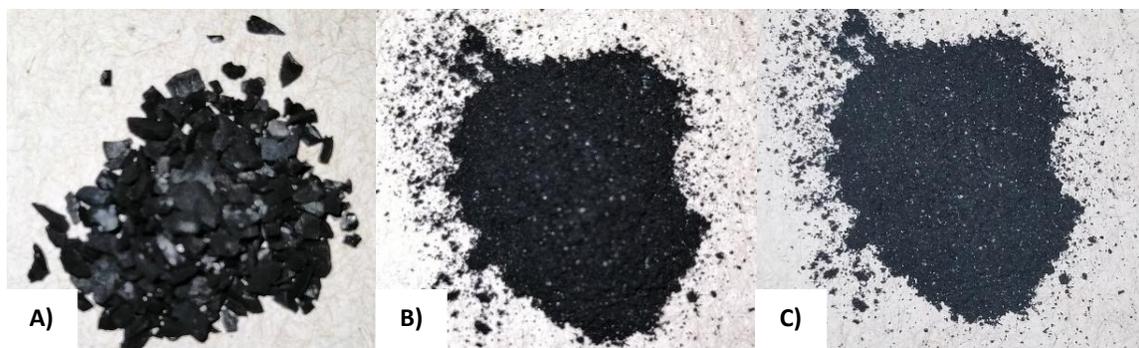


Figura 14. Materiales conductores a utilizar.
A) Carbón activado granular, B) Biocarbón y C) Magnetita (Fe_3O_4)

6.1.1.1 Parámetros fisicoquímicos

El pH, conductividad eléctrica (CE), sólidos disueltos totales (SDT) y potencial redox (ORP) se determinaron mediante un equipo multiparamétrico Hanna HI9829, empleando las sondas HI7609829-1 y HI7609829-3 (Figura 15). Para medir estas propiedades en los materiales conductores en solución, se prepararon soluciones de 1 g en 100 mL y se procedió a tomar las lecturas por triplicado con agitación constante y a temperatura ambiente.



Figura 15. Medidor multiparamétrico de pH, potencial redox, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto

6.1.1.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) - Espectrometría de Dispersión de Rayos X (EDS)

Esta técnica se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión termoiónica marca JEOL JSM 5900-LV (Figura 16), el cual utilizó un haz de electrones cuyas interacciones (electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X) generaron una imagen de alta resolución que permitió analizar el tamaño, topografía

y morfología superficial de los materiales, así como su composición elemental por medio de la energía dispersiva de rayos X característicos (EDS). Para su análisis, las muestras en polvo se colocaron en el portamuestras de aluminio sobre cinta de carbono.



Figura 16. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5900-LV.

6.1.1.3 Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR se utilizó para determinar los grupos funcionales presentes en los materiales conductores. Para ello se hizo incidir una radiación infrarroja sobre la muestra que provocó cambios en los movimientos vibracionales de la molécula, los cuales fueron representados en un gráfico o espectro con bandas o picos característicos de enlaces presentes en la muestra.

El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier, Spectrum 400 de la marca Perkin-Elmer (Figura 17). La técnica empleada fue la de reflectancia total atenuada (ATR) en el intervalo espectral de 400 a 4000 cm^{-1} a una resolución de 0.8 cm^{-1} y la muestra, previamente secada a 105 $^{\circ}\text{C}$, se preparó mediante pastillas de KBr. Los datos se analizaron mediante el software Opus 7.2. Las pastillas se elaboraron mezclando 0.03 g de la muestra, previamente secada, con 0.3 g de KBr puro. El polvo obtenido se colocó en un portador de muestra para preparar pastillas homogéneas y muy finas empleando una prensa hidráulica de la marca Pike Crush IR aplicando una fuerza de 2 a 3 toneladas.



Figura 17. Espectrofotómetro de Infrarrojo Spectrum 400 Perkin-Elmer

6.1.2 Obtención y caracterización de sustrato e inóculo

La recolección de la FORSU se realizó en la Central de Abastos de Tultitlán, Estado de México, llevando a cabo el muestreo por el método del cuarteo de acuerdo con la norma NMX-AA-015-1985. La muestra se trituro y se preservó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis y procesamiento. La caracterización de la FORSU incluyó parámetros fisicoquímicos: DQO, sólidos totales, volátiles y fijos, humedad, pH, alcalinidad, nitrógeno total (N_T), nitrógeno amoniacal (N_{NH_4}), fósforo total (P_T), ácidos grasos volátiles (AGV's) y parámetros bromatológicos: carbohidratos y proteínas. Los métodos analíticos utilizados para la caracterización se muestran a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6
Métodos analíticos (fisicoquímicos y bromatológicos)

Parámetro	Método
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Fotométrico. Digestión por reflujo cerrado a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 600 nm (APHA, 5220-D).
Sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos (SF).	Gravimétrico. Sólidos secados a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ e incinerados a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ (APHA, 2540-B; APHA, 2540-E).
Humedad	Gravimétrico. Diferencia entre masa inicial y sólidos totales determinados (APHA, 2540 B).
Nitrógeno Kjeldahl (NK).	Volumétrico. Digestión ácida con catalizador de 48.8% Na_2SO_4 , 48.9% K_2SO_4 , 0.3% CuSO_4 por el método Missouri y posterior neutralización, destilación y titulación con $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0.02\ \text{N}$ (APHA, 4500- $\text{NH}_3\ \text{C}$ y 4500- $\text{NH}_3\ \text{E}$).
Nitrógeno amoniacal (N-NH_4).	Volumétrico. Destilación y titulación con $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0.02\ \text{N}$ (APHA, 4500- $\text{NH}_3\ \text{C}$ y 4500- $\text{NH}_3\ \text{E}$).
Fósforo total (PT)	Fotométrico. Digestión ácida con H_2SO_4 Y HNO_3 (APHA, 4500-P B 4). Método del ácido vanadomolibdofosfórico a 470 nm (APHA, 4500-P C).
pH	Potenciométrico. Medido con el potenciómetro
Alcalinidad	Titulación con ácido sulfúrico $0.1\ \text{N}$, de pH 5.75 a 4.3 (Pérez y Torres, 2008).
Ácidos grasos volátiles (AGV's)	Titulación en retroceso de pH 4 a 7 con $\text{NaOH}\ 0.1\ \text{N}$ de la muestra acidificada a pH 3.3, centrifugada y el sobrenadante puesto en ebullición (DiLallo y Albertson, 1961).
Carbohidratos	Fotométrico. Fenol y sulfato de hidracina a 490 nm (Dubois <i>et al.</i> , 1956).
Proteínas	Nitrógeno Kjeldahl multiplicado por factor de 6.25 (Cabbai <i>et al.</i> , 2013).

Por su parte, el inóculo que se empleó para la digestión anaerobia de FORSU fue un lodo anaerobio granular que se obtuvo del reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) que trata efluentes de una planta cervecera. La caracterización de este consistió en la determinación de los mismos parámetros considerados para la FORSU.

6.1.3 Diseño experimental para determinar dosis de material conductor

6.1.3.1 Pruebas de potencial bioquímico de metano

Para los ensayos en lote se usó el equipo Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II) de Bioprocess Control (Figura 18), siguiendo la metodología de Angelidaki *et al.* (2009) y Holliger *et al.* (2016) para el potencial bioquímico de metano (PBM) de residuos sólidos orgánicos y cultivos energéticos. Estos experimentos tuvieron como objetivo analizar la dosis de material conductor (CAG, BC y Fe_3O_4) que propicia un mayor rendimiento, así como evaluar la influencia del tamaño de partícula y la dosis de CAG sobre la misma variable de respuesta.

Las pruebas de PBM están diseñadas para determinar la biodegradabilidad anaerobia y la máxima producción de metano de un sustrato. En este caso se llevaron a 34 ensayos experimentales (Tabla 8) para determinar las dosis de MC con los mejores rendimientos de metano, los cuales se muestran en la Tabla 8. Los detalles para la configuración de esta prueba en lote, se incluyen en los Anexos A (control negativo y positivo), B (solución amortiguadora), C (solución de nutrientes y fosfatos) y D (solución para unidad fijadora de CO_2).

El sistema constó de un baño térmico donde se colocaron 15 frascos de vidrio, cada uno con un volumen de 500 mL, el volumen útil de cada reactor fue de 360 mL, dejando un espacio de cabeza de 140 mL. Las pruebas se realizaron por duplicado, contando además de los ensayos con los diferentes materiales conductores y dosis, con un control endógeno o negativo y un control positivo de glucosa (Anexo A), control de FORSU sin adición de materiales conductores, así como dos controles adicionales, con los materiales conductores a analizar por sí solos y materiales no conductores (sílice y esferas de vidrio) tal como lo especifica la Tabla 8 en la matriz experimental.

Las condiciones ambientales y de operación fueron: temperatura mesofílica de 36.5 ± 1 °C, pH de 7.5 (ajustando con la solución buffer del Anexo B, en caso de ser necesario), agitación manual cada tercer día y una relación inóculo/sustrato de 2, esta relación se definió con base en los sólidos volátiles, agregando así la masa de lodo anaerobio granular y FORSU en base seca necesaria para alcanzar dicha relación. Además, de acuerdo con el protocolo de Holliger *et al.*, (2016) se incorporó la cantidad necesaria de un medio de nutrientes y solución de fosfatos (Anexo C). Finalmente, el espacio de cabeza se desplazó con N_2 durante un minuto aproximadamente para garantizar condiciones anaerobias iniciales.

El biogás producido pasó a través de una unidad de captura de CO₂ que consistió en una solución de hidróxido de sodio 3 M con timolftaleína al 0.4% como indicador de pH (Anexo D) y su volumen se convirtió automáticamente a temperatura y presión estándar (0° C y 1 bar) en una unidad medidora de flujo de metano. Los datos fueron registrados por 21 días o hasta que la producción diaria de gas fue inferior al 1% de la producción total acumulada. La información se obtuvo por medio del software de AMPTS II y transferidos automáticamente a un archivo en formato Excel para su posterior procesamiento y análisis estadístico.



Figura 18. Sistema Automático de Pruebas de Potencial de Metano de Bioprocess Control

6.1.3.1 Análisis de Varianza (ANOVA) unidireccional con prueba post hoc de Dunnett

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Minitab 18.1. Los resultados experimentales de las dosis baja, media y alta de MC se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial o unidireccional, utilizando un nivel de confianza del 95%, seguido de una prueba post hoc: prueba de Dunnett, para analizar las diferencias respecto al grupo control. Cabe destacar que los niveles o las dosis asignadas se determinaron con base en la revisión bibliográfica detallada en la Tabla 4 del Marco Teórico. A continuación, se presentan en la Tabla 7 los criterios considerados para el diseño experimental.

Tabla 7
Planteamiento del diseño experimental para ANOVA unifactorial

Parámetro	Condición
Aleatorización	Sí
Variable dependiente o de respuesta:	Rendimiento de metano (mLCH ₄ /g _{SV} sustrato)
Variable independiente o factor:	Dosis de material conductor (CAG, BC o Fe ₂ O ₃) (g/L) <i>Codificados:</i> Bajo, medio alto <i>Decodificados</i> CAG y BC → 1, 5 y 10 g/L Fe ₂ O ₃ → 0.1, 0.5 y 1 (g/L)

Niveles o tratamientos:

Controles:
 Control negativo
 Control positivo
 Control sustrato
 Control material conductor (CAG, BC y Fe_3O_4)
 Control material no conductor:
 1. Sílice gel
 2. Esferas de vidrio

Réplicas:

2

Tabla 8
Matriz experimental para el análisis de la dosis de CAG

No. de ensayo	Tipo MC	Codificado	Nivel Decodificado
1	CAG	Bajo	Inóculo + FORSU + 1 g/L
2		Bajo	Inóculo + FORSU + 1 g/L
3		Medio	Inóculo + FORSU + 5 g/L
4		Medio	Inóculo + FORSU + 5 g/L
5		Alto	Inóculo + FORSU + 10 g/L
6		Alto	Inóculo + FORSU + 10 g/L
7	BC	Bajo	Inóculo + FORSU + 1 g/L
8		Bajo	Inóculo + FORSU + 1 g/L
9		Medio	Inóculo + FORSU + 5 g/L
10		Medio	Inóculo + FORSU + 5 g/L
11		Alto	Inóculo + FORSU + 10 g/L
12		Alto	Inóculo + FORSU + 10 g/L
13	Fe_3O_4	Bajo	Inóculo + FORSU + 0.1 g/L
14		Bajo	Inóculo + FORSU + 0.1 g/L
15		Medio	Inóculo + FORSU + 0.5 g/L
16		Medio	Inóculo + FORSU + 0.5 g/L
17		Alto	Inóculo + FORSU + 1 g/L
18		Alto	Inóculo + FORSU + 1 g/L
19	Controles	Negativo	Inóculo
20		Inóculo	
21		Positivo	Glucosa
22		Glucosa	
23		Sustrato	Inóculo + FORSU
24		Inóculo + FORSU	
25		Inóculo + CAG	
26		Inóculo + CAG	
27		Material conductor	Inóculo + BC
28		Inóculo + BC	
29		Inóculo + Fe_3O_4	
30		Inóculo + Fe_3O_4	
31		Inóculo + FORSU + sílice	
32		Material no conductor	Inóculo + FORSU + sílice
33	Inóculo + FORSU + esferas de vidrio		
34	Inóculo + FORSU + esferas de vidrio		

6.1.4 Evaluación de la influencia del tamaño de partícula - dosis de CAG

Debido a que de acuerdo con Pan *et al.* (2019) no solo la dosis de material conductor influye, sino también las propiedades y el tamaño de partícula, se planteó un experimento en el que se pudiera analizar ambos factores en paralelo mediante un diseño factorial 3². Debido a que de los tres materiales únicamente el carbón activado se encontraba en forma granular y su tamaño de partícula permitía generar tres granulometrías perfectamente diferenciadas y medidas a través de tamices utilizando la escala U.S. STD. Sieve, fue entonces que el análisis de la influencia del tamaño de partícula-dosis se llevó a cabo para CAG, denotándose el tamaño de partícula como “tp” y la dosis como “d”, en cada combinación agregándose una B, M o A para hacer referencia al nivel bajo, medio o alto del factor como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

Matriz experimental del diseño factorial 3² para el rendimiento de metano con respecto al tamaño de partícula y la dosis de CAG

Factor	Codificado			Nivel		
				Decodificado		
Tamaño de partícula CAG (tp)				<i>Número de malla (U.S. STD Sieve)</i>		
				40	30	18
				<i>Abertura (mm)</i>		
Dosis CAG (d)	Bajo (B)	Medio (M)	Alto (A)	0.420	0.595	1.00
					g/L	
				0.1	0.5	1

A partir de los resultados de las pruebas de PBM, se obtuvo el análisis de varianza, los gráficos de efectos principales, de interacciones y superficie de respuesta por medio del software Minitab 18.1.

6.1.5 Rendimiento del proceso

6.1.5.1 Modelo cinético modificado de Gompertz

El modelo de ajuste de Gompertz (modelo de regresión no lineal) (Ecuación 1) permitió identificar parámetros importantes en la digestión anaerobia, como la tasa máxima de producción, el rendimiento máximo de metano y la fase de latencia. El modelo corresponde a una función sigmoideal de tipo descriptivo y no predictivo en el que se relaciona la producción de metano en el reactor ajustando los parámetros para que la ecuación coincida con los datos experimentales (Gadhamshetty *et al.*, 2010).

$$Y_{(t)} = P_{max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max} \cdot e}{p} \cdot (\lambda - t) \right] \right\} \quad [1]$$

Donde:

$Y_{(t)}$: Producción acumulada de metano (mL/ g_{SV}) en el tiempo t (d)

P_{max} : Máxima producción acumulada de metano al término del experimento (mL/ g_{SV})

R_{max} : Máxima velocidad de producción de metano (mL/ g_{SV}/d)

λ : Fase de latencia (d)

t : Tiempo de generación de metano (d)

e : Constante matemática (número de Euler) = 2.7183

El ajuste del modelo se realizó mediante el software Statistica 7.0, minimizando el error entre los valores simulados y los valores experimentales. El grado de ajuste se determinó por medio del factor de correlación al cuadrado (R^2).

6.2 Etapa 2. Inmovilización de materiales conductores

Con fundamento en la revisión bibliográfica de la sección 5.8, se seleccionaron tres estrategias de inmovilización que se evaluaron en experimentos en lote (como se detalló en la sección 6.1.3.2).

6.2.1 Síntesis de perlas de BC/ Fe_3O_4 -alginato

Para elaborar las perlas de alginato con BC o Fe_3O_4 , se empleó la metodología de gelificación iónica descrita por Kwak *et al.* (2018) que consistió en disolver 1 g de alginato de sodio en 50 ml de agua destilada. Luego, se dispersaron 2 g de biocarbón o magnetita en la solución de alginato y se sometieron a ultrasonidos durante 30 min para evitar la agregación del material. La solución de BC/ Fe_3O_4 -Alg se cargó en una jeringa de 10 ml y se goteó en una solución acuosa de cloruro de calcio ($CaCl_2$) (2% p/v) mientras se agitó continuamente. Se utilizó una aguja de jeringa de calibre >20 y la distancia entre el extremo de la aguja y la superficie de $CaCl_2$ la solución fue de 5 cm. Después del proceso de goteo, se continuó agitando durante 30 minutos con el fin de completar el proceso de reticulación. Las perlas de BC/ Fe_3O_4 -Alg preparadas se lavaron con agua destilada y se secaron durante 2 h a 60 °C, de acuerdo con lo sugerido por Liu *et al.* (2020) para conservarlas a temperatura ambiente en un desecador.

6.2.2 Síntesis de fibra de poliéster-BC/ Fe_3O_4

En la inmovilización de las partículas en polvo sobre fibra no tejida de poliéster se usó el método descrito por Báez-Santana (2019) que se basa en la termofijación en seco. Inicialmente la fibra fue lavada con agua desionizada para remover impurezas y secada a 60 °C durante 24 horas para eliminar el exceso de humedad. Se elaboraron recortes de fibra con un área de 2 cm², se introdujeron en un recipiente cerrado y sobre éstas se dispersaron 20 g de material en polvo agitándose para una mejor impregnación. Para lograr que el BC/ Fe_3O_4 se fusionara con el polímero, éste se sometió a una temperatura

de 200 °C durante 10 minutos en un horno. Durante cada uno de los pasos anteriores se cuantificó la masa de cada pieza de poliéster.

6.2.3 Síntesis de fibra de carbono-BC/Fe₃O₄

Se preparó una fibra de carbono mediante impregnación de magnetita con quitosano como soporte de revestimiento siguiendo la metodología de Zhang *et al.* (2010b). Para modificar la fibra de carbono se elaboró una solución que contenía: una suspensión de magnetita 75 mM, quitosano al 0.1% y polietilenglicol al 0.1%. Después de impregnar con la mezcla y eliminar el exceso por filtración al vacío, la fibra de carbono se secó en un horno a 60 °C y se lavó repetidamente con agua desionizada. Finalmente, las fibras modificadas se termofijaron en un horno a 200 °C durante 10 minutos. Se prepararon simultáneamente fibras de control con el mismo procedimiento que para la fibra modificada excepto que no se añadió magnetita en la mezcla de modificación.

6.2.4 Caracterización de materiales inmovilizados

Los métodos analíticos seleccionados para caracterizar los materiales se basan en lo descrito por Kwak *et al.* (2018) y se resumen a continuación.

6.2.4.1 Diámetro promedio (sólo para perlas de alginato)

El diámetro promedio de las perlas de BC/Fe₃O₄-Alg se determinó seleccionando aleatoriamente al menos 20 perlas.

6.2.4.2 MEB-EDS

La morfología de la superficie de los tres materiales modificados se analizó utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. En el caso de las perlas de alginato, éstas se congelaron en nitrógeno líquido, se fracturaron y se deshidrataron en una serie graduada de soluciones de agua/etanol (25%, 50%, 70%, 85%, 95% y 100%) para después ser recubiertas mediante pulverización catódica utilizando oro-paladio, concluido este pretratamiento se observan al microscopio (Su *et al.*, 2009). En el caso de las fibras de carbono, éstas no requirieron recubrimiento por su carácter conductor, mientras que las fibras de poliéster se recubrieron de la misma forma que las perlas de alginato.

6.2.4.3 Análisis termogravimétrico:

La estabilidad térmica se determinó utilizando un analizador termogravimétrico (TGA/DSC 3+ Mettler Toledo). Los termogramas se obtuvieron en una atmósfera de aire con una velocidad de flujo de 20 mL/min, siguiendo el método estándar ASTM E1131-03. El rango de temperatura fue de 20 a 800 °C, con una velocidad de calentamiento constante de 10 °C/min.



Figura 19. Analizador termogravimétrico (TGA/DSC).

6.2.5 Pruebas de potencial bioquímico de metano

El rendimiento del proceso y los parámetros cinéticos de los materiales inmovilizados se evaluaron de la misma forma como se describió previamente en las secciones 6.1.3.1 (protocolo PBM) y 6.1.5.1 (modelo modificado de Gompertz), con la única diferencia que en este caso se agregaron 3 fibras y 20 perlas de alginato a cada reactor.

6.3 Etapa 3. Análisis de la estabilidad del proceso y proteómica

6.3.1 AGVs, pH y ORP

Los ensayos con mejores rendimientos, ya sea con materiales conductores añadidos a los reactores en forma suspendida o inmovilizada fueron analizados en términos de la estabilidad del proceso mediante los parámetros fisicoquímicos de AGV totales, pH y ORP, descritos con anterioridad.

6.3.2 Análisis proteómico

El análisis proteómico se realizó con la finalidad de identificar las proteínas y microorganismos más abundantes en las muestras, así como para rastrear proteínas específicas que son de interés en el transporte de electrones extracelular, o aquellas que tienen también metales como el hierro funcionando como cofactores enzimáticos. La metodología constó de tres pasos los cuales son: 1) extracción y purificación de proteínas, 2) electroforesis 1D o 2D (según sea el caso), 3) análisis de espectrometría de masas e identificación de proteínas por huella peptídica. A continuación, se describe la metodología correspondiente a cada etapa.

6.3.2.1 Extracción de proteínas y purificación por fenol básico

Un gramo de muestra se maceró utilizando un dispersador batch T18 IKA. La muestra se puso en 6 mL de fenol pH 8.8 y 5 mL de buffer de extracción (100mM tris HCl, pH 8.8, 10mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-betamercaptoetanol) se aplicaron 5 pulsos de 1 min en el dispersador alternados por 1 min en hielo, después de los 5 pulsos

se mantuvo en hielo 10 min más y se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min, se tomó la fase orgánica y se depositó en un tubo de 50 mL nuevo y se agregaron 25 mL de acetato de amonio 100 mM en metanol se agitó y se dejó reposar 16 hrs a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min para obtener una pastilla de precipitado y se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 5 mL de acetato de amonio en metanol 2 veces y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min después de cada lavado, posteriormente se lavó de igual manera la pastilla con acetona al 80% 2 veces y un último lavado con etanol al 70%, la pastilla se resuspendió en 500 μL de buffer IEF (4.8 g de urea, 1.5 g de tiourea, 0.4 g CHAPS, 200 mL tritón, 0.007 DTT y 1 tableta de inhibidores). Una vez extraída la proteína, se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific para determinar si la cantidad es suficiente para proceder al análisis del gel de electroforesis SDS-PAGE 1D.

6.3.2.2 Electroforesis en 1D SDS-PAGE

Posteriormente se analizó la integridad de la proteína en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) de una dimensión (1D). Debido al SDS las proteínas se desnaturalizan, perdiendo su conformación tridimensional. De este modo se obtuvo un fraccionamiento o separación que obedece a la diferencia de peso, la longitud de la cadena y la forma de las proteínas. Para ello, 20 μg de cada una de las muestras se resolvieron en un gel al 12% de poliacrilamida con un estándar de marcador molecular "Precision Plus" de Biorad como referencia de peso molecular y 1 μg de Lisozima Sigma L6876-1G como referencia de cantidad. El gel se corrió en una cámara de electroforesis a 100 V por 2.5 horas (Figura 20).

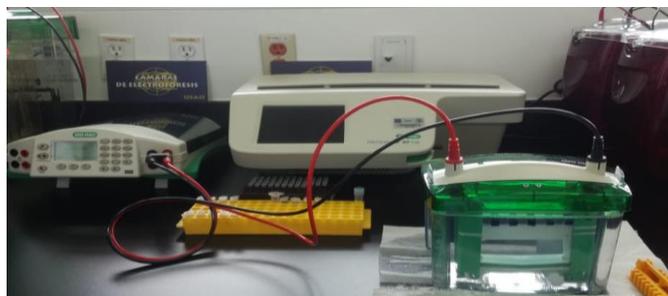


Figura 20. Unidad de electroforesis para 1D SDS-PAGE.

Finalizada la electroforesis, se desmontó el gel y se realizó un primer paso de fijación, incubando los geles en una solución 50% v/v metanol/agua durante al menos una hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de fijación y se incubaron los geles en solución de tinción (8% p/v sulfato amónico, 2% ácido fosfórico y 20% metanol y 0.1 % de Azul de Coomassie G-250) durante al menos 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se destiñeron los geles con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de bandas. Para la captura de imágenes se

procedió a la adquisición de la imagen para su análisis densitométrico, en un densitómetro calibrado GS-900 BioRad. Este gel permite la cuantificación de proteínas mediante el Software ImageLab versión 5.2.1.

6.3.2.3 Electroforesis en 2D SDS-PAGE

Para el gel de dos dimensiones se utilizaron 350 μg de las muestras que se resuspendieron en 215 μl de buffer desnaturalizante (8M urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 2% tritón X 100 y 50 mM DTT) y se aplicaron en una tira de gel de poliacrilamida de 11 cm con un gradiente inmovilizador de pH (IPG BIORAD) de un intervalo de 3 a 10 durante 10 minutos a temperatura ambiente, en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, BIORAD). Posteriormente las tiras fueron cubiertas con aceite mineral y la bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque PROTEAN i12 IEF Cell (BioRad) para rehidratarlas activamente (12 h, a 20 °C) seguida de 5 pasos de focalización: 500 V por 30 min (rápida), 1000 V por 1h (gradiente), 3000 V por 1h (gradiente), 5000 V por 2 h (gradiente) y 8,000 V (rápida) por 3 h, hasta un voltaje acumulado de 30-35 kVh.

Tras el isoelectroenfoque, las tiras IPG fueron removidas de la charola, se eliminó el aceite mineral, y se incubaron durante 15 minutos con un tampón de equilibrio SDS (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 30% v/v glicerol y 5% p/v SDS 2% DTT) con agitación y a temperatura ambiente, esta incubación se repitió 2 veces. Posteriormente se incubó 2 veces más con un tampón de alquilación SDS (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 30% v/v glicerol y 5% p/v SDS 2.5% yodoacetamida) durante 15 minutos en las mismas condiciones de agitación y temperatura, posteriormente se dio un breve lavado con amortiguador de corrida de proteínas SDS 1X. Así las tiras quedaron listas para llevar a cabo la segunda dimensión.

La preparación y condiciones de corrida de los geles 2D se realizó como se describe a continuación: Para las tiras de 11 cm se utilizó el sistema de electroforesis SE600 Vertical Unit (GE-Healthcare), empleando geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% de 16x15 cm. Para elaborar los geles de acrilamida se prepararon tres soluciones: la primera es una solución concentrada de acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 0.8% (p/v) en agua bidestilada. La segunda es una solución de Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, SDS 10% (p/v) en agua bidestilada, que se le agrega a la primera para obtener la concentración del gel de resolución, cuya función es separar a las proteínas por peso molecular. La tercera es una solución de 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, SDS 10% (p/v) en agua bidestilada, que se le agrega a la primera para obtener el gel concentrador, cuya función es concentrar rápidamente las proteínas que vienen de las tiras IPG.

Se añadieron también 0.05% APS y 0.005% TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización. Las soluciones se transfirieron a la cámara de polimerización del sistema SE600 VERTICAL UNIT (GE-HEALTHCARE), cada tira IPG se colocó sobre la superficie de un gel, evitando que quedaran burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal base. Para fijar los geles y evitar pérdidas de proteínas cuando éstas migran de la tira al gel, se añade una solución de agarosa 0,5% (p/v) en tampón de corrida SDS-PAGE y con trazas de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 25°C con un voltaje constante de 50 V por 22 horas a temperatura ambiente en un tampón de corrida SDS-PAGE (Figura 21).

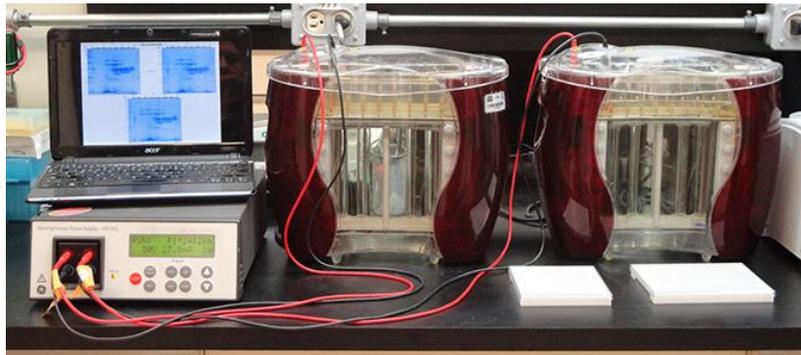


Figura 21. Unidad de electroforesis para 2D SDS-PAGE.

6.2.1.3 Análisis de espectrometría de masas e identificación de proteínas por huella peptídica.

Con la finalidad de identificar las proteínas presentes en la muestra y a su vez conocer a qué microorganismos a nivel especie se encuentran relacionadas, los geles 1D o 2D se fraccionaron y se almacenaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -20 °C con una solución *buffer* hasta su análisis por espectrometría de masas.

Se llevó a cabo la estrategia conocida como *Shotgun*, con la cual, a partir de una base de datos de péptidos asociados a algún microorganismo de interés, las proteínas fueron identificadas. Esta técnica utiliza un algoritmo de búsqueda en la base de datos UniProt (descrito por Li *et al.* 2009) para la identificación cualitativa de proteínas en un amplio rango dinámico. El procesamiento de datos se realizó utilizando el servidor y el software global ProteinLynx versión 2.4 (Waters Corporation) con un Protein Lynx Global Server (PLGS) (Waters Corporation). Se aceptó como correcta la puntuación de PLGS con un intervalo de confianza >95 %.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de los materiales conductores

7.1.1 Parámetros fisicoquímicos

De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de la conductividad eléctrica (CE), es posible observar en la Tabla 10 que el biocarbón es el material que tiene mayor capacidad para conducir una corriente eléctrica en solución. Este valor se ve directamente afectado por el número de iones disueltos o electrolitos. Los iones presentes en la superficie de los materiales se solvatan en presencia de agua y se disocian en iones positivos y negativos siendo libres de moverse en la solución hacia el ánodo y cátodo del instrumento de medición respectivamente, produciendo una señal eléctrica más intensa.

Lo anterior se explica también con los resultados experimentales y teóricos de Sólidos Disueltos Totales (SDT), ya que, en soluciones acuosas la CE y los SDT guardan una relación directamente proporcional. En la Tabla 10 se puede notar una cantidad considerablemente mayor de SDT en el caso del biocarbón, que, junto con los análisis de espectrometría de dispersión de rayos X (EDS) mostrados en la siguiente sección (Figura 25), pone en evidencia la presencia de metales alcalinos y alcalinotérreos que en medio acuoso podrían conferirle el comportamiento iónico al que debe su mayor conductividad respecto al CAG y la magnetita.

En la Tabla 10 se incorporan otros parámetros de interés en el análisis de los materiales conductores que son incorporados en los sistemas de digestión anaerobia, cuya injerencia se explica a continuación.

Tabla 10
Caracterización de materiales conductores

Parámetro	Carbón activado granular	Biocarbón	Magnetita (Fe ₃ O ₄)
pH	9	9.5	8
Conductividad (μS/cm)	212	455	28
SDT experimental (ppm)	130.2	282.05	15.5
SDT teórico (ppm)	148.4	318.5	19.6
Diámetro promedio de poro (nm)	1.56	1.12	0.90
Área superficial BET (m ² /g)	500	80	40
Granulometría (US Std. Sieve)	Malla 20x50, 12x40, 8x30	< Malla 40	< Malla 40
Sólidos Totales (%)	99.4	99.1	99.9
Sólidos volátiles (%)	61.3	71.6	5.5
Sólidos fijos (%)	38.7	28.4	94.5



El pH de los tres materiales es básico. Esto resulta positivo cuando se incorporan en los sistemas de DA ya que de acuerdo con Cai *et al.* (2016) esta característica le confiere al CAG y sobre todo al biocarbón, una capacidad amortiguadora, que permite mantener el pH estable a lo largo del proceso. En el caso de los materiales carbonosos, esta característica depende de varios factores, incluidos la materia prima y las condiciones del proceso termoquímico de producción. Para carbones activados y biocarbones a partir de cáscara de coco se han reportado valores altos de pH que oscilan entre 8 y 12 (Ahmad *et al.*, 2014; Luz *et al.*, 2018). Algunos biocarbones pirolizados a 550 °C como es el caso del biocarbón utilizado en este trabajo, han presentado valores de encalado del 30% de CaCO₃ (Van Zweiten *et al.*, 2010) lo que explica en gran medida el efecto *buffer*.

Por su parte, Komnitsas y Zaharaki (2015) a través de su investigación encontraron que el pH del biocarbón incrementa proporcionalmente a su temperatura de pirólisis, esto se debe a la liberación de carbonos oxigenados que permiten la desprotonación de la superficie del BC. Con respecto a la temperatura de pirólisis, Yuan *et al.* (2011) también asociaron la mayor presencia de grupos funcionales -COOH a temperaturas por encima de 500 °C, brindándole mayor capacidad amortiguadora a biocarbones de distintos sustratos. Finalmente, esta naturaleza alcalina además se explica por la presencia de óxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos presentes en las cenizas, los cuales se ponen en evidencia en los análisis EDS mostrados la siguiente sección.

Aun cuando los dos materiales carbonosos corresponden al mismo sustrato de origen y se emplearon condiciones similares de pirólisis, su morfología (diámetro de poro, área superficial, granulometría), es distinta. Los tres materiales conductores coinciden en una mayor proporción de microporos, sin embargo, el CAG con un proceso de activación, tiene un área superficial mayor, de 500 m²/g respecto a 80 m²/g en el biocarbón. La estructura morfológica de los materiales se sugiere importante ya que fenómenos de superficie como la adsorción se rige y limita por el volumen de microporos, del mismo modo, la velocidad de sorción de compuestos inhibitorios en la digestión anaerobia dependería de estas características (Lowell *et al.*, 2012).

Finalmente, resultaba de interés caracterizar el perfil de sólidos de los materiales conductores de modo que fuera posible discriminar o adjudicar un posible incremento de metano en las pruebas de PBM debido a la degradación de materia orgánica presente en éstos. Dentro del perfil de sólidos, los sólidos volátiles se interpretan en el proceso de digestión anaerobia como materia susceptible de biodegradación. Estos SV corresponden a: 61.3%, 71.6% y 5.5% para CAG, BC y Fe₃O₄ respectivamente. Cabe señalar que los materiales no fueron consumidos como fuente de carbono por los microorganismos del lodo anaerobio granular durante las pruebas, ya que se trata de materia orgánica, principalmente sustancias húmicas, resistentes al ataque microbiano.

7.1.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) - Espectrometría de Dispersión de Rayos X (EDS)

Carbón activado granular

La microscopía electrónica de barrido del CAG muestra dos tipos de superficies: áreas relativamente lisas con crestas largas y áreas rugosas con microporos y bordes. La Figura 22B deja ver las áreas lisas y rugosas de la superficie con un aumento de x500. En la Figura 22C, con un aumento de x5000 se pueden identificar claramente algunos macroporos que corresponden a la superficie rugosa.

Por su parte, el análisis de espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS) muestra la composición elemental de diferentes áreas de la superficie del carbón activado granular (Figura 23). Se diferencian claramente dos zonas, una oscura, señalada en el espectro 30 y 34 y que es esencialmente carbono y, por otra parte, zonas blancas que se enmarcan en los espectros 31, 32 y 33 y que son fundamentalmente depósitos de carbono donde se encuentran incrustados metales alcalinos (K^+ y Na^+), alcalinotérreos (Mg^{2+} y Ca^{2+}) metaloides (Si^{4+} y Al^{3+}) y no metales (Cl^- y P). La presencia de este tipo de elementos, principalmente los metales alcalinos y alcalinotérreos pueden atribuirse a la materia precursora del carbón activado, el endocarpio de coco.

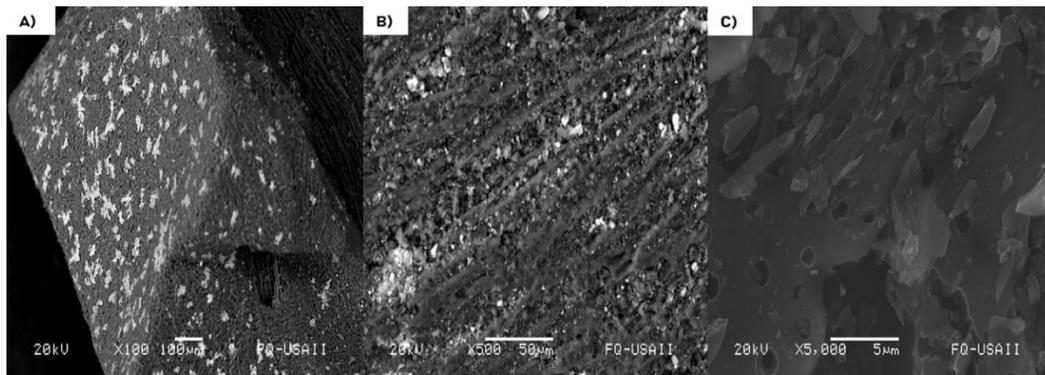


Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de carbón activado granular a aumentos x100 (A), x500 (B) y x5000 (C).

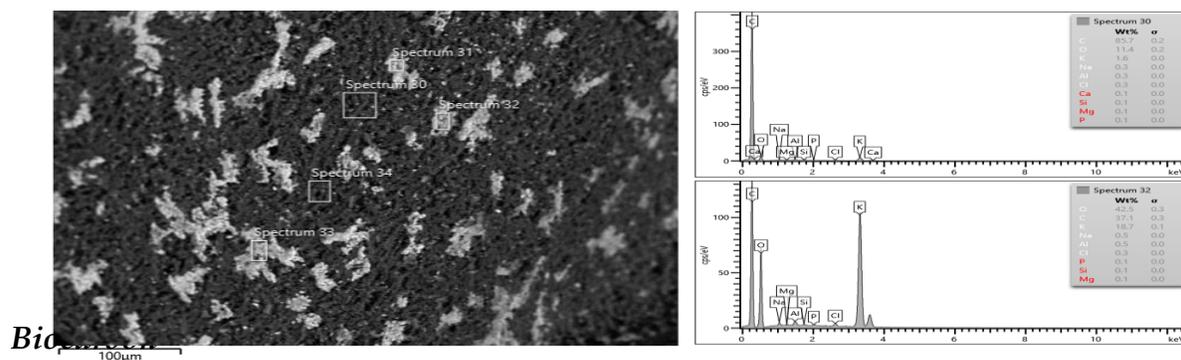


Figura 23. Espectroscopía de dispersión de rayos X de carbón activado granular.

El biocarbón por su parte, muestra una morfología fragmentada y muy heterogénea, de partículas con caras planas sin una evidente porosidad, mientras que también presenta partículas porosas, lo que concuerda con el área superficial relativamente baja de este material (80 m²/g). A pesar de esta característica, existe evidencia de que el biocarbón puede fungir como un microambiente potencial para microorganismos en ecosistemas terrestres o acuáticos (Jaafar *et al.*, 2014) y diversos cultivos y co-cultivos pueden colonizar la superficie del biocarbón formando incluso biopelículas sobre el material (Chen *et al.*, 2014).

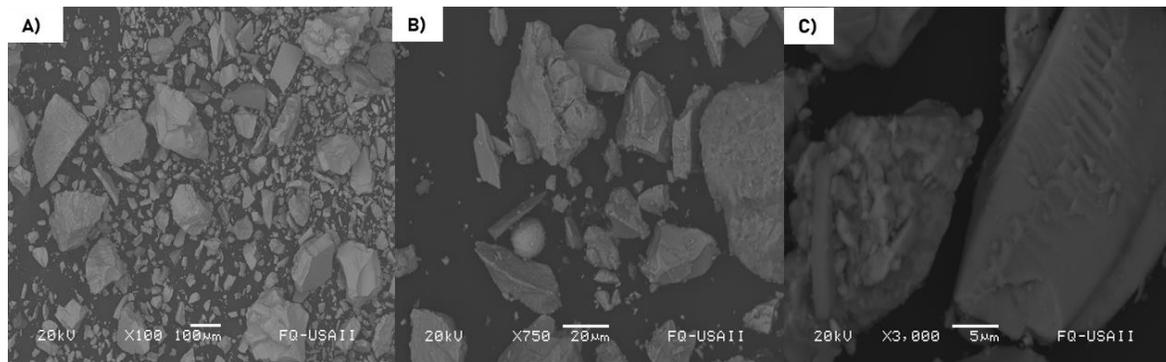


Figura 24. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de biocarbón a aumentos x100 (A), x750 (B) y x3000 (C).

En el análisis EDS del biocarbón (Figura 25) se distinguen dos agregados con composiciones diferentes, los espectros oscuros 27 y 28 corresponden a fragmentos de carbono, mientras que las zonas claras, espectros 24, 25 y 26 muestran elementos distintos, en donde destacan los metales alcalinos K⁺, Na⁺ y Ca²⁺ que pueden facilitar la atracción electrostática y el intercambio iónico.

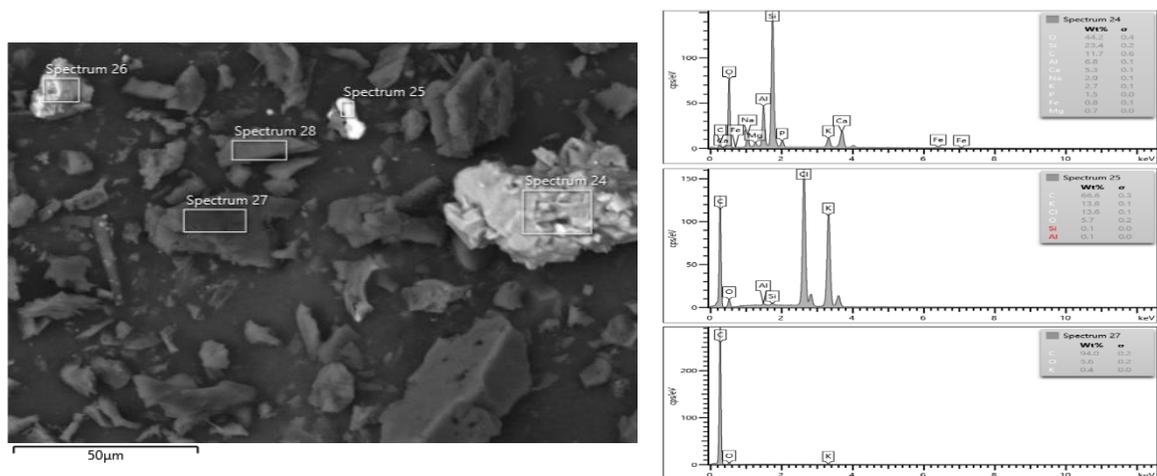


Figura 25. Espectroscopía de dispersión de rayos X de biocarbón.

Magnetita

La Figura 26 muestra la morfología y topografía de la magnetita, cuyas partículas se aprecian muy heterogéneas y principalmente lisas. Se observa en su superficie escasa porosidad y el análisis de espectroscopía de dispersión de rayos X muestra espectros con tonalidades y composiciones elementales muy parecidas. En el análisis EDS las partículas grises claro se caracterizan por la presencia de un gran número de metales como Ca^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Zr^{4+} y Ti^{4+} , mientras que las partículas más oscuras son fundamentalmente Fe^+ y O^- (Figura 27).

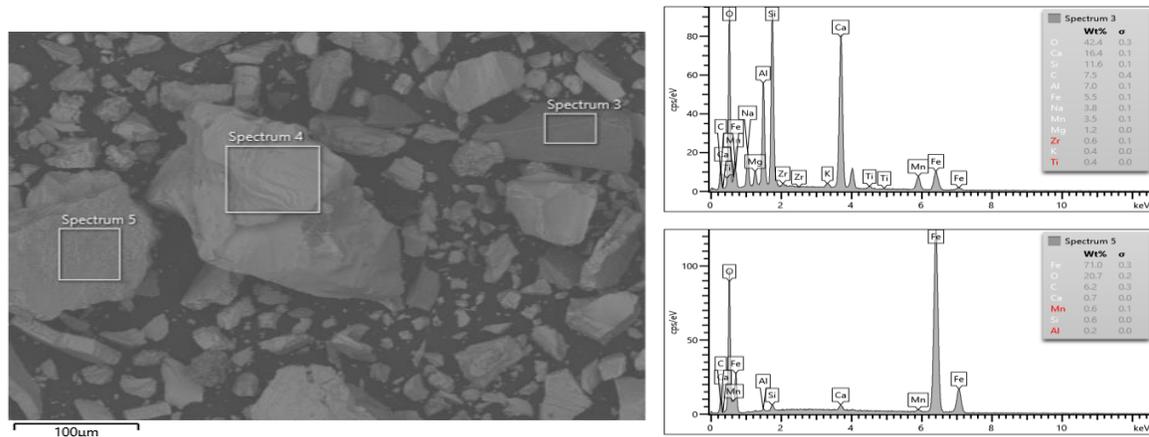


Figura 26. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de magnetita (Fe_3O_4) a aumentos x100 (A), x500 (B) y x5000 (C).

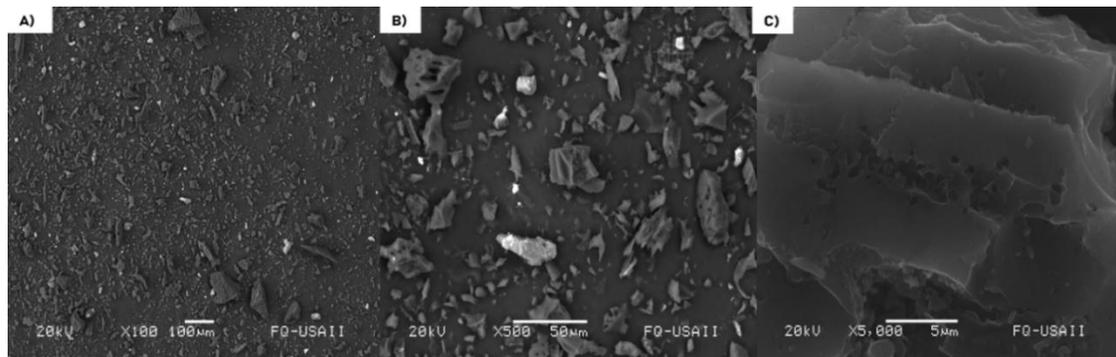


Figura 27. Espectroscopía de dispersión de rayos X de magnetita (Fe_3O_4)

7.1.3 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Carbón activado granular

La producción de carbón activado a partir de endocarpio de coco involucra la pirólisis de un material lignocelulósico (con una composición aproximada de 40-45% lignina, 32-43% celulosa y 0.15-0.25% hemicelulosa) cuyas principales reacciones a la temperatura de pirólisis que se procesó, son la despolimerización, oxidación,

deshidratación, descarboxilación, condensación y aromatización. De acuerdo con los resultados de FTIR para CAG (Figura 28), se puede observar que desaparecen bandas típicas encontradas en compuestos altamente lignocelulósicos, tal es el caso del grupo funcional -OH alrededor de 3500 cm^{-1} , lo que indica que los enlaces químicos se rompieron durante el proceso de carbonización seguido de la activación térmica en una atmósfera saturada de vapor de agua.

Se sabe que la banda de estiramiento olefínico $\text{C}=\text{C}$ se encuentra a 1650 cm^{-1} y el máximo de absorción puede cambiar hacia números de onda más bajos cuando el enlace $\text{C}=\text{C}$ se conjuga con otro enlace $\text{C}=\text{C}$ o un núcleo aromático (Jung *et al.*, 2009), tal es el caso de las bandas alrededor de 1500 y 1600 cm^{-1} .

Las bandas 2655 y 2338 cm^{-1} se adjudican a grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), el cual es altamente polar, con una zona negativa alrededor del oxígeno carbonílico y una zona positiva cerca del hidrógeno del grupo hidroxilo, esta característica le permite formar puentes de hidrógeno similares a los del agua. La banda presente en 1883 cm^{-1} , se asocia con el grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), el cual es de gran importancia en la estructura de compuestos orgánicos y le confiere algunas propiedades como la polaridad para interactuar con el agua, proteínas, carbohidratos, grasas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Se asume que la banda ancha a 1085 cm^{-1} se debe a la superposición de los estiramientos de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ y flexión de $\text{O}-\text{H}$ de los grupos alcohólicos, fenólicos y carboxílicos, aunque también se asocia a la deformación de grupos éteres. Finalmente, el pico en 870 cm^{-1} se debe al estiramiento del grupo $\text{C}-\text{O}$ y vibraciones de deformación del anillo piranosa de la celulosa.

Biocarbón

Los espectros FTIR del biocarbón (Figura 28) dejan ver, al igual que el CAG, la desaparición de vibraciones típicas de materiales lignocelulósicos inherentes al proceso de pirólisis, a pesar de que este se produce por medio de temperaturas más bajas y no conlleva un proceso de activación térmica o química. La FTIR pone en evidencia los procesos de deshidroxilación, deshidrogenación y aromatización (ausencia del grupo -OH alrededor de $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, nula presencia de grupos $-\text{COOH}$ y notable presencia de compuestos aromáticos entre $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ respectivamente).

Las pequeñas bandas ubicadas en 872 , 811 y 746 cm^{-1} son también características de sustituciones aromáticas. En este sentido, la temperatura de pirólisis a la que fue sometido el biocarbón explica la presencia de grupos funcionales menos polares y más aromáticos que le confieren al biocarbón una gran hidrofobicidad, debida también a la baja presencia de oxígeno y nitrógeno en los grupos funcionales. La disociación de grupos funcionales que contienen oxígeno le otorgan al biocarbón una carga negativa, lo que podría facilitar la atracción electrostática de contaminantes cargados positivamente.

Magnetita

En el caso de la magnetita, la espectroscopía de infrarrojo (Figura 28) no muestra presencia de grupos funcionales. Es posible evidenciar la huella molecular del óxido ferroso por la región en la que se encuentra el pico más notable.

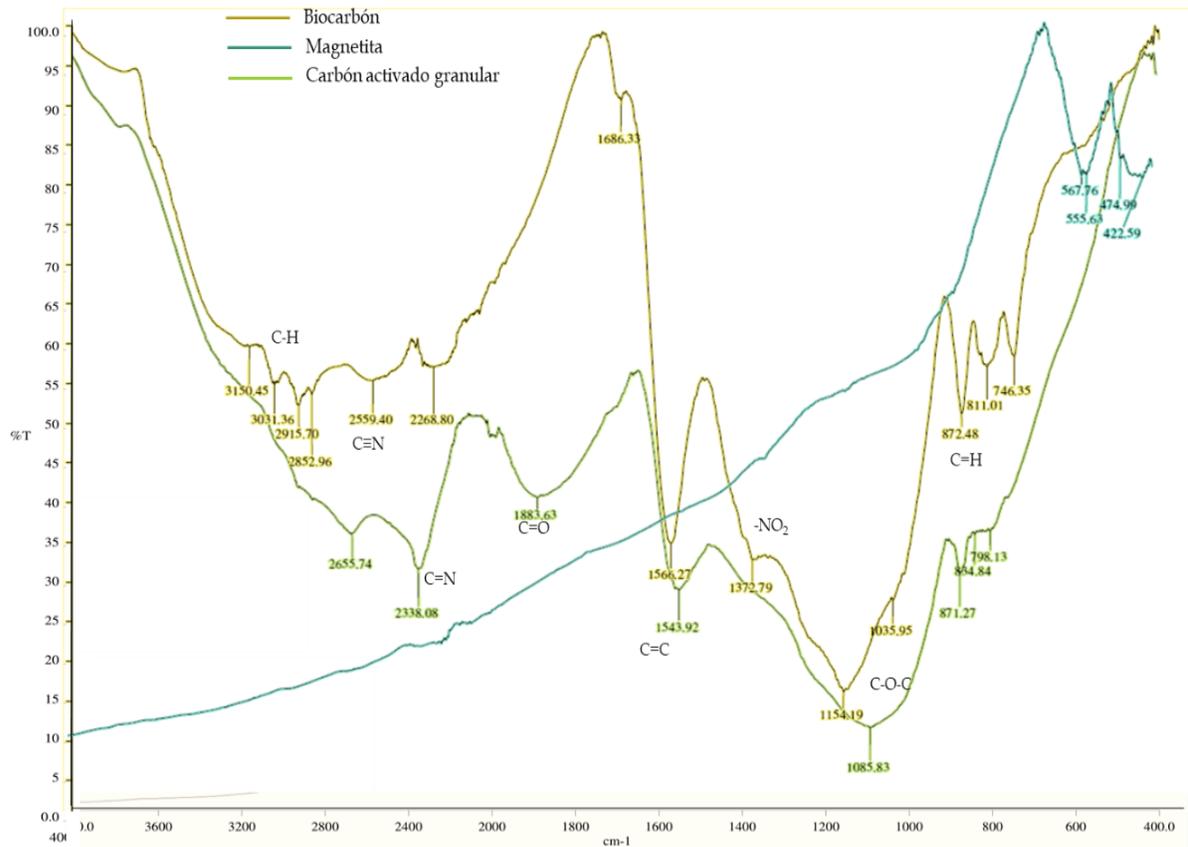


Figura 28. Espectros de infrarrojo de los materiales conductores (BC, Fe₃O₄ y CAG).

7.2 Obtención y caracterización de sustrato e inóculo

La fracción orgánica de los residuos sólidos se obtuvo del Mercado de Abastos de Tultitlán, Estado de México, fuente de recolección de residuos para la alimentación de la planta piloto de digestión anaerobia "3PBG" ubicada en la FES-Cuautitlán de la UNAM. El muestreo se llevó a cabo por el método del cuarteo en las instalaciones de la planta piloto antes mencionada, siguiendo los criterios de la NMX-AA-019-1985 para tener una muestra representativa, de tal forma que tomando dos de los cuadrantes diagonales se obtuvo un peso volumétrico de 420 kg/m³.



Figura 29. A) Cuarteo de la FORSU para obtención de la muestra y B) disminución del tamaño de partícula del sustrato *in situ*.

Los residuos seleccionados se pretrataron *in situ* en el equipo de molienda de la planta (Figura 29A), teniendo tamaños de partícula del intervalo de 1.5-0.5 cm que posteriormente se redujeron de tamaño en laboratorio, en una licuadora industrial a 0.2-0.5 mm (Figura 30A), esto con la finalidad de lograr una mejor homogeneización del sustrato y lograr determinaciones de parámetros fisicoquímicos y bromatológicos más representativos y con menores desviaciones estándar.

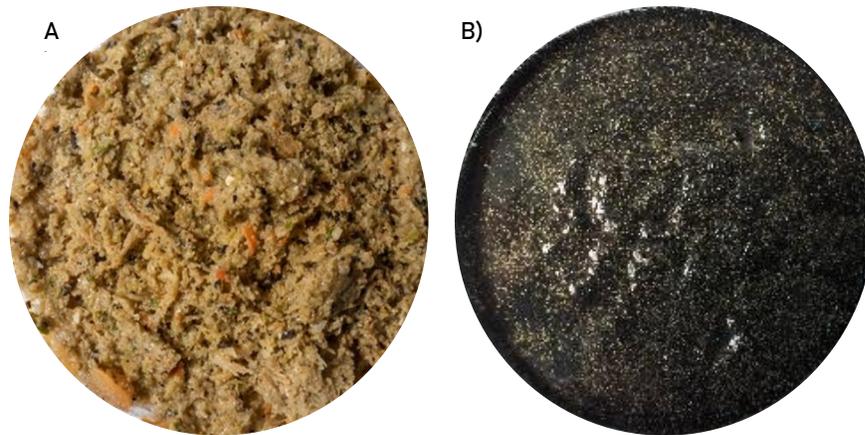


Figura 30. A) FORSU pretratada (disminución de tamaño de partícula) y homogenizada y B) lodo anaerobio granular de un reactor UASB de una planta cervecera.

La caracterización de la FORSU (Tabla 11) muestra que el 78% del peso de la FORSU es humedad, siendo el resto los sólidos totales (S_T) o materia seca. El 86% de los sólidos totales corresponde a materia orgánica, es decir, 181 gramos de SV por cada kilogramo de FORSU. Los residuos presentan una relación SV/ S_T de 83% lo cual apunta a un sustrato ideal para degradar por vía anaerobia. Su DQO, de 325 g/kg se encuentra dentro del rango de DQO reportada para otras fracciones orgánicas en diferentes países, la cual oscila entre 140 y 575 g/kg de acuerdo con Campuzano (2015).

Por otra parte, el nitrógeno amoniacal se encuentra en intervalos aceptables para procesos de digestión anaerobia, de modo que no tiene efecto adverso sobre el sistema. La FORSU posee además un pH bajo de 5.1 y aunque los ácidos grasos volátiles superan el límite recomendable para evitar la inhibición del proceso, en ensayos de potencial bioquímico de metano y en la propia planta piloto no se han presentado problemas de inhibición por sustrato. Además, el lodo anaerobio granular es un inóculo en crecimiento exponencial, con una alta actividad metanogénica específica, muy baja producción endógena, por debajo del 20% de la producción total de metano, como lo recomienda el protocolo de Holliger *et al.* (2016) y una buena capacidad *buffer* debido a la alcalinidad total de 6.1 gCaCO₃/kg que posee.

Tabla 11

Resultados de la caracterización fisicoquímica y bromatológica de los sustratos

Parámetro	Unidades	Sustrato	Inóculo
		FORSU	Lodo anaerobio granular
Humedad	%	78.2 ± 1.09	92.5 ± 0.94
Sólidos Totales (S _T)	g/kg	218.4 ± 2.09	74.7 ± 1.5
Sólidos Volátiles Totales (S _{VT})	g/kg	181.4 ± 3.3	18.4 ± 2.8
Sólidos Fijos Totales (S _{FT})	g/kg	36.9 ± 2.7	56.3 ± 4.5
S _V /S _T	%	83 ± 3.3	25 ± 2.1
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	g/kg	325 ± 7.8	78.1 ± 5.6
Fósforo Total P _T	g/kg	1.6 ± 0.4	0.78 ± 1.02
pH		5.1 ± 0.03	8 ± 0.01
Alcalinidad total	gCaCO ₃ /kg	4.2 ± 0.1	6.1 ± 0.02
Índice alfa		0.25 ± 0.1	0.63 ± 0.09
Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)	g CH ₃ COOH/kg	8.7 ± 1.3	0.28 ± 1.6
Nitrógeno total (N _T)	g/kg	1.06 ± 0.9	1.4 ± 1.3
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄)	g/kg	0.19 ± 1.8	0.086 ± 1.3
Proteínas	g/kg	6.6 ± 0.7	0.5 ± 0.2
Carbohidratos	g/kg	28 ± 1.5	2.1 ± 1.8

7.3 Pruebas de potencial bioquímico de metano para la determinación de la dosis de material conductor

Los resultados mostrados en esta sección corresponden a los experimentos que se integran gráficamente en la Figura 31, donde se probaron diferentes dosis de MC y controles, por medio de pruebas de potencial bioquímico de metano durante 21 días. A continuación, se discuten los hallazgos del experimento.

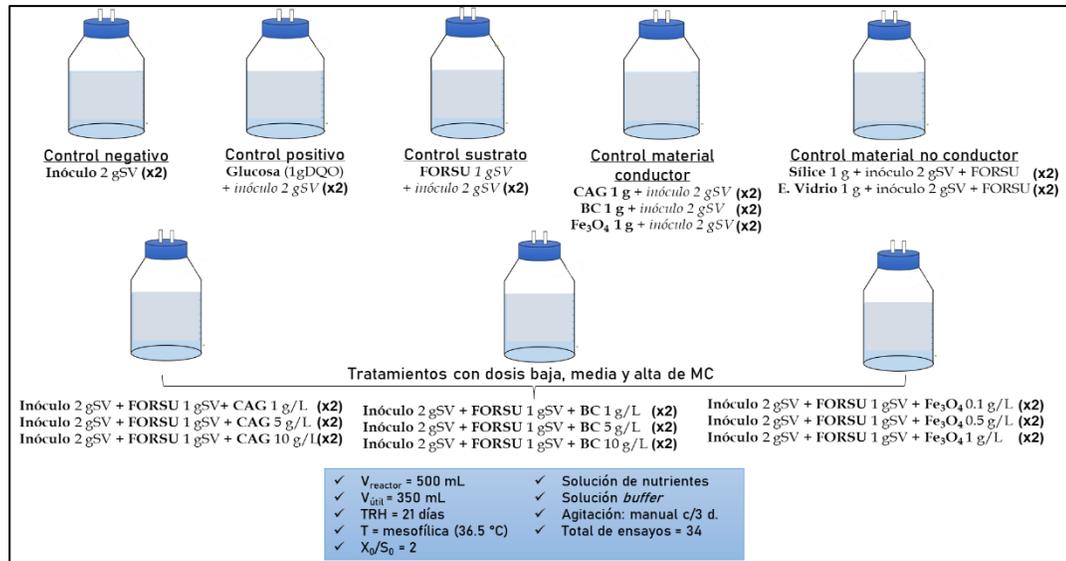


Figura 31. Configuración de las pruebas de potencial bioquímico de metano.

En pruebas experimentales preliminares se observaron incrementos en mayor o menor medida en la producción de metano con la adición de los tres materiales conductores. De tal forma que era imperativo identificar si dicho aumento correspondía a un mayor contenido de sólidos volátiles susceptibles de biodegradación dentro del reactor, o, dicho de otra forma, verificar si los microorganismos utilizaban los MC como fuente de carbono. La caracterización del perfil de sólidos de los tres MC se mostró previamente en la Tabla 10.

Cabe destacar que a pesar de que dos de los tres materiales poseen una cantidad importante de sólidos volátiles: 61.3%, 71.6% y 5.5% para CAG, BC y Fe_3O_4 , los controles de cada material tienen una pequeña variación en dicho volumen respecto al control endógeno con un volumen acumulado de metano de 8.4 mLN, siendo la diferencia de 0.2, 1.7 y 13.2 mLN para CAG, BC y Fe_3O_4 respectivamente.

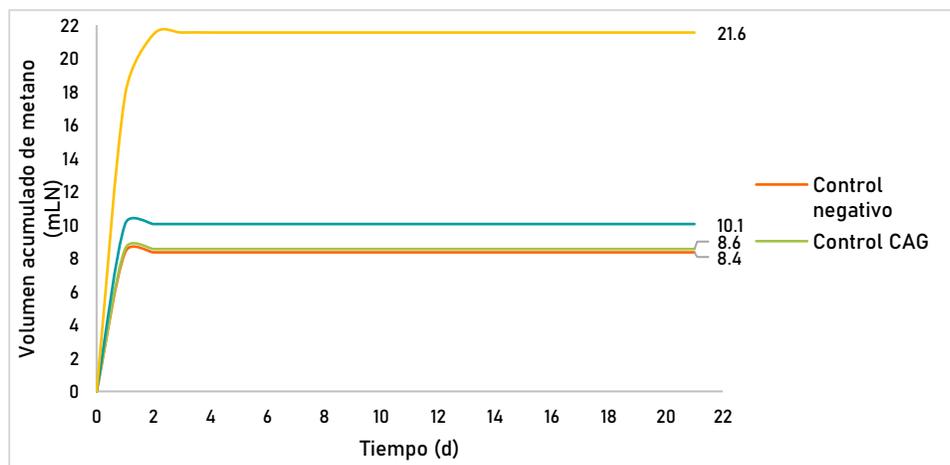


Figura 32. Potencial bioquímico de metano del control negativo y los controles de MC.

Lo anterior pone en evidencia, que ni el carbón activado ni el biocarbón son degradados en los reactores anaerobios. Esto es porque están constituidos de macromoléculas complejas y a pesar del proceso térmico de pirólisis que se empleó para fabricarlos tienen una gran resistencia a la degradación química y microbiana, esto de alguna forma ya había sido reportado por León-García *et al.* (2007) y Saquing *et al.* (2016). Estos materiales carbonosos (CAG y BC) se consideran recalcitrantes con una alta estabilidad y baja movilidad debido al gran contenido de sustancias húmicas que posee, de ahí que su permanencia en suelos y sedimentos sea prolongada, hasta 500 años (Stevenson, 1994) y su uso se haya extendido a un sinnúmero de sistemas de biorremediación.

En lo que concierne a la magnetita, a pesar de que, de acuerdo con el perfil de sólidos ésta sólo contiene un 5.5% de sólidos volátiles, la diferencia de volumen acumulado con respecto al control es de 13.2 mLN, y aunque es una cantidad muy pequeña, la expectativa era que fuese éste el material que sufriera menos cambios al compararlo con la producción endógena del inóculo. Esto podría atribuirse a dos hipótesis: la primera, a una sobreestimación en la producción debido a la adición de mayor cantidad de sólidos volátiles del inóculo ya que la rápida sedimentabilidad del lodo anaerobio granular dificulta su manejo y homogeneidad. Sin embargo, esta posibilidad se minimiza ya que en los duplicados la desviación estándar del volumen último acumulado es de apenas ± 0.2 . La otra posible causa es que como el inóculo posee bacterias de la familia *Geobacteraceae* y éstas son reductoras de Fe (III), transformen el hierro presente en la magnetita liberando electrones que bioestimulen la DIET en el propio inóculo. Además, a pesar de que el lodo anaerobio granular es un inóculo con muy baja producción endógena aun cuando no se somete a una preincubación, es posible que en él exista humus como sustrato residual que ya se ha dicho es muy recalcitrante y puede tener actividad catalítica con diferentes óxidos metálicos tal es el caso, nuevamente, de la magnetita (Lovley *et al.*, 1999).

Aunado al control negativo que se hace necesario para determinar la producción neta o específica inherente a la masa de sólidos volátiles del sustrato, se incorporó también un control positivo. En este caso, utilizando como sustrato ideal la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) en una concentración de 1 g_{DQO} cuya estequiometría y concentración corresponde a una producción teórica de metano de 350 mL/g_{DQO} (Júnior *et al.*, 2016). Este control positivo con un sustrato estándar tiene la finalidad de servir como indicador de la buena calidad del inóculo y en el presente trabajo tiene una producción de metano de 331.7 mLN/g_{DQO}.

Los otros dos controles con materiales no conductores se sometieron a las pruebas de potencial bioquímico de metano (Figura 33) con el propósito de verificar si el incremento en la producción de metano con los materiales conductores se podría deber a que su morfología microporosa, constituye para los microorganismos una matriz

inmovilizadora y que a su vez, favorece la conformación de gránulos, los cuales según la literatura, propician los mecanismos de transferencia mediada y directa de electrones interespecies. En este trabajo se utilizaron como controles de materiales no conductores dos elementos: uno adsorbente con morfología porosa, y uno no adsorbente con morfología lisa, sílice gel (dióxido de silicio) y esferas de vidrio respectivamente, registrando 494.8 y 479.9 mLN/gSV respecto a una producción de 475.2 mLN/g_{SV} del control de FORSU, esto es, una diferencia de 4.1 y 0.9%.

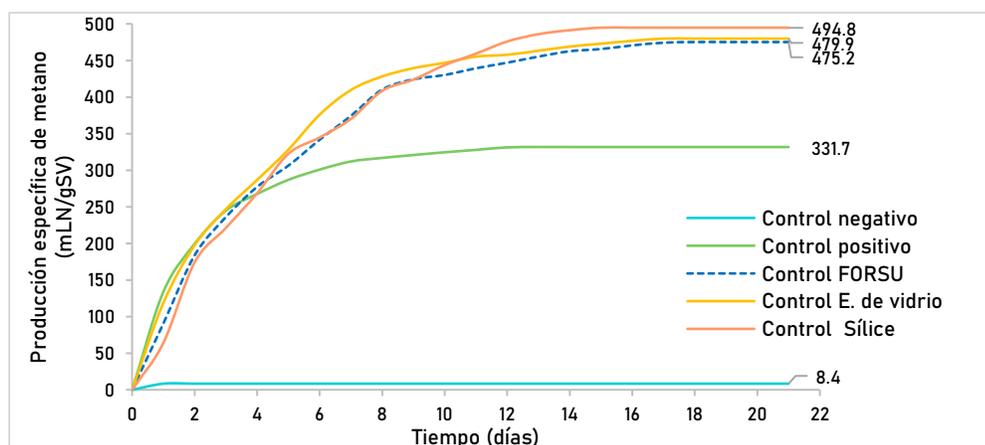


Figura 33. Potencial bioquímico de metano de los controles negativo, positivo, FORSU y materiales no conductores.

En este sentido, existen investigaciones en las cuales se concluye que la conductividad del material tiene una función importante para facilitar el fenómeno de DIET en entornos naturales (Kato *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015). Además, algunos trabajos como el de Liu *et al.* (2012) donde se utilizaron cuentas de vidrio de diámetros entre 0.1 y 1.5 mm como control no conductor, han concluido que la unión de los microorganismos a estos materiales no estimula la DIET, aunque sí favorece la formación de biopelículas.

En contraste, una investigación de Zhang *et al.* (2018b) donde se probaron biocarbones con diferentes conductividades concluyó que la conductividad eléctrica del material no es el factor crítico o que tiene mayor correlación para promover el metabolismo sintrófico. Además de la conductividad, existen otras propiedades en los materiales carbonosos que podría tener una mayor influencia sobre la bioestimulación, como es la presencia de moléculas redox (Klöpffel *et al.*, 2014). Recientemente Wang *et al.* (2022b) también llegaron a la conclusión de que el volumen total de poros y la capacidad de adsorción del biocarbón son los factores determinantes para la mejora del proceso y no la conductividad eléctrica ni el fenómeno DIET asociado, derivando su adición en una mejora en la estructura y actividad de la comunidad microbiana.

En cuanto a las tres dosis (baja, media y alta) del carbón activado granular, biocarbón y magnetita, la Figura 34, muestra que seis de los tratamientos estuvieron por encima del control de FORSU, siendo la magnetita la que obtuvo los mejores resultados al tener sus tres dosis, incrementos en el rendimiento respecto al control, además destaca en segundo lugar la dosis más baja de biocarbón (1 g/L). Por el contrario, tres tratamientos bajaron su rendimiento, siendo el CAG, en sus dosis media y alta y el biocarbón en su dosis más alta los que presentaron menor producción específica de metano que el control de FORSU sin materiales conductores. A continuación, en la Tabla 12, se resumen los incrementos y decrementos de cada ensayo en términos de mLN/gSV y % del rendimiento de metano con respecto al control de FORSU.

Tabla 12
Resultado del PBM de los materiales conductores a distintas dosis

Tratamiento	Variación del rendimiento de metano	
	mLN CH ₄ /gSV	%
Fe ₃ O ₄ 0.1 g/L	↑ 143.1	↑ 30.1
BC 1 g/L	↑ 96.1	↑ 20.3
Fe ₃ O ₄ 0.5 g/L	↑ 52.5	↑ 11.0
Fe ₃ O ₄ 1 g/L	↑ 49.3	↑ 10.4
BC 5 g/L	↑ 28.7	↑ 6.0
CAG 1 g/L	↑ 12.8	↑ 2.7
Control FORSU		
BC 10 g/L	↓ 50.8	↓ 10.7
CAG 5 g/L	↓ 52.6	↓ 11.0
CAG 10 g/L	↓ 62.8	↓ 13.2

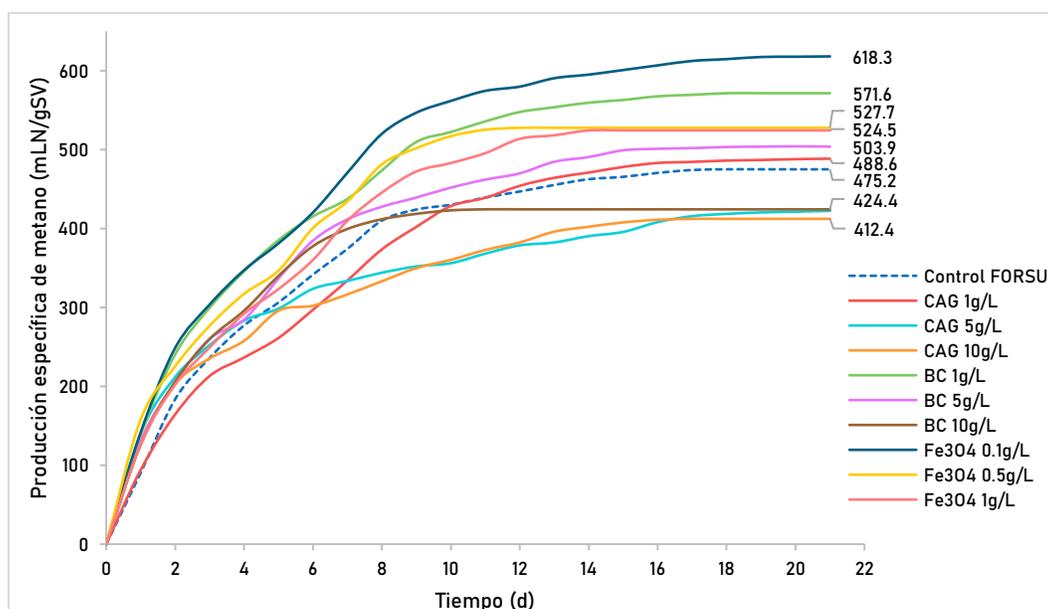


Figura 34. Potencial bioquímico de tipo y dosis de MC.

En este experimento se logró la mejor respuesta en el rendimiento de metano con la dosis más baja de magnetita (0.1 g/L), produciendo 618.3 mLN/g_{SV}, es decir, 30.1% más metano que el control de FORSU. La literatura ha reportado incrementos de entre 25 y 44% del rendimiento de CH₄ con sustratos simples como butirato (5 g Fe₃O₄/L) y propionato (10 mg Fe₃O₄/L) respectivamente (Zhao *et al.*, 2016; Jing *et al.*, 2017), donde, como en el presente trabajo se evidencia un mejor resultado a dosis más bajas. En otro trabajo reciente (Aguilar-Moreno *et al.*, 2020) donde el estiércol de aves se sometió a degradación anaerobia utilizando nanopartículas de magnetita como bioestimulante, se identificó un incremento en la producción de metano del 73.9% comparado con el control, habiendo probado tres dosis (20, 40 y 60 mg/L). En este caso también la dosis más baja fue la que logró la mejora antes mencionada.

Por otra parte, en lo que corresponde a los posibles mecanismos que propician una mejora del proceso de DA con magnetita, Kato *et al.* (2012) sugirieron que la transferencia de electrones de célula a célula puede medirse ya que es un óxido de hierro conductor que mejora la metanogénesis a través de una relación eléctrica sintrófica entre *Geobacter* y *Methanosarcina*. Liu *et al.* (2015) deducen que las partículas de hierro se adhieren a los conductores pili y principalmente compensan el requerimiento de citocromos de tipo C. Por su parte, Zhang *et al.* (2015) y Lu *et al.* (2017) argumentan que la adición de magnetita en concentraciones de entre 10 y 100 mg/g_{ST} aumenta la producción de la coenzima F420 en un 11%, esta coenzima está involucrada en reacciones redox de los organismos metanógenos. Mientras que, más recientemente Fu *et al.* (2019) informaron un enfoque diferente en donde plantean que la magnetita puede actuar como “lanzadera” de electrones realizando una función similar a la proteína de transporte metanofenazina unida a la membrana celular.

En el caso del biocarbón, su dosificación también mostró variaciones importantes, puesto que la más baja (1 g/L) tuvo una mejora del rendimiento de metano de 20.3% con respecto al control. De acuerdo con Li *et al.* (2019) cuando de biocarbón se trata, el factor que tiene mayor influencia es su dosificación y aunque el BC derive de la misma materia prima e iguales condiciones de pirólisis puede generar efectos adversos a diferentes dosis de aplicación, generalmente las dosis altas de más del 20% en función del peso inducen resultados negativos sobre el rendimiento del proceso. Shen *et al.* (2020) mencionan también que una dosis adecuada (por ejemplo, de biocarbón de paja del 2%) mejoró el rendimiento de metano, pero la adición excesiva (4%) podría inhibir la DA, y, como se puede observar en la Figura 34, con la dosis más alta de 10 g/L, el rendimiento de metano disminuye en un 10.7% con respecto al control.

Lo anterior puede atribuirse a que la hidrólisis y la acidogénesis-acetogénesis se aceleran en un grado insoportable por un BC excesivo que se acumula en forma

intermedia para inhibir la metanogénesis, esto se puede notar en la misma Figura 34 donde los tratamientos con BC tienen una producción acelerada durante los primeros 5 días para posteriormente desacelerarse o incluso parar, en la dosis media y alta respectivamente. Algunos trabajos (Li *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022b) han mostrado que el BC excesivo puede destruir o cambiar drásticamente la diversidad de microorganismos metanogénicos.

Finalmente, analizando los resultados del carbón activado granular, se puede notar que de igual forma que los otros materiales, la dosis más baja obtuvo la mayor mejora, aunque la producción específica de metano sólo incrementó 28.7 mLN/g_{SV}, es decir, 6% comparado con el control y la dosis media y baja (5 y 10 g/L) presentaron el mayor decremento en la totalidad de los experimentos, 11 y 13.2% respectivamente.

En contraste con este trabajo, hay investigaciones como la de Yang *et al.* (2017) que han correlacionado un mayor rendimiento con una mayor dosis de CAG, pues éste se incrementó en 1.4%, 2.6%, 14.6% y 17.4% con una dosis de 0.5, 1, 2 y 5 g/L respectivamente, esto para digestión de lodos de PTAR. En otro estudio de Yan *et al.* (2020) para explorar la posible correlación entre la dosificación de carbón activado en polvo (CAP) y el rendimiento de la DA, se analizaron cinco conjuntos de lotes dosificados con diferentes concentraciones de CAP (es decir, 1 g/L, 0.5 g/L, 0.25 g/L y 0.125 g/L) encontrando que la dosis más alta tiene una mejora en el rendimiento de 134% y la dosis más baja logra mejorar en un 88% el rendimiento y aún con la dosis más baja la actividad de hidrólisis estimulada fue efectiva, aunque la tasa de metanogénesis se redujo en un 80.3% en comparación con el caso de 1 g / L.

Aunque existen pocos estudios que relacionen la dosis de CAG y su rendimiento en el proceso, de manera general la tasa de generación y la producción total de metano se correlacionan positivamente con la concentración de este material conductor, situación que no ocurrió y fue más bien opuesta en este estudio. Es por ello por lo que el carbón activado granular vuelve a ser objeto de estudio en el experimento que se muestra en la sección 7.5, en donde, además de modificar el rango de dosis a probar, se incorpora en el análisis el factor del tamaño de partícula.

A continuación, se presenta el análisis estadístico concerniente al experimento que involucró los tres materiales conductores con sus tres niveles de dosificación. El análisis de varianza unidireccional incluye un factor categórico (tipo de tratamiento) y una respuesta continua (rendimiento de metano), con el fin de determinar si las medias de dos o más grupos son diferentes con respecto al control.

7.4 Análisis estadístico

Antes de llevar a cabo el análisis de varianza se determinó si los datos siguen una distribución normal, para lo cual se analizaron los gráficos de residuos y la prueba de normalidad. La Figura 35 muestra a través de la gráfica de probabilidad normal, el histograma y los residuos versus valores ajustados y orden de los datos, que éstos se encuentran distribuidos normalmente, no existen valores atípicos y, además, no presentan sesgos. Esto se pone en evidencia también con la prueba de probabilidad normal (Figura 36) donde las hipótesis son las siguientes:

H_0 : Los datos siguen una distribución normal.

H_1 : Los datos no siguen una distribución normal.

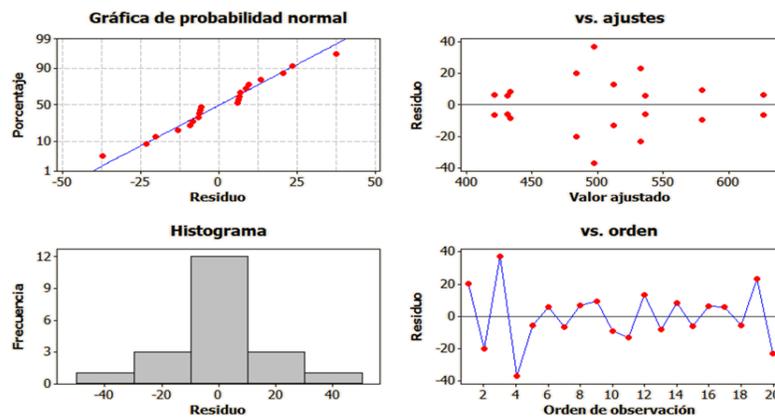


Figura 35. Gráficas de residuos para rendimiento de metano.

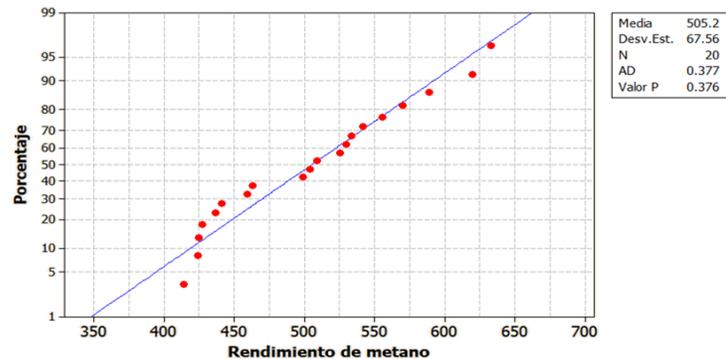


Figura 36. Gráfica de distribución normal para rendimiento de metano.

Se puede notar en la Figura 36 que los puntos de los datos están relativamente cerca de la línea de distribución normal ajustada. Asimismo, el valor P (0.376) es mayor que el nivel de significancia de 0.05, por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y no hay suficiente evidencia para concluir que los datos no siguen una distribución normal. Adicionalmente, se realizó la prueba de Bartlett (Figura 37) para comprobar si el grupo de muestras poseen varianzas iguales a un nivel de confianza del 95%, es decir, si existe homocedasticidad, para la cual se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Todas las varianzas son iguales.

H_1 : No todas las varianzas son iguales.

Y, por ende, debido a que el valor P (0.756) de la prueba de Bartlett es mayor que el nivel de significancia de 0.05, se tiene la seguridad de que se cumple el supuesto de igualdad de varianzas.

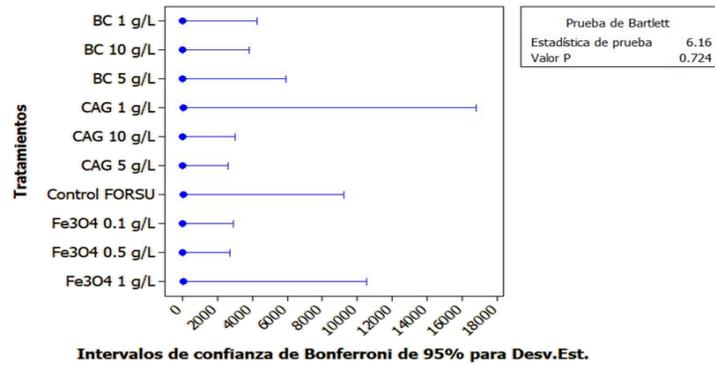


Figura 37. Prueba de igualdad de varianzas para rendimiento de metano.

De tal manera que una vez que se constató que los datos siguen una distribución normal con varianzas iguales, se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) unidireccional que se muestra en la Tabla 13, teniendo las siguientes hipótesis:

H_0 : Todas las medias de la población son iguales.

H_1 : Al menos una de las medias de la población es diferente.

Como se puede observar, con un coeficiente de determinación (R^2) de 93.48%, el valor P en este caso es menor que el nivel de significancia (0.05), entonces es posible concluir que al menos una media para la variable del rendimiento de metano es diferente, y para analizar más a detalle las diferencias entre medias específicas, se muestra a continuación la comparación múltiple *post hoc* con el método de Dunnett.

Tabla 13

Análisis de varianza unidireccional para rendimiento de metano

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamientos	9	81075	9008	15.92	0.000
Error	10	5658	566		
Total	19	86733			

S = 23.79 $R^2 = 93.48\%$ R^2 (ajustado) = 87.61%

Como complemento gráfico al ANOVA, se presenta en la Figura 38 el análisis de medias. La gráfica muestra cada una de las medias de los distintos tratamientos con sus respectivos materiales conductores y dosis, siendo la línea verde la media general y las líneas rojas los límites de decisión. Debido a que hay varios puntos que se

encuentran fuera de los límites de decisión (BC 1 g/L y Fe_3O_4 0.1 g/L fuera del límite superior y BC 10 g/L, CAG 10 g/L y CAG 5 g/L fuera del límite inferior), existe evidencia de que la media de los tratamientos representada por esos puntos es significativamente diferente de la media general cuando $\alpha=0.05$.

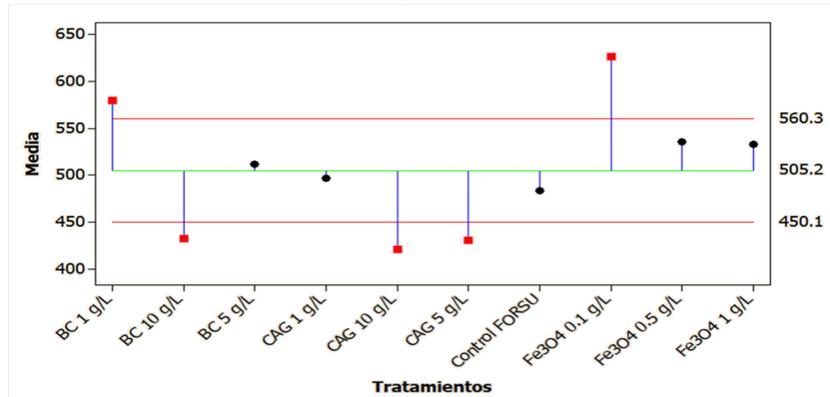


Figura 38. Comparación de análisis de medias para rendimiento de metano.

Dado que se tienen pocas observaciones por cada tratamiento y es importante evaluar el efecto de cada observación, se utilizó la gráfica de valores individuales presentada en la Figura 39 para analizar la distribución de datos en cada tratamiento. Los puntos rojos muestran el valor de cada observación por material conductor y dosis mientras que los símbolos azules representan la media de cada tratamiento. De tal forma que es posible notar que el valor de rendimiento de metano es más alto con el tratamiento de Fe_3O_4 en su dosis más baja (0.1 g/L), además, los datos de la mayoría de los tratamientos presentan aproximadamente la misma dispersión y a pesar de que el tratamiento con CAG 1 g/L presenta la mayor dispersión, no hay puntos que sean considerados valores atípicos.

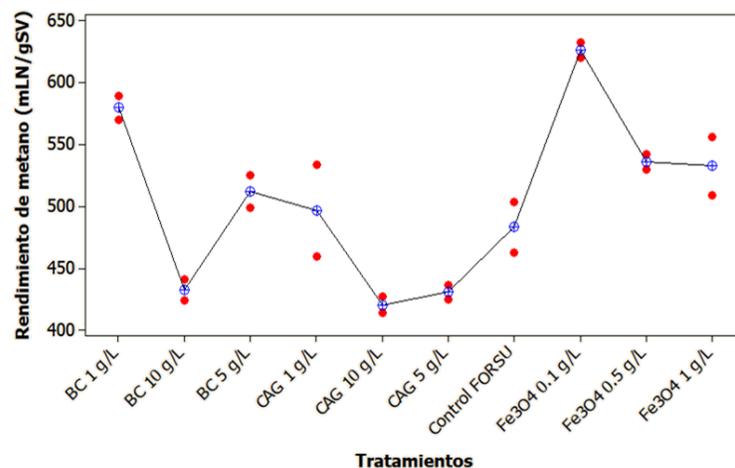


Figura 39. Gráfica de valores individuales para rendimiento de metano Vs. tratamientos

Debido a que el ANOVA mostró que al menos una media es diferente, a continuación, se analiza mediante el método de comparación de Dunnett si alguno de los tratamientos con los diferentes MC y dosis tiene un rendimiento de metano significativamente diferente del control de FORSU. Los intervalos de confianza simultáneos de Dunnett se muestran de forma numérica y gráfica respectivamente en la Tabla 14 y en la Figura 40.

Tabla 14
Intervalos simultáneos de Dunnett

Tratamientos	Inferior	Centrada	Superior
BC 1 g/L	19.3	96.45	173.62
BC 10 g/L	-127.9	-50.75	26.42
BC 5 g/L	-48.5	28.70	105.87
CAG 1 g/L	-63.8	13.40	90.57
CAG 10 g/L	-140.0	-62.80	14.37
CAG 5 g/L	-129.8	-52.60	24.57
Fe ₃ O ₄ 0.1 g/L	65.9	143.10	220.27
Fe ₃ O ₄ 0.5 g/L	-24.6	52.55	129.72
Fe ₃ O ₄ 1 g/L	-27.9	49.30	126.47

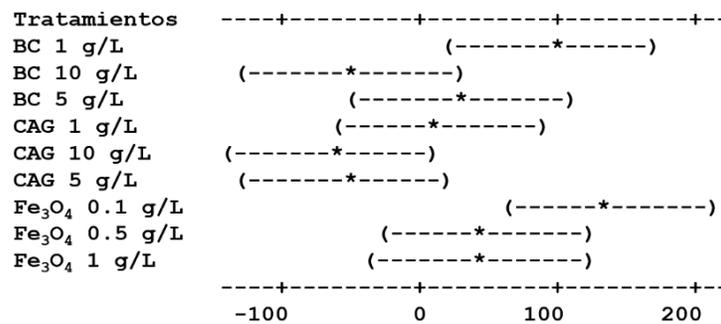


Figura 40. Intervalos de confianza simultáneos de Dunnett.

Tanto en la tabla como en la figura anterior se puede observar que los intervalos de los tratamientos BC 10 g/L, BC 5 g/L, CAG 1 g/L, CAG 10 g/L, CAG 5 g/L, Fe₃O₄ 0.5 g/L y Fe₃O₄ 1 g/L contienen al cero, por lo tanto, para ellos no existe diferencia en el rendimiento de metano cuando se comparan con el control de FORSU. Por otra parte, no existen intervalos que contengan solamente números negativos, esto significa que ningún tratamiento tiene un rendimiento estadísticamente significativo menor que el grupo control. Finalmente, dos de los nueve tratamientos tuvieron sus intervalos de confianza solamente abarcando números positivos, esto significa que tanto BC 1 g/L como Fe₃O₄ 0.1 g/L producen un rendimiento de metano significativamente mayor que el control de FORSU, esto se confirma también con los valores P de las pruebas simultáneas de Dunnett que se recopilan en la Tabla 15 en donde únicamente para estos dos tratamientos se tienen valores P inferiores a nivel de significancia que es de 0.05.

Tabla 15
Pruebas simultáneas de Dunnett

Tratamientos	Diferencia de medias	Valor T	Valor P ajustado
BC 1 g/L	96.45	4.055	0.0141
BC 10 g/L	-50.75	-2.134	0.2716
BC 5 g/L	28.70	1.207	0.7830
CAG 1 g/L	13.40	0.563	0.9952
CAG 10 g/L	-62.60	-2.640	0.1284
CAG 5 g/L	-52.60	-2.211	0.2432
Fe ₃ O ₄ 0.1 g/L	143.10	6.016	0.0009
Fe ₃ O ₄ 0.5 g/L	52.55	2.209	0.2439
Fe ₃ O ₄ 1 g/L	49.30	2.073	0.2957

7.5 Evaluación de la influencia del tamaño de partícula y la dosis

Derivado de las pruebas experimentales abordadas en la sección 7.4, se planteó un experimento en el que se pudiera analizar la influencia del tamaño de partícula del MC de manera paralela con el factor dosis, mediante un diseño factorial 3², ya que de acuerdo con Pan *et al.* (2019) no solo la dosis de material conductor influye, sino también las propiedades y el tamaño de partícula. En este sentido se prevé que, cuanto menor sea el tamaño de partícula del biocarbón, mayor será la producción de metano.

Como se aprecia en la gráfica del potencial bioquímico de metano (Figura 41), el tamaño de partícula más pequeño (malla 40) combinado con la dosis de CAG más bajo (0.1 g/L) propician el mayor rendimiento de metano (565 mLN/gsv), lo que representa un 18% más que el control de FORSU. Existe una clara tendencia a reducirse el rendimiento de metano a medida que se combinan los niveles altos de ambos factores, sin embargo, debido a la similitud de los datos, estos se analizan nuevamente mediante el software Minitab para hacer evidente las diferencias estadísticamente significativas.

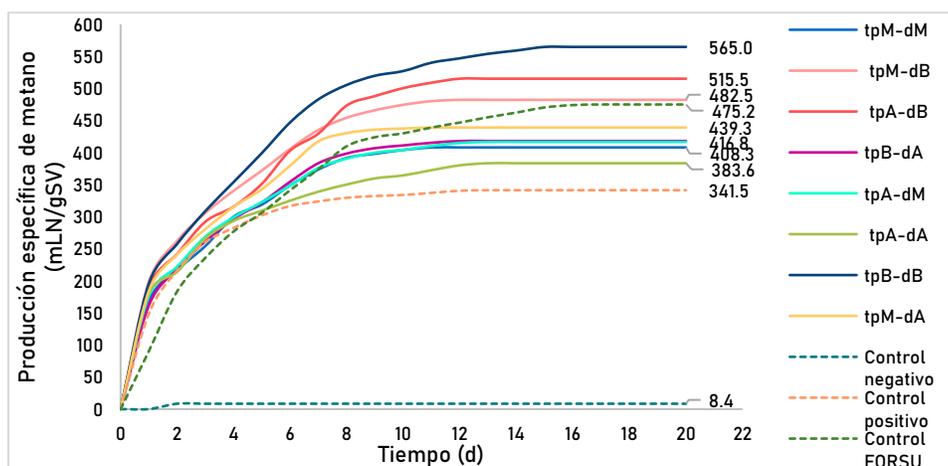


Figura 41. Potencial bioquímico de metano para evaluar influencia del tamaño de partícula y dosis.

7.5.1 Análisis factorial y superficie de respuesta

Una vez realizadas las corridas experimentales, se comprobaron los supuestos de distribución normal y homocedasticidad y se obtuvo el análisis de varianza (Tabla 16) utilizando la suma de cuadrados Tipo III, la cual cuantifica el incremento en la suma de cuadrados del error que ocurriría si cada efecto es eliminado del análisis, además, se determinó la contribución marginal de cada efecto.

La tabla ANOVA, con un coeficiente de determinación (R^2) de 91.18% y un nivel de confianza del 95% muestra un buen ajuste del modelo lineal general a los datos. Los valores P prueban que el tamaño de partícula de CAG de endocarpio de coco, por sí solo no es un factor que tenga una significancia estadística, ya que este valor es mayor que 0.05, la dosis por su parte es un factor con significancia, y cuando interaccionan ambos factores: tamaño de partícula-dosis, también existe un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Tabla 16

Análisis de varianza para rendimiento de metano con tamaño de partícula y dosis de CAG utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Efectos principales						
A: Tamaño de partícula	2	3699.2	3699.2	1849.6	4.07	0.055
B: Dosis	2	31233.2	31222.2	15616.6	34.39	0.000
Interacciones						
A*B	4	7297.8	7297.8	1824.5	4.02	0.039
Error	9	4087.2	4087.2	454.1		
Total	17	46317.4				

S = 21.3104 $R^2 = 91.18\%$ R^2 (ajustado) = 83.33%

Debido a que el ANOVA no determina completamente cuáles son los efectos que tienen mayor influencia sobre la variable de respuesta, la Figura 42 presenta el gráfico de efectos principales, en el cual se observa que, de acuerdo con la media del rendimiento de metano, a un menor tamaño de partícula (malla 40/0.420 mm) y una dosis más baja (0.1 g/L) se tiene mayor efecto sobre el rendimiento de metano cuando se utiliza carbón activado. Sin embargo, resulta distinto a lo reportado en la literatura que los tamaños de partícula bajo y alto tengan una respuesta similar y que no exista un incremento inversamente proporcional a medida que disminuye el tamaño de partícula. De esta gráfica también se puede deducir que, de los dos factores, como lo constata el análisis de varianza, la dosis de CAG es el factor con mayor efecto.

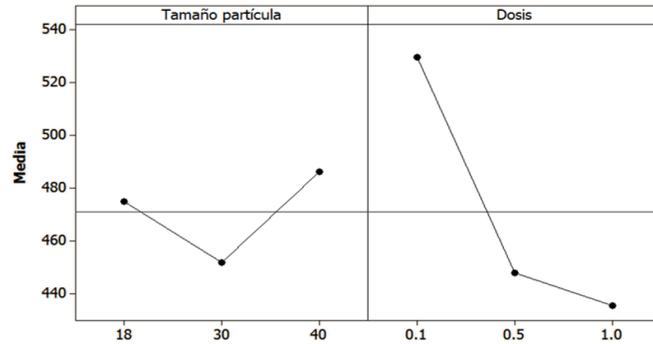


Figura 42. Gráfica de efectos principales para rendimiento de metano.

En la Figura 43 se muestra el rendimiento de metano medio versus el tamaño de partícula para cada una de las tres dosis de CAG. Las líneas no paralelas en la gráfica indican los efectos de interacción entre el tamaño de partícula y la dosis. Este efecto de interacción indica que la relación entre el tamaño de partícula y el rendimiento de metano depende del valor de la dosis. Se puede apreciar que en ninguno de los factores categóricos las líneas son totalmente paralelas entre sí, lo cual pone en evidencia que en mayor o menor medida existe una interacción entre el tamaño de partícula y la dosis de material conductor, lo cual se reiteró en la interacción A*B mediante el valor P del análisis de varianza mostrado en la Tabla 16.

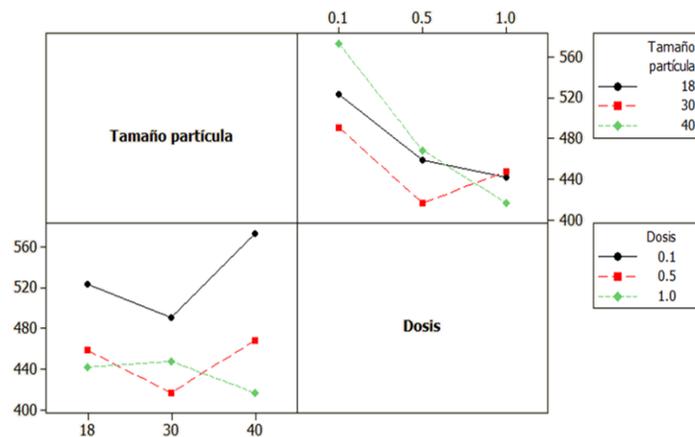


Figura 43. Gráfica de interacción para rendimiento de metano.

Finalmente, para explorar la relación potencial entre las variables, las siguientes gráficas de contorno y de superficie (Figura 44 y 45 respectivamente) muestran de manera bidimensional y tridimensional cómo el tamaño de partícula (X) y la dosis de MC (Y) afectan el rendimiento de metano. Las regiones más oscuras identifican los valores más altos para la variable de respuesta. Los niveles de contorno revelan un pico centrado en la malla 40 (tamaño de partícula) y 0.1 g/L (dosis) pues los valores de rendimiento de metano en esta región pico son superiores a 540 mLN/g_{SV}.

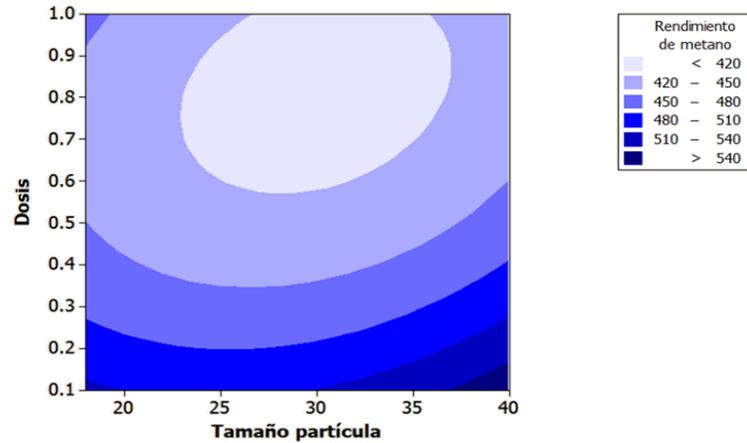


Figura 44. Gráfica de contorno de rendimiento de metano Vs. Tamaño partícula-dosis.

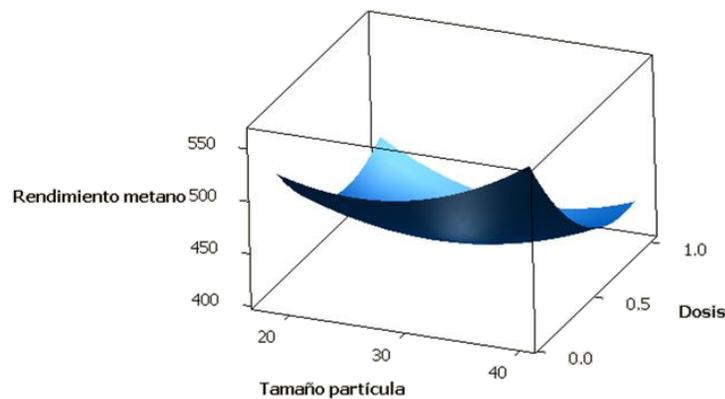


Figura 45. Gráfica de superficie de rendimiento de metano Vs. Tamaño partícula-dosis.

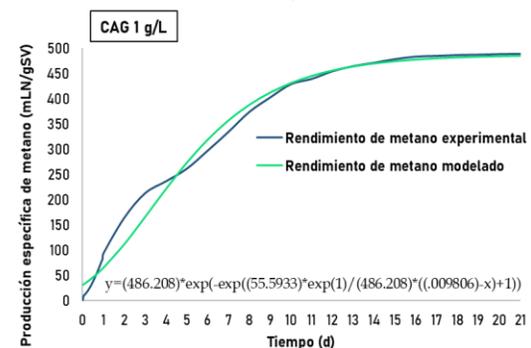
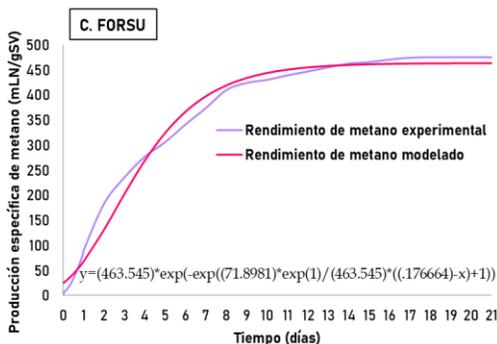
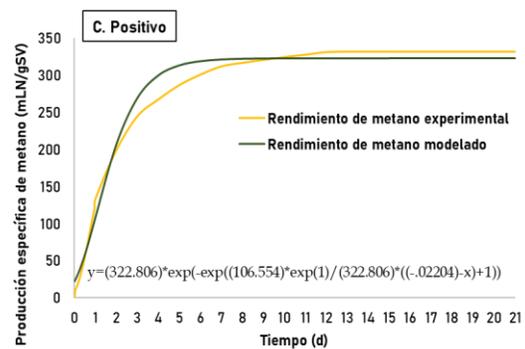
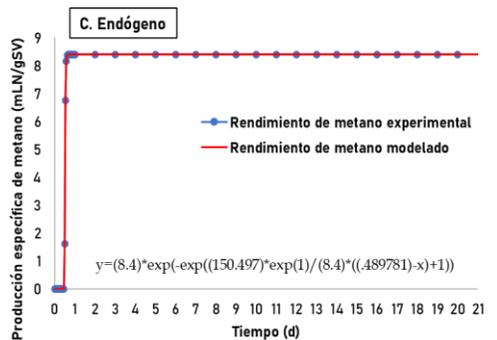
7.6 Modelo modificado de Gompertz

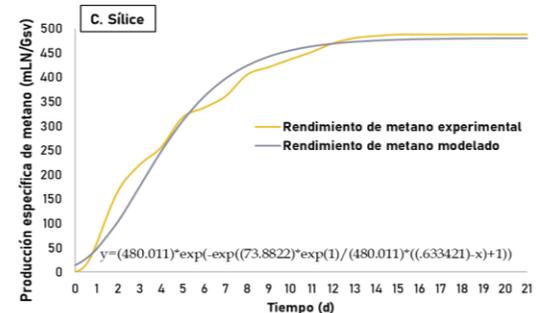
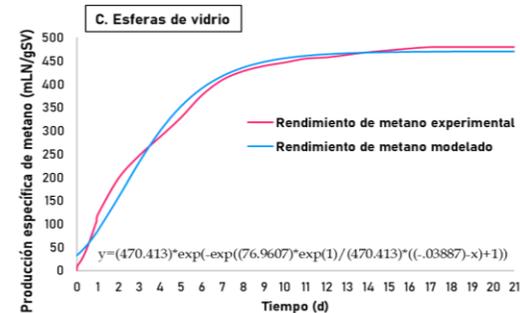
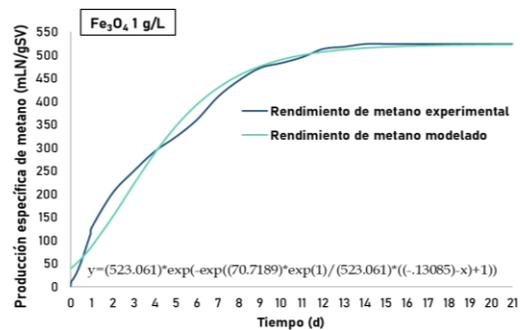
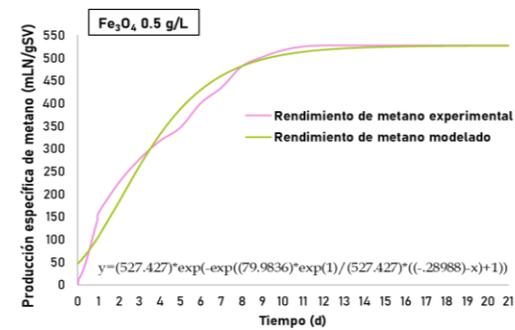
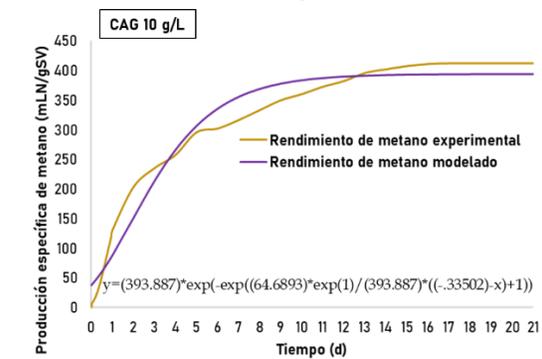
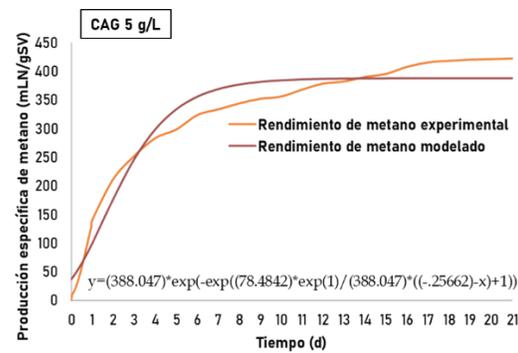
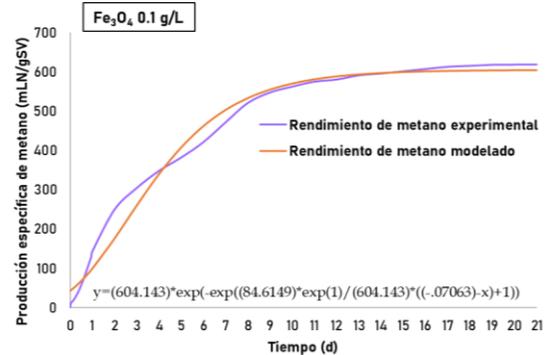
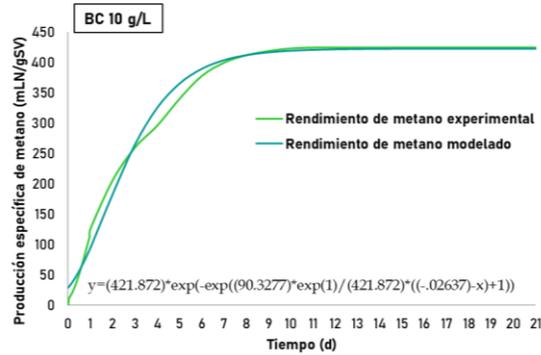
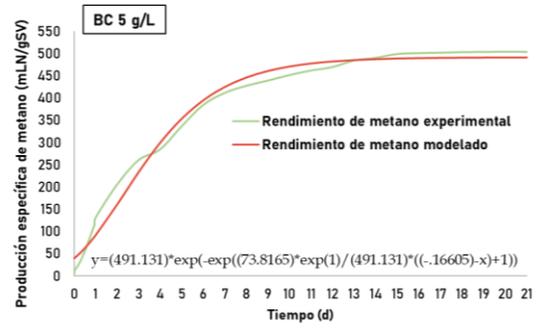
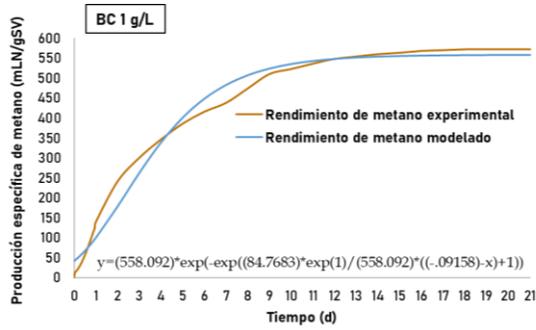
Los datos experimentales de las secciones 7.4 y 7.5 se ajustaron bien al modelo modificado de Gompertz con un coeficiente de correlación (R^2) de entre 0.97 y 0.99. Las gráficas de los datos predichos por el modelo y los observados en la etapa experimental se presentan junto a su ecuación en la Figura 46.

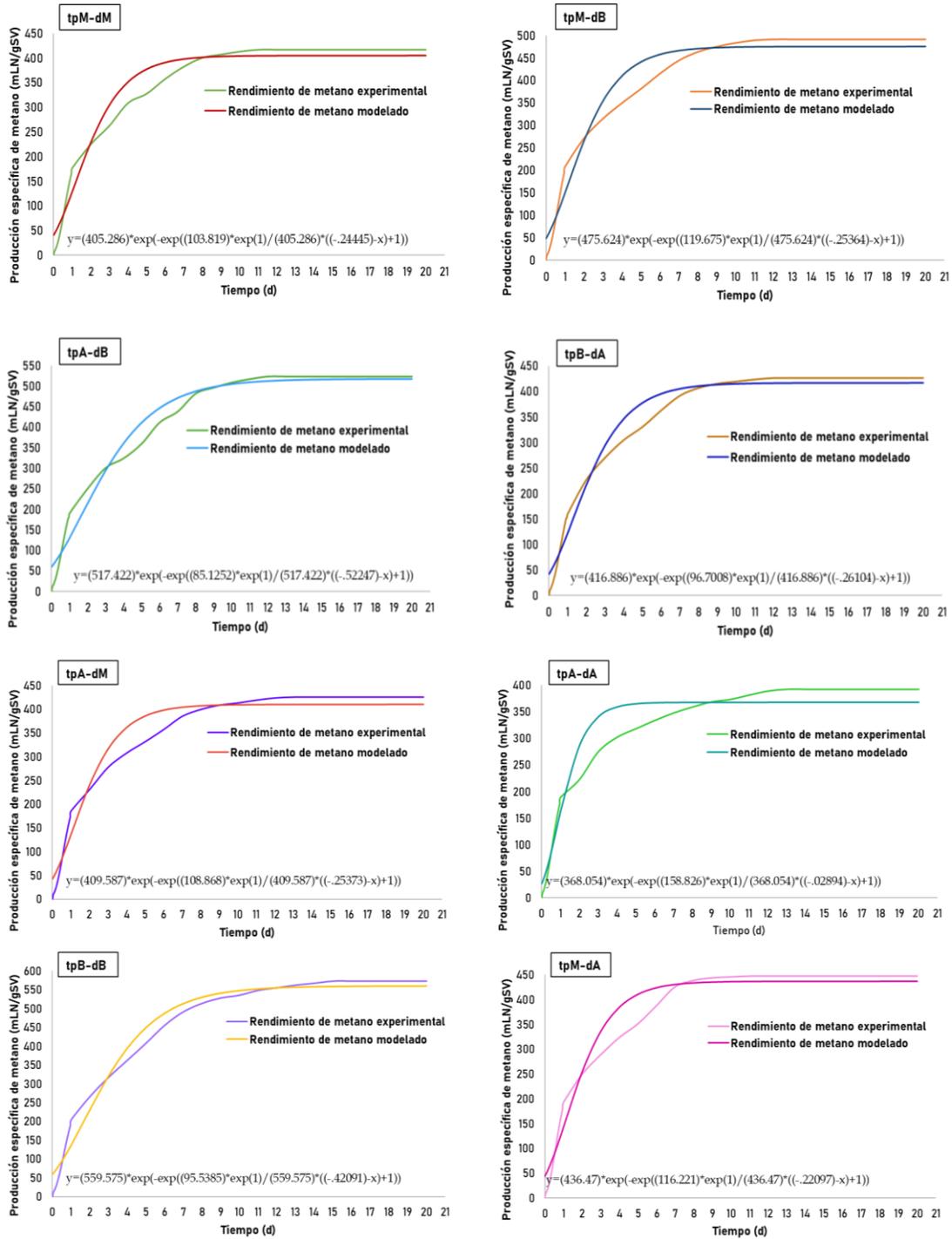
La duración de la fase de latencia es un factor importante en la evaluación del proceso de digestión anaerobia, ya que refleja el periodo de adaptación de los microorganismos a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales para iniciar la conversión de los residuos a biogás. Sin embargo, como es posible observar en las Figuras 34 y 41 de las pruebas de potencial bioquímico de metano, para estos ensayos no es gráficamente evidente la fase de latencia, lo cual también se puede notar en la Tabla 17 a través de los valores negativos de λ , muy cercanos al cero. De acuerdo con Chu y Barnes (2016), los valores de la fase de latencia son predominantemente negativos cuando hay una tendencia al aprovechamiento inmediato de los nutrientes.

Tabla 17
Constantes cinéticas del modelo modificado de Gompertz

Tratamiento	λ (d)	$R_{m\acute{a}x}$ (mL _{CH₄} /gsv·d)	$P_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$ experimental (mL _{CH₄} /gsv)	R^2
<i>Tipo y dosis de material conductor</i>					
Control negativo	0.509	102.21	8.4	8.4	0.999
Control positivo	-0.022	106.55	322.80	331.7	0.990
Control FORSU	0.176	71.89	463.54	475.15	0.992
CAG 1 g/L	0.009	55.59	486.20	488.55	0.991
CAG 5 g/L	-0.256	78.48	388.04	422.55	0.976
CAG 10 g/L	-0.335	64.68	393.88	412.35	0.976
BC 1 g/L	-0.091	84.76	558.09	571.60	0.989
BC 5 g/L	-0.166	73.81	491.13	503.85	0.990
BC 10 g/L	-0.026	90.32	421.87	424.40	0.993
Fe ₃ O ₄ 0.1 g/L	-0.007	84.61	604.14	618.25	0.989
Fe ₃ O ₄ 0.5 g/L	-0.289	79.98	527.42	527.70	0.987
Fe ₃ O ₄ 1 g/L	-0.130	70.71	523.06	524.45	0.990
C. Esferas vidrio	-0.033	76.96	470.41	479.85	0.992
C. Sílice	0.633	73.88	480.01	487.65	0.993
<i>Tamaño de partícula y dosis de CAG</i>					
tpM-dM	-0.244	103.82	405.29	416.65	0.974
tpM-dB	-0.254	119.68	475.62	490.85	0.973
tpA-dB	-0.522	85.12	514.42	523.83	0.973
tpB-dA	-0.261	96.70	416.89	426.60	0.979
tpM-dB	-0.254	108.87	406.59	425.22	0.971
tpA-dA	-0.029	158.83	368.05	392	0.969
tpB-dB	-0.421	95.54	559.57	573.40	0.973
tpM-dA	-0.221	116.22	436.47	447.65	0.973







*tp: tamaño de partícula CAG			*d: dosis de CAG		
tpB (baja)	tpM (media)	tpA (alta)	dB (baja)	dM (media)	dA (alta)
0.420 mm	0.595 mm	1 mm	0.1 g/L	0.5 g/L	1 g/L

Figura 46. Comparación entre los datos experimentales y el modelo modificado de Gompertz para los ensayos tipo de MC-dosis y tamaño de partícula-dosis.

Además, Poschet *et al.* (2004) han indicado que no solo la cantidad de datos, sino también el posicionamiento de estos datos en el tiempo tiene una influencia sustancial en la incertidumbre de los parámetros del modelo, especialmente en la fase de latencia. En este sentido, para los modelos que incluyen la fase de latencia, la incertidumbre sobre las constantes cinéticas se puede reducir mediante un muestreo intenso durante las zonas de transición entre la fase de latencia y la fase exponencial y entre la fase exponencial y la fase estacionaria.

De tal manera que, con la finalidad de visualizar las diferencias, se realizó un acercamiento a los datos donde se sometieran al modelo de Gompertz, únicamente las producciones de metano, pero en lugar de días, estas se plasmaron en términos de las primeras 72 horas. De esta forma es posible observar diferencias entre algunos de los tratamientos con los materiales conductores con respecto al control (Tabla 18). En la Figura 47 se muestra el PBM acotado a los primeros 3 días del proceso.

Tabla 18
Fase de latencia con base en el modelo modificado de Gompertz acotado a 72 horas

Tratamiento	λ (d)	λ (h)	Diferencia Vs. C. FORSU (%)
<i>Tipo y dosis de material conductor</i>			
Control positivo	0.12	2.9	-51.7
Control FORSU	0.25	6	0
CAG 1 g/L	0.15	2.6	-40
CAG 5 g/L	0.14	3.4	-43.3
CAG 10 g/L	0.17	4	-33.3
BC 1 g/L	0.17	4	-33.3
BC 5 g/L	0.11	2.6	-56.7
BC 10 g/L	0.13	3.1	-48.3
Fe ₃ O ₄ 0.1 g/L	0.18	4.3	-28.3
Fe ₃ O ₄ 0.5 g/L	0.11	2.6	-56.7
Fe ₃ O ₄ 1 g/L	0.13	3.1	-48.3
C. Esferas vidrio	0.14	3.4	-43.3
C. Sílice	0.52	12.5	+108.3
<i>Tamaño de partícula y dosis de CAG</i>			
tpM-dM	0.14	3.4	-43.3
tpM-dB	0.15	2.6	-56.7
tpA-dB	0.13	3.1	-48.3
tpB-dA	0.13	3.1	-48.3
tpM-dB	0.13	3.1	-48.3
tpA-dA	0.13	3.1	-48.3
tpB-dB	0.13	3.1	-48.3
tpM-dA	0.15	2.6	-56.7

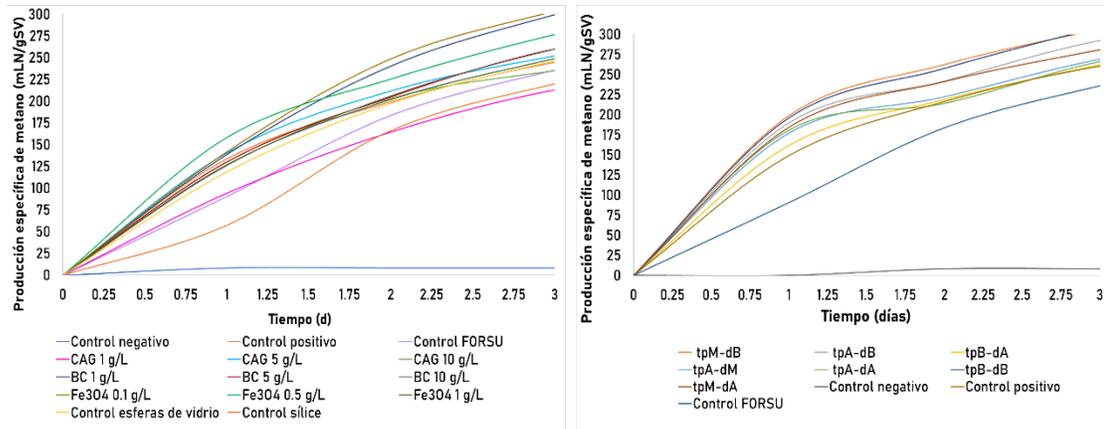


Figura 47. Potencial bioquímico de metano de los diferentes tratamientos tipo MC-dosis (izquierda) y tamaño de partícula-dosis CAG (derecha) durante los primeros 3 días.

Aunado a lo anterior, para corroborar que el hecho de acotar los datos experimentales a las primeras horas de la prueba no estuviera proporcionando un sesgo o datos erróneos del modelo, se calculó la primer derivada de la función del modelo, se trazaron a la par la función y su derivada y se identificó el punto de inflexión, tomando entonces el valor de la fase de latencia (λ) como la intersección de la tangente del punto de inflexión con la línea recta horizontal en Y_0 , mientras que la tasa de crecimiento se definió como el valor de la primera derivada de la función del modelo en el punto de inflexión ($R_{m\acute{a}x}$), dando en ambos casos los mismos resultados.

En todos los tratamientos, incluidos los controles, la fase de latencia ocurre de forma temprana llevándose a cabo en un rango de 2 a 6 horas. En este contexto, cabe señalar que algunos autores también han descrito la existencia de fases lag muy breves o incluso inexistentes con valores reportados de cero o muy cercanos a cero para λ . Esto ha sido reportado para una gran variedad de sustratos (generalmente ricos en carbohidratos) como los residuos agrícolas o la FORSU, en los que, como en este trabajo la fase exponencial da inicio alrededor de las primeras 24 horas con una producción de metano que oscila entre 60 y 200 mL/gSV durante el primer día de los ensayos, como reportan Shahriari *et al.* (2012), Kim y Kim (2017) y Muratçobanoğlu *et al.* (2020).

La fase de latencia se presenta inmediatamente después de la inoculación y de acuerdo con Rolfe *et al.*, (2012) su duración depende del estado fisiológico de las células inoculadas y de las condiciones ambientales. Liu (2017) asegura que la edad del inóculo tiene un fuerte efecto sobre la duración de la fase de latencia. Por lo general, el período de retraso aumenta con la edad del inóculo y en algunos casos, existe una edad óptima de inóculo que resulta en un período de latencia mínimo. A fin de reducir esta fase, las células deben ser jóvenes (o células de fase exponencial), activas, y el tamaño del inóculo debe ser grande (5-10% en volumen).



Con base en lo anterior, la calidad y cantidad del inóculo empleado podría sugerirse como una de las causas de la magnitud que presentó la fase de latencia en los experimentos, ya que el lodo granular anaerobio del reactor UASB de la planta cervecera que lo proporcionó, provenía de un lote relativamente joven donde las células se encontraban en replicación acelerada según la información del laboratorio de microbiología de la planta. Y, por otro lado, la relación I/S empleada en todos los experimentos fue suficientemente grande (2:1) como para evitar la inhibición por sustrato que hace aparecer al arranque de las pruebas una fase de latencia que según Cao *et al.* (2019) puede llegar a ser hasta de 52 días en sustratos como el estiércol porcino cuando esta relación es muy baja.

De acuerdo con Augustin *et al.* (2000) y Liu (2017) cuando el inóculo se agrega en bajas concentraciones y tiene una fracción baja de células viables, puede ocurrir lo que se conoce como una fase pseudolag, que no es el resultado de una baja adaptación, sino del tamaño de un inóculo pequeño o en mal estado, además, el déficit de algunos nutrientes, factores de crecimiento y soluciones amortiguadoras necesarias, también pueden causar una larga fase de latencia, lo que permite inferir que las condiciones nutricionales iniciales que se garantizaron en el reactor, aunado al *buffer* de fosfatos, resultó esencial para tener una fase de latencia tan reducida.

Un estudio realizado por Madar *et al.* (2013) que tiene relación directa con la cantidad de células que se agregan por medio del inóculo, reveló que la expresión génica durante la fase de latencia temprana prioriza las enzimas para utilizar la fuente de carbono sobre los genes responsables de la acumulación de biomasa, esto mediante un mecanismo celular, descrito hace relativamente poco tiempo, como *quorum sensing* o percepción de quórum en el que debido a que las poblaciones bacterianas se comportan como un grupo y no solo como individuos aislados, cuando están en cantidad suficiente, se activan los mecanismos de expresión génica a partir de las moléculas señal llamadas autoinductores que aumentan su concentración en función de la densidad celular y permiten al consorcio realizar múltiples actividades metabólicas en un tiempo muy breve.

Existen evidencias que muestran que las bacterias en fase de latencia son metabólicamente activas desde los primeros minutos de inoculación, por ejemplo, Rolfe *et al.* (2012), identificaron mediante análisis genómicos y fisiológicos funcionales en diferentes especies bacterianas, que la adaptación puede empezar incluso desde los cuatro minutos posteriores a la inoculación del medio, confirmándose esto con la regulación positiva de cientos de genes que codifican procesos como la transcripción, traducción, ensamblaje de proteínas, metabolismo de nucleótidos, biosíntesis de



moléculas, entre otras. Es importante señalar que, en esta misma investigación se identificaron como genes principales regulados al alza durante la fase de latencia aquellos involucrados con el transporte de metales y la formación de grupos de hierro y azufre, lo que sugiere que la acumulación de estos metales puede ser necesaria durante la fase lag como preámbulo al crecimiento exponencial.

En este trabajo, en el caso más importante, la fase de latencia logra reducirse de 6 a 2.4 horas con la adición del biocarbón y la magnetita, ambos en su dosis media, y se sabe que el hierro (presente en mayor proporción en Fe_3O_4 , pero también existente en el biocarbón) es un mineral esencial para el crecimiento bacteriano, con numerosos sistemas de absorción disponibles. Además, análisis transcriptómicos han encontrado también la expresión de la maquinaria de absorción de hierro durante la fase de latencia temprana (4 a 20 minutos) de distintas especies y muchas proteínas metabólicas y respiratorias contienen grupos Fe-S que son esenciales para la actividad enzimática (Johnson *et al.*, 2005). Otros metales identificados como relevantes durante la fase de latencia son el Ca^{2+} , Mo^{2+} y Mn^{2+} , también presentes en mayor o menor medida en los tres materiales utilizados.

Aunado a lo anterior, se debe tomar en consideración, que, una gran cantidad de trabajos en los cuales se ha estudiado la producción de biogás en múltiples condiciones, utilizando FORSU como sustrato, han reportado su comportamiento diaúxico o bifásico, es decir, con más de una fase de latencia. La FORSU es un sustrato que posee múltiples fuentes de carbono, conteniendo una gran cantidad de carbohidratos, proteínas y lípidos, esto hace que los microorganismos sintetizen las enzimas necesarias para consumir en primera instancia lo más fácilmente biodegradable, para posteriormente, tener otra fase de latencia en la cual nuevamente producen las enzimas requeridas para continuar con la asimilación de otro sustrato, de manera escalonada y repitiéndose este patrón de crecimiento en la curva tantas veces como fuentes diversas de carbono existan.

En el caso de este trabajo, no se aprecia de forma marcada dicho comportamiento diaúxico, ni en los controles, ni en los en los materiales conductores, lo que se puede atribuir a la fuente de suministro de la FORSU, que fue la Central de Abastos de Tultitlán, Estado de México, donde el contenido fue en su mayoría residuos de frutas y verduras, con una proporción de grasas muy incipiente, siendo éstas el tipo de macromoléculas que tienden a causar un cambio más drástico en las vías metabólicas en diferentes momentos de la producción de biogás y que deriva en una fase de latencia más larga (Rasit *et al.*, 2015).

Por otro lado, en cuanto a la tasa máxima de producción de metano ($R_{m\acute{a}x}$), se puede destacar que, con respecto a los experimentos de tipo y dosis de material conductor, el biocarbón 10 g/L y la Fe_3O_4 0.1 g/L presentan los mayores incrementos en la velocidad de producción con respecto al control de FORSU, con un 20 y 15%, siendo su tasa máxima de 90.32 y 84.61 $mLN_{CH_4}/g_{SV}\cdot d$ respectivamente. Por su parte, en los ensayos de tamaño de partícula y dosis con CAG el ensayo tpM-dA (malla 40/0.595mm y dosis 1 g/L) mostró el mayor incremento (10%) en la tasa de producción, el resto de las combinaciones se mantuvieron muy cercanas a la velocidad de producción máxima del control sin adición de MC. En cuanto a este parámetro, se han informado incrementos más significativos de entre 16 y 70% pero principalmente con monosustratos (Tabla 4).

La producción máxima de metano obtenida por el modelo modificado de Gompertz con respecto a los datos experimentales, estuvo en todos los casos ligeramente subestimada, con un porcentaje de variación promedio del 2%, teniendo el intervalo de diferencia entre ambos valores desde 0.05 hasta 8.2%, mientras que la variación de los datos experimentales y los proporcionados por el modelo en el caso de los ensayos de tamaño de partícula-dosis de CAG fue menor, con una diferencia de entre el 0.03 y el 2%, siendo el promedio de variación de ambos datos de 0.48%.

7.7 Inmovilización de materiales conductores

Los resultados de los MC (magnetita y biocarbón) inmovilizados en fibra de carbono, fibra de poliéster y perlas de alginato se muestran en la Figura 48.

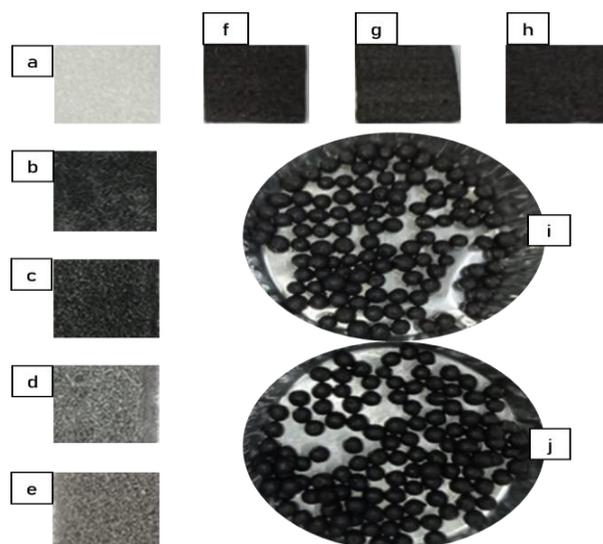


Figura 48. a) Fibra de poliéster cruda, b) FP+BC (impregnación húmeda), c) FP+BC (impregnación seca), d) FP+ Fe_3O_4 (impregnación húmeda), e) FP+ Fe_3O_4 (impregnación seca), f) fibra de carbono cruda, g) FC+ Fe_3O_4 (impregnación húmeda), h) FC+ Fe_3O_4 (impregnación seca), i) perlas de alginato+ Fe_3O_4 , j) perlas de alginato+biocarbón.

7.7.1 Caracterización de materiales inmovilizados

Con la finalidad de evaluar la eficiencia de las técnicas de fijación implementadas para Fe_3O_4 y BC sobre los distintos medios de soporte, se evaluó la estabilidad térmica y su dispersión sobre la superficie a través de termogravimetría y MEB-EDS respectivamente. Cabe destacar que, en el caso de la caracterización, se analizaron las fibras de carbono y poliéster sintetizadas por impregnación húmeda con revestimiento de quitosano y termofijación, dado que fueron las que registraron una mayor cantidad de material (biocarbón/magnetita) fijado, a diferencia de la impregnación seca.

Como se muestra en la Tabla 19, con la impregnación húmeda se fija un promedio de 120.5 mg de magnetita a las fibras de carbono, mientras que, con el método en seco, únicamente se llega a inmovilizar 36.8 mg. Por su parte, la fibra de poliéster impregnada por vía húmeda retuvo 107.9 mg de magnetita y 96.5 mg de biocarbón, mientras que la impregnación seca derivó en 17.8 y 18.1 mg retenidos respectivamente.

Tabla 19
Masa de MC impregnada por técnica de fijación

Muestra	Masa s/ MC	Masa c/ MC	Δm (masa impregnada) (mg)	Promedio
<i>Fibra de carbono + Fe_3O_4 (Impregnación húmeda)</i>				
1	286.8	422.6	135.8	
2	261.4	378.4	117	
3	311.4	445.5	134.1	
4	275.2	392.4	117.2	
5	251.9	382.8	130.9	
6	312.8	430.9	118.1	
7	331.1	469.7	138.6	
8	307.4	448.7	141.3	120.5±13.5
9	254.8	357.8	103	
10	286.2	396.6	110.4	
11	254.8	374.3	119.5	
12	270	382.5	112.5	
13	325.3	434.7	109.4	
14	286.6	385.1	98.5	
<i>Fibra de carbono + Fe_3O_4 (Impregnación seca)</i>				
15	234.5	252.3	17.8	
16	281.6	325.1	43.5	
17	316.7	343.2	26.5	
18	344.1	390.7	46.6	

19	266.5	312.6	46.1	
20	304.1	342.1	38	36.8±14.7
21	311.5	365.8	54.3	
22	266.5	281.9	15.4	
23	265.6	327.8	62.2	
24	292.1	329.1	37	
25	296.3	338.5	42.2	
26	306.1	322.8	16.7	
27	283.6	330	46.4	
28	266.9	290.2	23.3	
<i>Fibra de poliéster + Fe₃O₄ (Impregnación húmeda)</i>				
1	225.7	328	102.3	
2	246	352	106	
3	197.8	305.9	108.1	
4	206.7	299.8	93.1	
5	258.1	361	102.9	107.9±14.3
6	302.7	438.1	135.4	
<i>Fibra de poliéster + biocarbón (Impregnación húmeda)</i>				
7	178.6	278.4	99.8	
8	206.7	305.3	98.6	
9	240.5	321.8	81.3	
10	198.8	288.6	89.8	
11	226.5	326.6	100.1	96.5±9.7
12	218.5	327.9	109.4	
<i>Fibra de poliéster + Fe₃O₄ (Impregnación seca)</i>				
13	260.1	275.3	15.2	
14	217.4	230.2	12.8	
15	201.8	222.2	20.4	
16	231.5	250.8	19.3	
17	227.7	241.9	14.2	
18	207.3	226.2	18.9	17.8±3.8
19	209.8	229.3	19.5	
20	227.1	249.1	22	
<i>Fibra de poliéster + biocarbón (Impregnación seca)</i>				
21	236.2	253.5	17.3	
22	223.5	236.4	12.9	
23	226.9	245.2	18.3	
24	185.7	216.4	30.7	
25	206.3	218.6	12.3	18.1±3.3
26	255.1	274.5	19.4	
27	206.1	220.3	14.2	
28	231.8	251.4	19.6	

7.7.1.2 Termogravimetría

Se analizaron las curvas de pérdida de masa (TG) y las curvas de evolución de la termogravimetría diferencial (DTG) para determinar la estabilidad térmica de los materiales conductores: biocarbón y magnetita (Figura 49 y 50), ya que durante su inmovilización en las fibras de carbono y poliéster se someten a altas temperaturas para lograr una mejor retención de las partículas conductoras sobre los filamentos de éstas.

En el biocarbón se presenta un pequeño pico térmico que se produce de inmediato en los primeros 20-70 °C y se debe a una ligera deshidratación. Posteriormente se presenta un pico térmico de gran tamaño a 350-550 °C, el cual de acuerdo con Yang et al. (2007), se asocia a la degradación de la hemicelulosa, celulosa y lignina. Sin embargo, a la temperatura de fijación utilizada en las fibras (200 °C), únicamente se pierde el 5.9% de la masa de biocarbón.

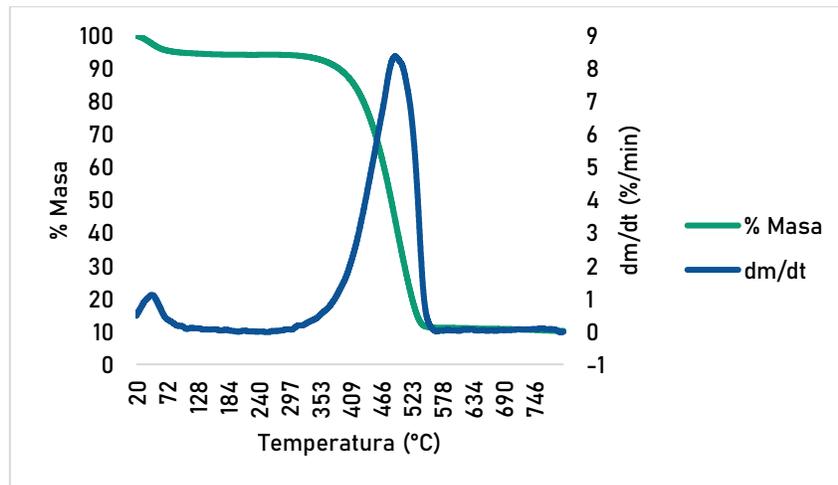


Figura 49. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de biocarbón.

Como se muestra en la Figura 50, la magnetita es un mineral con una gran estabilidad térmica. A los 200 °C se pierde una cantidad incipiente de masa de sólo 0.4%, siendo 0.6% la pérdida de masa máxima. La ganancia de masa observada en la curva a partir de 382 °C está relacionada con la degradación térmica en la atmósfera de aire que produce la reacción de oxidación de la magnetita (Fe_3O_4) a óxido de hierro (III), Fe_2O_3 . Es decir, para la misma cantidad de Fe originalmente presente, la cantidad de oxígeno aumenta debido a la reacción y esto se refleja en un aumento de masa. De tal manera que es un material ideal para la termofijación a altas temperaturas.

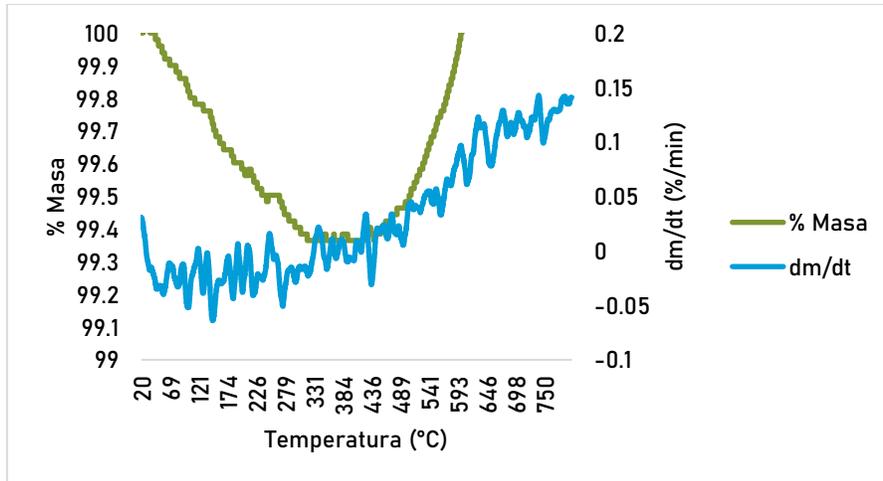


Figura 50. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de magnetita.

En cuanto a las fibras empleadas, es posible observar que la de carbono es muy estable térmicamente hasta los 500 °C y luego se degrada rápidamente por encima de 600 °C (Figura 51). Sin embargo, de forma similar a la magnetita, al llegar a someterse a 200 °C sólo pierde el 0.6% de su masa. Por su parte, como se puede observar en la Figura 52, la descomposición de la fibra de poliéster se produce en dos etapas de pérdida de masa, comenzando su degradación térmica alrededor de los 230 °C y perdiendo el 65% de su masa total a los 470 °C. A pesar de que la fibra de poliéster no posee la misma estabilidad térmica que la fibra de carbono a altas temperaturas, el método de fijación propuesto en la metodología de este trabajo no presenta inconvenientes para este material.

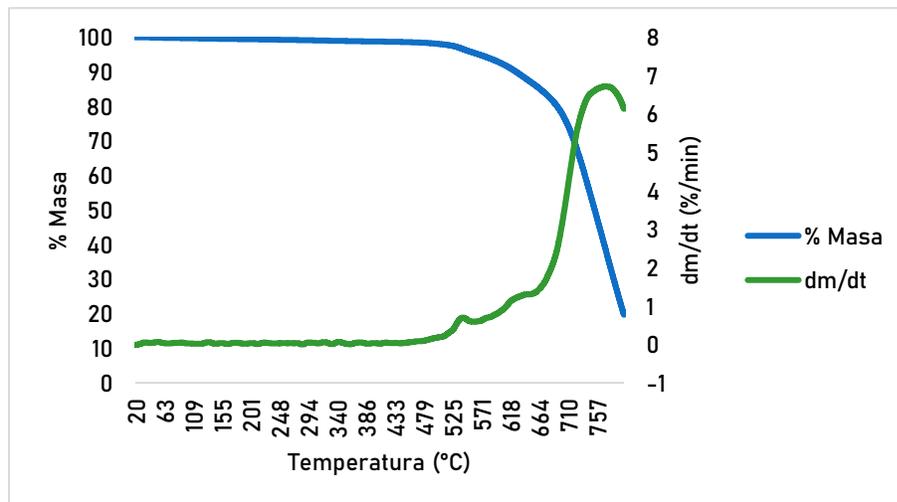


Figura 51. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de fibra de carbono.

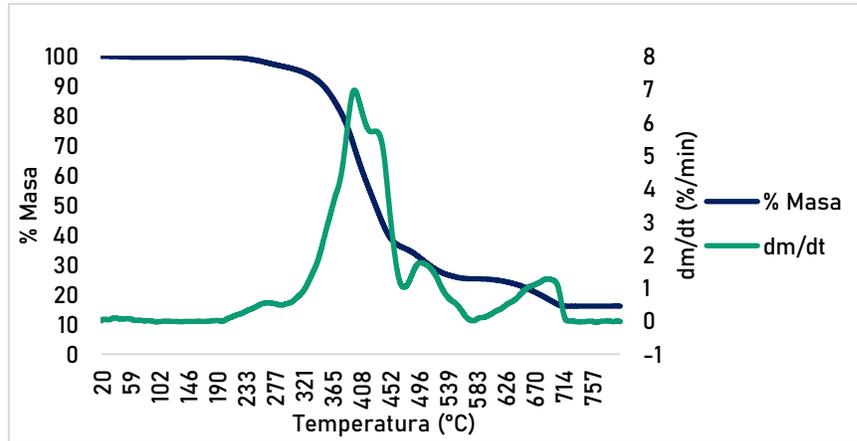


Figura 52. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de fibra de poliéster.

Cabe mencionar que el quitosano, usado como matriz de revestimiento en la impregnación húmeda y expuesto a 200 °C durante la termofijación, pierde 13% de su masa a este valor de temperatura. Su masa se reduce un 65% a 340 °C y se degrada por completo a partir de 620 °C, como puede verse en la Figura 53. Es posible que al tener una pérdida de 13% de quitosano durante la termofijación se desprenda una cantidad adicional de magnetita o biocarbón. Sin embargo, este método de inmovilización sigue siendo superior a la impregnación seca.

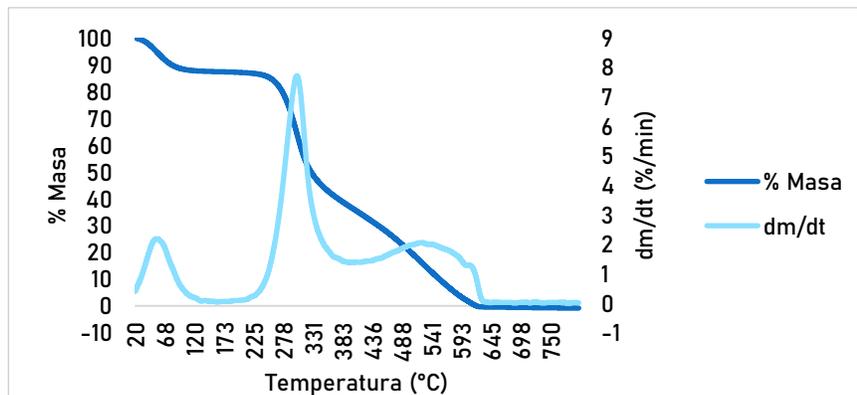


Figura 53. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de quitosano.

Finalmente, las perlas de alginato con biocarbón/magnetita, aunque no se someten a altas temperaturas durante su síntesis, poseen una adecuada estabilidad térmica. Los picos pronunciados de DTG observados en las Figuras 54 y 55 entre 20 y 110 °C obedecen a la pérdida de humedad de las perlas. A partir de ese primer pico, su comportamiento está sujeto al patrón térmico mostrado en las Figuras 49 y 50 para el biocarbón y magnetita respectivamente.

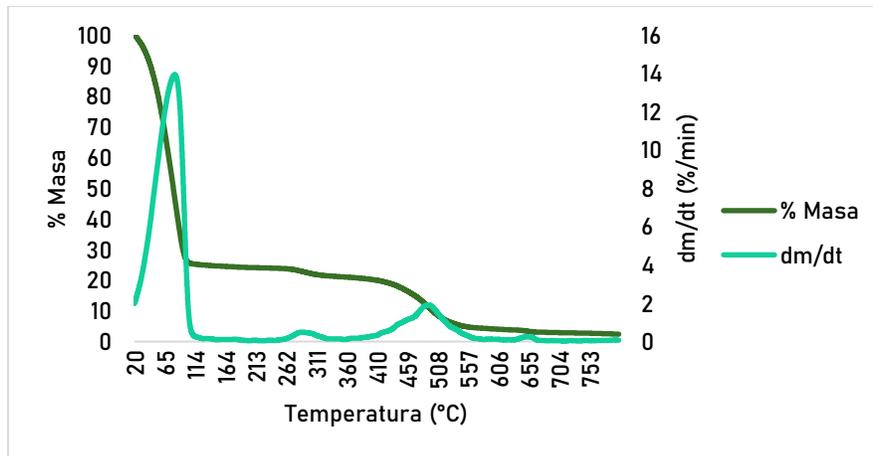


Figura 54. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de perlas de alginato-biocarbón.

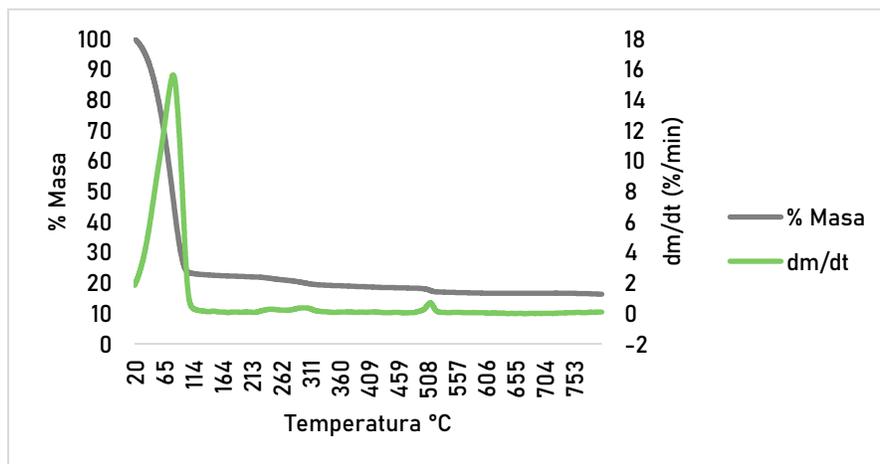


Figura 55. Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial de perlas de alginato-magnetita.

7.7.1.3 MEB-EDS

La Figura 56 presenta las micrografías y mapeo elemental a través de análisis EDS para las fibras de carbono y poliéster. En la Figura 56a, la fibra de carbono control muestra una estructura fibrilar desordenada, con un diámetro aproximado de 150-250 nm y una superficie aparentemente lisa. En la Figura 56b, es posible evidenciar sobre la superficie algunas partículas de magnetita adheridas, esto se corrobora en los picos de composición elemental (Figura 56c) y el mapeo elemental (Figura 56d), donde se ve la dispersión, aunque heterogénea, de la magnetita sobre la fibra. Por su parte, en la fibra de poliéster control (Figura 56e) también tiene una estructura no tejida, sin embargo, a diferencia de la fibra de carbono, su superficie muestra una morfología menos lisa. La FP impregnada con magnetita se puede observar en la Figura 56f, distribuida de manera más homogénea como se constata en el mapeo elemental de la Figura 56h.

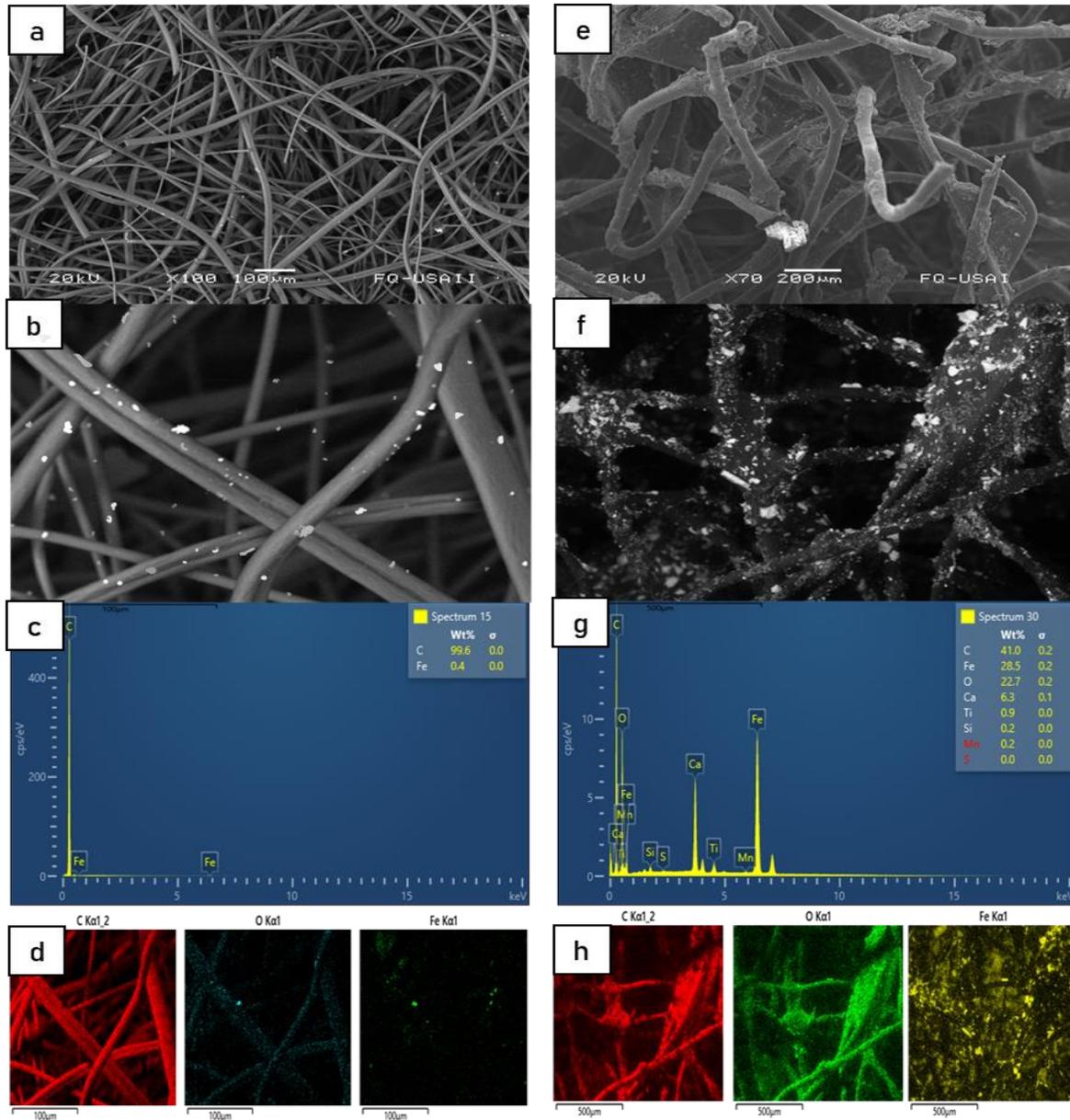


Figura 56. Micrografía electrónica de barrido de FC (a), FC+Fe₃O₄ (b), FP (e), FP+ Fe₃O₄ (f). Análisis elemental de FC+Fe₃O₄ (c, d) y FP+ Fe₃O₄ (g, h).

En cuanto a la fibra de poliéster impregnada con biocarbón, se aprecia que existe una distribución uniforme del BC sobre la superficie de la fibra (Figura 57b), además, los elementos identificados durante la caracterización del biocarbón en la sección 7.1.3, como los metales alcalinos y alcalinotérreos se evidencian en el espectro y el mapeo de las Figuras 57c y 57d respectivamente, destacando el Ca²⁺, Ti⁴⁺, Al³⁺, K⁺, Na⁺ y Mg²⁺ y comprobando la adecuada adhesión del biocarbón a la fibra.

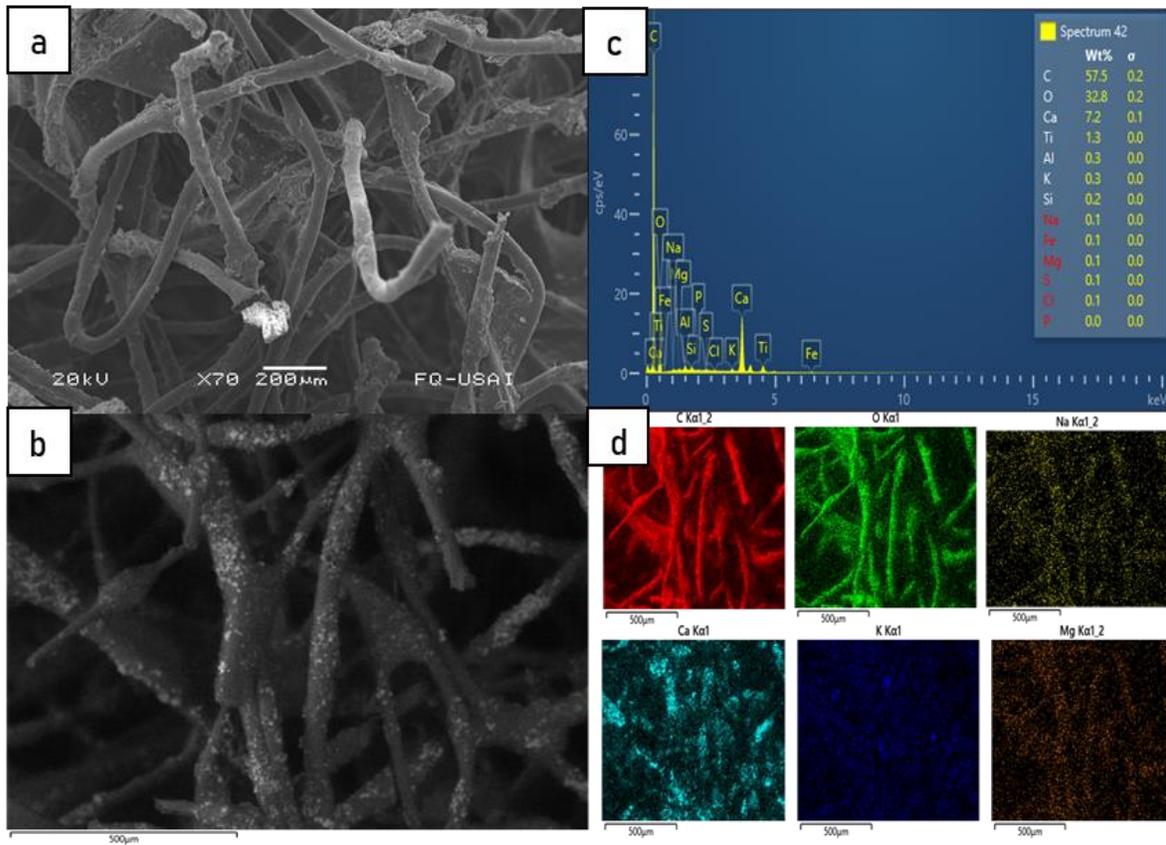


Figura 57. Micrografía electrónica de barrido de FC (a), FC+biocarbón. Análisis elemental de FC+biocarbón (c, d).

Cabe señalar que ambas fibras, de carbono y poliéster, parecen tener una morfología adecuada para el crecimiento bacteriano. En este sentido, Liu *et al.* (2020), señalan que la adición de cualquier tipo de partículas o materiales aumenta la retención de biomasa dentro de los digestores anaerobios al proporcionar grandes cantidades de superficie. Agregar un área de superficie alta se conoce como un método eficiente para mejorar el desarrollo de biopelículas y así aumentar el tiempo de retención de sólidos (SRT) mientras se minimiza el lavado de biomasa.

Finalmente, los resultados para las perlas de alginato impregnadas con Fe_3O_4/BC se muestran en la Figura 58. Ambas perlas de alginato poseen una estructura superficial porosa e irregular, con un diámetro promedio de 3 a 4 mm. De acuerdo con lo que se observa en el análisis EDS, es posible que los MC no estén totalmente expuestos en la superficie de las esferas de alginato, sino que más bien una cantidad importante de éstos se encuentre encapsulado, ya que en las Figuras 58c y 58g hay una presencia importante de calcio y cloro proveniente del $CaCl_2$ empleado para la gelificación iónica del alginato de sodio. Hay algunas zonas de la perla de alginato donde esta capa protectora está fragmentada o adelgazada y deja ver la composición elemental del biocarbón y la magnetita, descrita previamente en la sección 7.1.3.

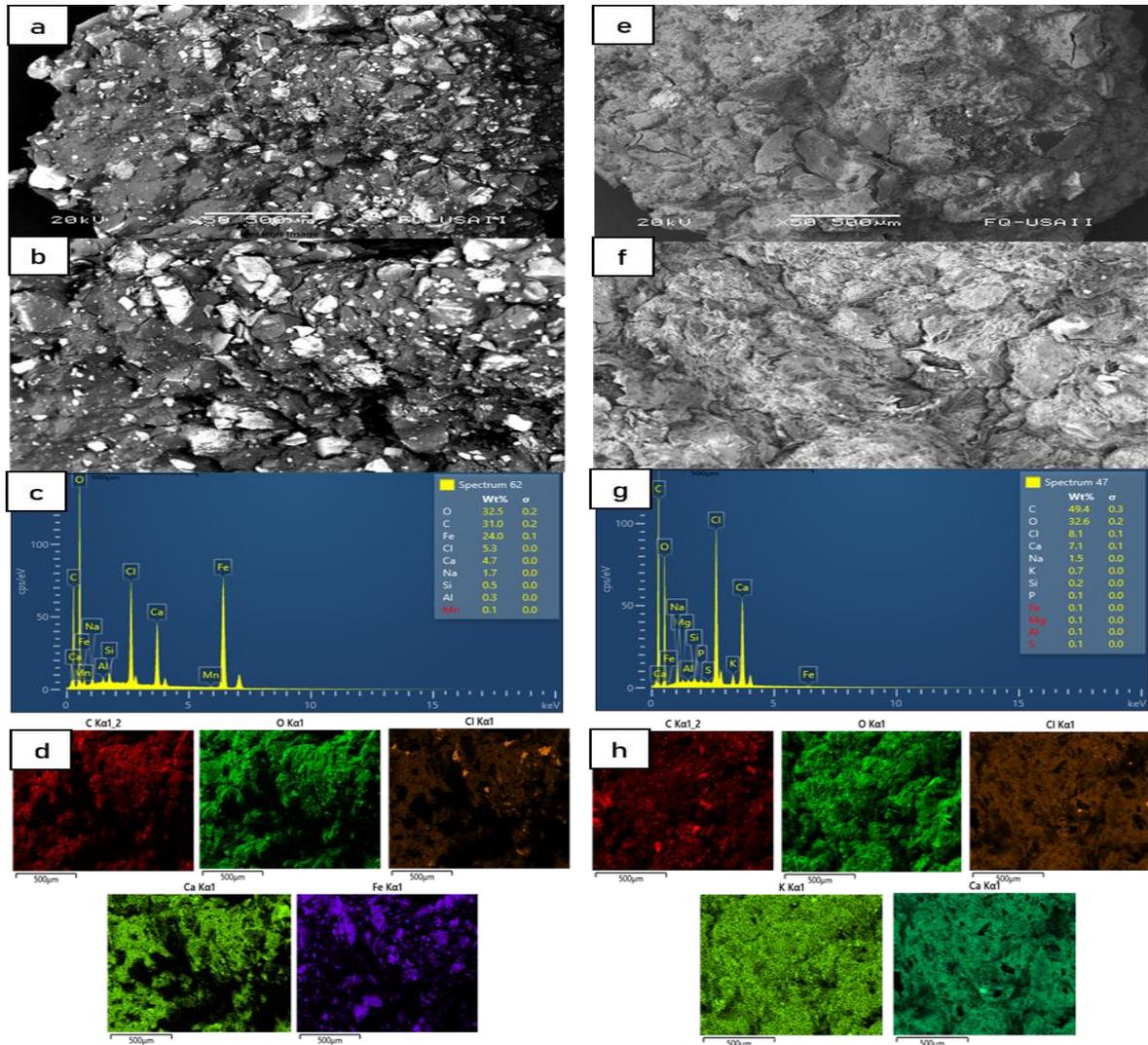


Figura 58. Micrografía electrónica de barrido de PA+Fe₃O₄ (a, b), PA+biocarbón (f, d). Análisis elemental de PA+Fe₃O₄ (c, d), PA+biocarbón (g, h).

7.7.2 Potencial bioquímico de metano con materiales inmovilizados

Con respecto a las pruebas de potencial bioquímico de metano con biocarbón y magnetita inmovilizados a las fibras de carbono/poliéster y perlas de alginato, se muestran los resultados en la Figura 59. Como es posible observar, todos los materiales, a excepción de las perlas de alginato con biocarbón, tuvieron un incremento en la producción específica de metano cuando se compara con el control de FORSU sin ningún material bioestimulante. En la Tabla 20 se resumen los incrementos y decrementos de cada ensayo en términos de mL_N/gSV y % del rendimiento de metano con respecto al control.

Tabla 20
Resultado de PBM con materiales conductores inmovilizados

Tratamiento	Variación del rendimiento de metano	
	mLN CH ₄ /gSV	%
FC-Fe ₃ O ₄	↑ 103.5	↑ 18.2
FP-Fe ₃ O ₄	↑ 56.7	↑ 10.9
Alg-Fe ₃ O ₄	↑ 49.7	↑ 9.7
FP-BC	↑ 12.4	↑ 2.6
	Control FORSU	
Alg-BC	↓ 25.4	↓ 5.8%

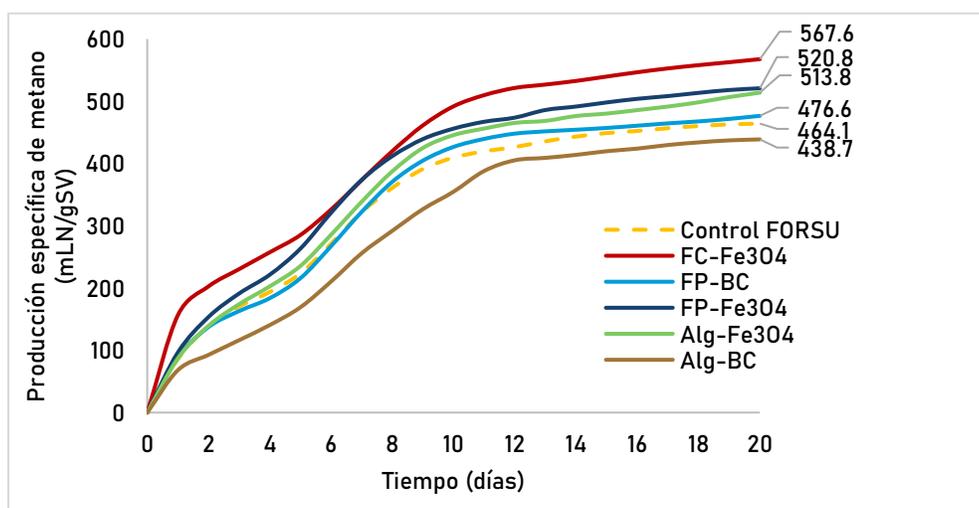


Figura 59. Potencial bioquímico de metano con magnetita y biocarbón inmovilizados.

La mejor respuesta en el rendimiento de metano para este ensayo se obtuvo con la fibra de carbono impregnada con magnetita, produciendo 567.6 mLN/gSV luego de 20 días de operación en lote, lo que significa, 18.2% o 103.5 mLN/gSV más de metano que el control. Cabe señalar que, de acuerdo con los cálculos gravimétricos mostrados en la Tabla 19 y tomando en cuenta que se añadieron 3 fibras de carbono de 2 cm² a cada reactor de 500 mL (con volumen útil de 360 mL), y sabiendo que en cada fibra se impregnó un estimado de 120.5 mg de magnetita, la concentración aproximada de este material sería alrededor de 1 g/L. Sin embargo, determinar con exactitud la cantidad añadida al reactor a través de las fibras es complicado.

Es importante señalar que la fibra de carbono fue seleccionada como medio de fijación de magnetita debido a su gran área superficial y porosidad, sitios de reacción redox y estabilidad térmica y mecánica. Además, su combinación con la magnetita se propuso proyectando un efecto sinérgico entre ambos materiales con mecanismos distintos. En el contexto de la digestión anaerobia y específicamente de la DIET se ha demostrado que la fibra de carbono mejora la producción de metano y la digestibilidad de las

moléculas orgánicas como propionato y butirato, incluso a altas presiones parciales de hidrógeno (Hassaneen *et al.*, 2020).

Lei *et al.* (2016) demostraron que las bacterias electroactivas como *Geobacter* y los metanógenos aceptores de electrones vía DIET como *Methanosaeta* y *Methanosarcina* se enriquecieron en la superficie de la tela de carbono. Por otra parte, Barua *et al.* (2018), emplearon fibra de carbono proporcionando una superficie específica total de 1583 m²/L con etanol como sustrato, incrementando la producción específica de metano 2.4 veces y la tasa de metanogénesis 6.7 con respecto al control. En el presente trabajo el área específica la FC incorporada fue de 600 m²/cm, sin embargo, el rendimiento de metano de la FC+Fe₃O₄ no superó a la adición en suspensión de 1 g/L de Fe₃O₄, mostrado en la sección anterior con un incremento en la producción de metano de 30.1% respecto al control.

En el caso de la fibra de poliéster con magnetita, el rendimiento de metano sólo se incrementó 10.9% (56.7 mLN/g_{SV}) y 2.6% (12.4 mLN/g_{SV}) con biocarbón. En este caso es posible que la cantidad de magnetita y biocarbón impregnado y dispuesto en los reactores a través de las tres fibras de 2x2 cm haya sido insuficiente para alcanzar un mayor rendimiento. Además, recientemente un estudio de Baek *et al.* (2021) explicó que además del área superficial y la conductividad eléctrica de la fibra, la biocompatibilidad puede ser determinante sobre los efectos que tendrá en la DA. Esta biocompatibilidad puede describirse a partir de su rugosidad, hidrofiliadad/hidrofobicidad y energía superficial, ya que de acuerdo con Al-Amshawee *et al.* (2021), estas características pueden afectar la formación de biopelículas y, por lo tanto, la retención de biomasa en el reactor. El trabajo de Baek *et al.* previamente mencionado, informó que la fibra de carbono es altamente hidrófila y, por el contrario, el poliéster es un tejido muy hidrófobo, además de no ser conductor, por lo que es probable que el incremento en el rendimiento de metano obedezca exclusivamente a la magnetita o el biocarbón impregnados.

Con respecto a las perlas de alginato, sólo las que contenían magnetita lograron incrementar la producción de metano en un 9.7%, ya que las perlas con biocarbón tuvieron un rendimiento incluso inferior al control de FORSU. En este sentido hay varios puntos a considerar; el primero es que las perlas con biocarbón tienen una baja densidad lo cual hace que se mantengan flotando en la superficie del reactor, perdiendo contacto directo con el lecho de lodo anaerobio granular que contiene los microorganismos y que se mantiene al fondo de los reactores, ya que éstos se agitan manualmente cada tercer día.

Por otro lado, como fue posible visualizar en el análisis MEB-EDS mostrado en la Figura 58, la esfera de alginato está cubierta casi en su totalidad por una capa de cloruro

de calcio que mantiene encapsulados los materiales conductores, y que, sin un análisis MEB posterior a las pruebas de PBM, es difícil asegurar que los microorganismos logren permear. Aunado a lo anterior, es posible que en los reactores adicionados con perlas de alginato-biocarbón ocurra una inhibición por efecto salino. La toxicidad de la sal se ha estudiado en el campo biológico durante varias décadas y se sabe que los niveles altos hacen que las células bacterianas se deshidraten debido a la presión osmótica.

En este aspecto, aunque los cationes de las sales en solución siempre están asociados con los aniones, se encontró que la toxicidad de las sales estaba determinada predominantemente por el catión (Chen *et al.*, 2018). Los iones de metales ligeros, incluidos sodio, potasio, calcio y magnesio, están presentes de manera importante en la superficie del biocarbón como se determinó en la sección 7.1.3. Son necesarios para el crecimiento microbiano y, en consecuencia, afectan la tasa de crecimiento específica como cualquier otro nutriente. Si bien las concentraciones moderadas estimulan el crecimiento microbiano, Anwar *et al.* (2016) aseguran que las cantidades excesivas ralentizan el crecimiento, e incluso concentraciones más altas pueden causar una inhibición o toxicidad severas. Sumado a la cantidad de cationes presentes en el biocarbón, una cantidad adicional se suma al sistema por el sodio asociado al alginato y el cloruro de calcio empleado para la gelificación iónica de las perlas, por lo que la hipótesis más fuerte conduce a una probable inhibición salina.

Finalmente, en la Tabla 21 se muestran los valores de los parámetros cinéticos para el modelo modificado de Gompertz de los materiales inmovilizados. De estos datos destaca una reducción del 53, 44 y 30% en el tiempo de la fase de latencia cuando se usa FC-Fe₃O₄, FP-Fe₃O₄ y Alg-Fe₃O₄ respectivamente, y como se explicó ampliamente en la sección 7.4, el hierro posee una gran relevancia metabólica durante la fase lag. Por su parte, a diferencia de la incorporación de los materiales de forma suspendida, la tasa de producción de metano no tuvo cambios significativos en estos ensayos.

Tabla 21
Constantes cinéticas del modelo modificado de Gompertz para materiales inmovilizados

Tratamiento	λ		$R_{\text{máx}}$ (mL _{CH₄} /g _{SV} .d)	$P_{\text{máx}}$	$P_{\text{máx}}$ experimental (mL _{CH₄} /g _{SV})	R^2
	(d)	(h)				
Control FORSU	0.278	6.7	49.14	466.13	464.1	0.991
FC-Fe ₃ O ₄	0.135	3.2	52.98	569.27	567.6	0.980
FP-Fe ₃ O ₄	0.160	3.8	56.31	516.50	520.8	0.991
Alg-Fe ₃ O ₄	0.196	4.7	53.32	506.90	513.8	0.992
FP-BC	0.329	7.9	50.93	479.43	476.6	0.990
Alg-BC	0.449	10.7	41.08	454.52	438.7	0.995

7.8 Análisis del pH/ORP/AGV

Se analizaron los parámetros fisicoquímicos de pH, potencial redox (ORP) y concentración de AGV para la adición de BC y magnetita suspendidos en las mejores dosis probadas (1 g/L y 0.1 g/L respectivamente), así como para magnetita inmovilizada en fibra de carbono durante 21 días, bajo las condiciones de operación establecidas en todos los experimentos en lote de este trabajo.

Existe evidencia de que los materiales carbonosos y férricos poseen propiedades reductoras (Wang *et al.*, 2018c; Lizama *et al.*, 2019) y esto se pudo evidenciar, como se muestra en la Figura 60a. El reactor sin adición de MC tuvo un ORP que osciló entre -196.2 y -225.7 mV, en contraste, la incorporación de todos los materiales permitió llegar hasta valores reducidos máximos de -324.2 mV (magnetita), -304.7 mV (FC-Fe₃O₄) y -251.7 mV (biocarbón). Un sistema de digestión anaerobia reducido hace que el ambiente sea más favorable para que los microorganismos realicen de manera eficiente la conversión de sustratos. Cuando se analiza el comportamiento del ORP junto a los rendimientos de metano observados en las distintas pruebas de PBM, se puede inferir que éste podría ser uno de los factores que mayor influencia pueden tener sobre la mejora de la DA, incluso, más que la conductividad asociada a estos materiales.

Considerando que la transformación de propionato a acetato es desfavorable y afecta el rendimiento de metano de los digestores anaerobios, una disminución del ORP cercana a -350 mV favorece la eficiencia del proceso. Hay reportes de que la fermentación propiónica ocurre a un ORP mayor a -278mV (proceso anaerobio facultativo) y el tipo butírico y etanol ocurren a valores más negativos de ORP (Lizama *et al.*, 2019). Principalmente la adición de magnetita permite que el potencial redox esté por debajo de -300 mV en los primeros 20 días. De acuerdo con Hao *et al.* (2017) la ruta metabólica de producción de metano que se ve estimulada con valores cercanos a -350 mV es la acetoclástica, misma que se pudo constatar como la dominante a partir del análisis de los genomas y proteomas.

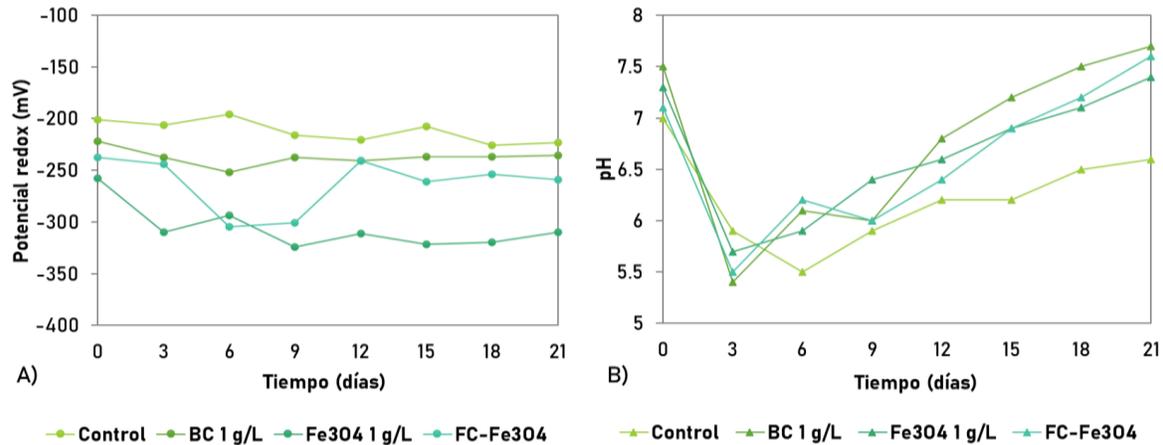


Figura 60. Potencial redox (A) y pH (B) con BC, Fe₃O₄ y FC-Fe₃O₄.

Por otra parte, la presencia de AGV y su composición son de gran relevancia, porque son el intermediario más importante en el proceso anaerobio que puede limitar la metanogénesis. Los AGV totales junto con el pH influyen en muchos aspectos, como el metabolismo microbiano, la tasa de hidrólisis y la formación de productos de inhibición (Ma *et al.*, 2016). A pesar de la disminución del pH en los primeros días y el aumento de la concentración de AGV totales, en ninguno de los reactores se produjo inhibición. Esto probablemente se debió a la alta capacidad amortiguadora del lodo anaerobio granular empleado como inóculo (6100 mg_{CaCO₃}/L) aunado al carácter básico de los materiales y a los efectos del hierro y otros metales traza presentes en los materiales, como cofactores esenciales de la monóxido de carbono deshidrogenasa, que es una enzima que está involucrada en el consumo de ácido acético (Qiang *et al.*, 2012).

La Figura 60b muestra las variaciones de pH, en ella se aprecia una disminución de este parámetro en los primeros días, especialmente en el reactor con BC, donde al día 3 el descenso del pH alcanzó un valor de 5.4 pero con una rápida recuperación de la neutralidad y un rendimiento más estable. Esto es consecuente con la máxima producción de AGV_T al día 5 (Figura 61) con la adición de 1 g/L de biocarbón (2290.4 mg_{HA}/L) y confirma que a pesar de que este tipo de materiales pueden incrementar la tasa de hidrólisis-acidogénesis, el biocarbón, principalmente por sus propiedades morfológicas y de superficie pueden tener buenas características para adsorber y amortiguar concentraciones altas de ácidos grasos, sin que esto signifique una inhibición del proceso.

Otro punto que también se debe tener en cuenta con la adición de magnetita, es que de acuerdo con Wei *et al.* (2018), la corrosión anaerobia del hierro ocurre junto con el consumo de H⁺, lo que podría amortiguar los ácidos y así mantener un pH favorable para los metanógenos.

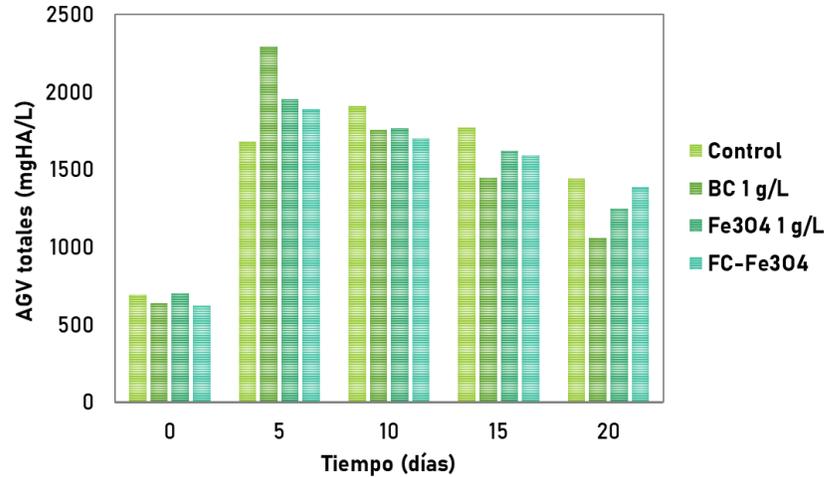


Figura 61. Producción de ácidos grasos volátiles totales con BC, Fe₃O₄ y FC- Fe₃O₄.

7.9 Análisis de la comunidad microbiana

Los efectos de los MC en la producción de metano y la conversión de FORSU indicaron diferencias en las interacciones metabólicas dentro de las comunidades microbianas. Los resultados del análisis proteómico confirmaron que la diversidad y proporción de microorganismos con BC, Fe₃O₄ y FC-Fe₃O₄ se modificaron con respecto al control. En la Figura 62 se muestra la taxonomía del sistema, desde el dominio, filo, clase, orden, familia, género y las principales especies identificadas en todos los ensayos.

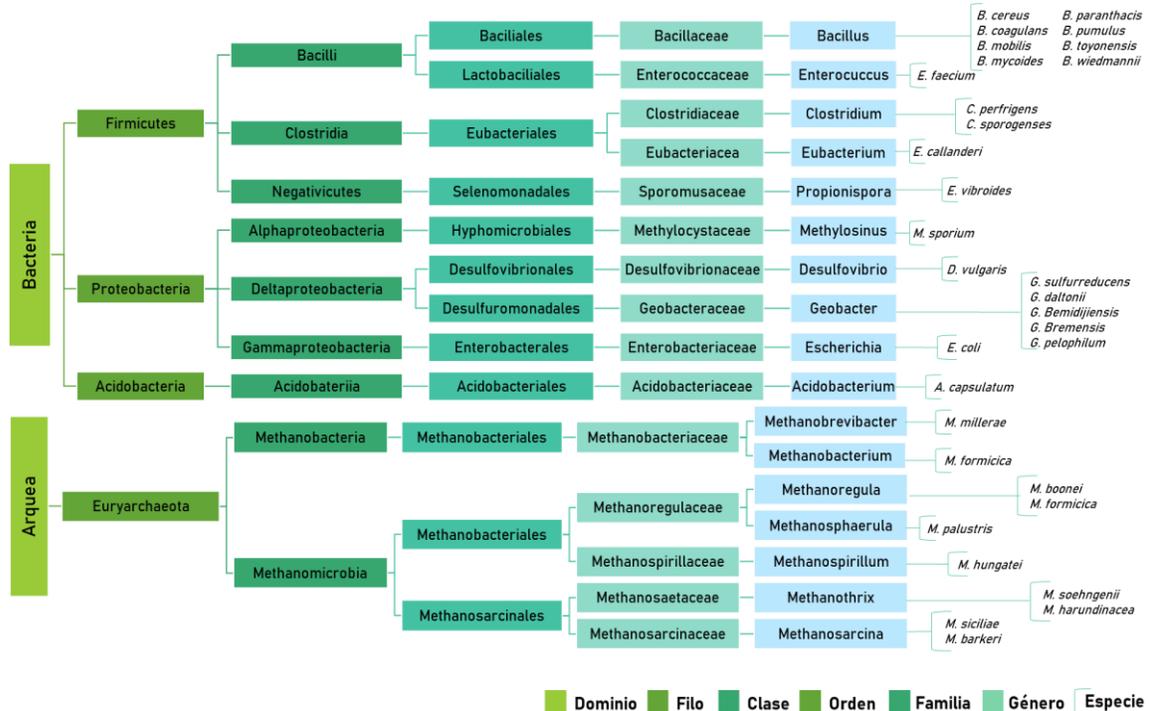


Figura 62. Distribución filogenética de los microorganismos del sistema de DA.

Cabe destacar, que, en este estudio, la actividad de las proteínas permitió evaluar la abundancia relativa de los microorganismos de forma indirecta. Por lo que se tiene la certeza de que los microorganismos encontrados, asociados a una o más proteínas están presentes en las muestras sin lugar a duda. Sin embargo, y a pesar de haber incluido una biblioteca genómica extensa con los microorganismos típicos anaerobios encontrados en digestores anaerobios, es posible que no se hallen expresados la totalidad de los dominios Bacteria y Arquea.

En la Figura 63 se presenta la distribución de la comunidad microbiana en el reactor de control al día 10, en el cual, la mayoría de los experimentos comenzó una ralentización de la fase exponencial, y algunos de los tratamientos estaba próximo a la fase de estabilización. Se puede observar que la proporción de bacterias al t_{10} es de 36.7%, mientras que las arqueas metanogénica correspondieron a un 63.3%, siendo los filos dominantes Firmicutes (57.6%) y proteobacteria (41%) y Euryarchaeota para Bacteria y Arquea respectivamente. Los géneros *Bacillus* (25.4%), *Enterococcus* (13.7%) y *Clostridium* (11.2%) fueron los más representativos para Firmicutes. Por su parte, en el filo Proteobacteria se encontró *Escherichia* (23.4%) *Geobacter* (8.3%), *Desulfovibrio* (6.8%), *Eubacterium* (4.4%), *Methylosinus* (2%) y *Acidobacterium* (1.5%). La adición de los materiales conductores no modificó sustancialmente la composición de la comunidad microbiana pero sí la proporción de algunas familias y la expresión de proteínas clave para entender la ruta metabólica favorecida con su adición.

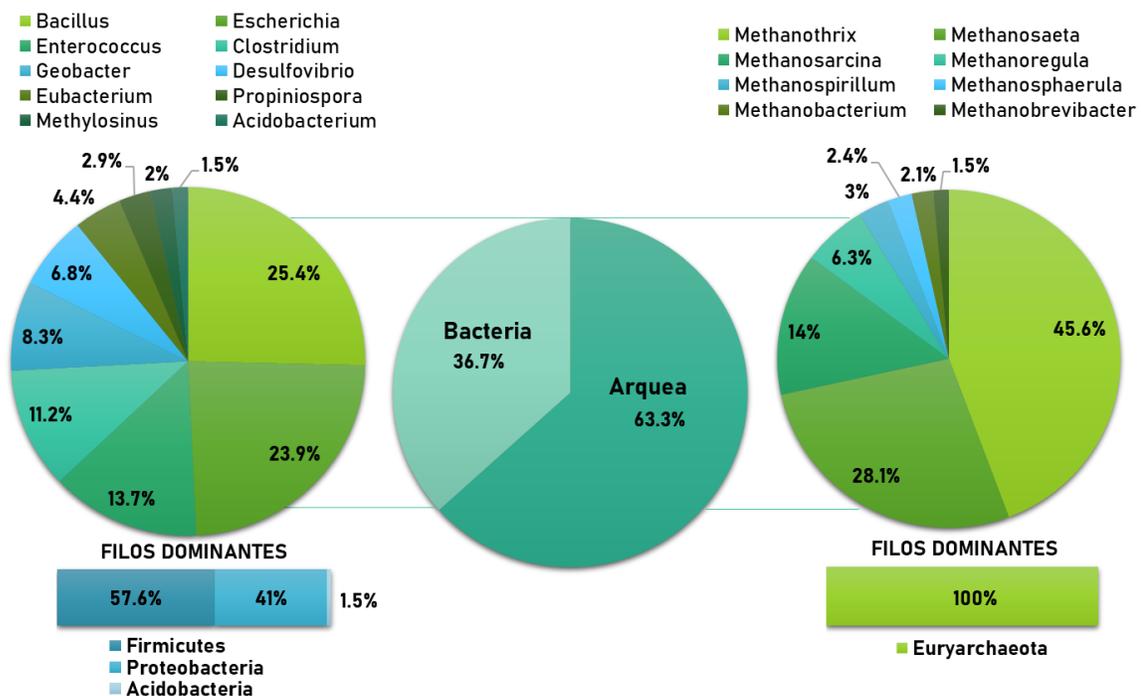


Figura 63. Filos y géneros principales de los dominios Bacteria y Arquea.

El digester con adición de magnetita presentó los cambios más significativos, con una mayor proporción de bacterias del filo Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria, particularmente del género *Geobacter*, el cual aumentó 12% respecto al control y mostró importante diversidad al contar con 5 especies: *G. sulfurreducens*, *G. daltonii*, *G. bemidijiensis*, *G. bremensis* y *G. pelophilum*. Las bacterias de la familia Geobacteraceae son conocidas como bacterias desasimilatorias de hierro, las cuales pueden oxidar formiato, butirato, etanol, hidrógeno y acetato de forma acoplada a la reducción de Fe (III), elemento presente en la magnetita, lo que deriva en una mayor proporción de sustrato para los metanógenos. Cabe destacar, que estudios anteriores con cocultivos puros habían demostrado que *Geobacter spp.* junto a *Methanothrix* (metanógeno acetoclástico estricto más abundante en este trabajo) y *Methanosarcina* (que se enriqueció principalmente con la adición de BC) son pares sintróficos que coadyuban en la DIET al recibir directamente electrones para reducir el CO₂ a CH₄ (Wang et al., 2018c).

En la DA anaerobia con biocarbón, destacó el incremento de *Methanosarcina*, el cual es un metanógeno sumamente versátil que puede llevar a cabo las tres vías de formación de metano (hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica) y como se puede observar en la Figura 64, incrementó su proporción con biocarbón y fibra de carbono en un 20.4 y 14% respectivamente. *Methanosarcina barkeri*, la especie presente en el lodo anaerobio extraído de los reactores, se caracteriza por ser, junto a distintas especies del género *Methanothrix*, las que principalmente se han asociado a la formación de gránulos y la interacción más estrecha entre células para transferir electrones extracelulares de forma directa sin la necesidad de mediadores redox como el hidrógeno o formiato (Chiappero et al., 2020).

La digestión asistida por fibra de carbono con magnetita tuvo una diversidad y abundancia microbiana muy similar a la del control. Sin embargo, en este caso se pudo observar un incremento más notable del género *Clostridium*, que pasó de 11.2 a 22.2%. Recientemente Wang et al. (2022b) mostraron evidencia de que este género participa en la oxidación de acetato sintrófico (SAO, por sus siglas en inglés) con metanógenos hidrogenotróficos para la producción y consumo de H₂. En este sentido, el metanógeno que produce CH₄ principalmente por la vía metabólica hidrogenotrófica (H₂/CO₂), *Methanoregula*, se duplicó en el reactor con FC+Fe₃O₄. Methanoregulaceae es una familia de arqueas de lento crecimiento que difícilmente forma estructuras granulares pero que tiene la capacidad de crecer en condiciones hasta de pH 5 (Su et al., 2019), de tal forma que la incorporación de un medio de soporte como fue la fibra, pudo haber mejorado su colonización. Las especies dominantes de este género fueron *Methanoregula boonei* y *Methanoregula formicica*.

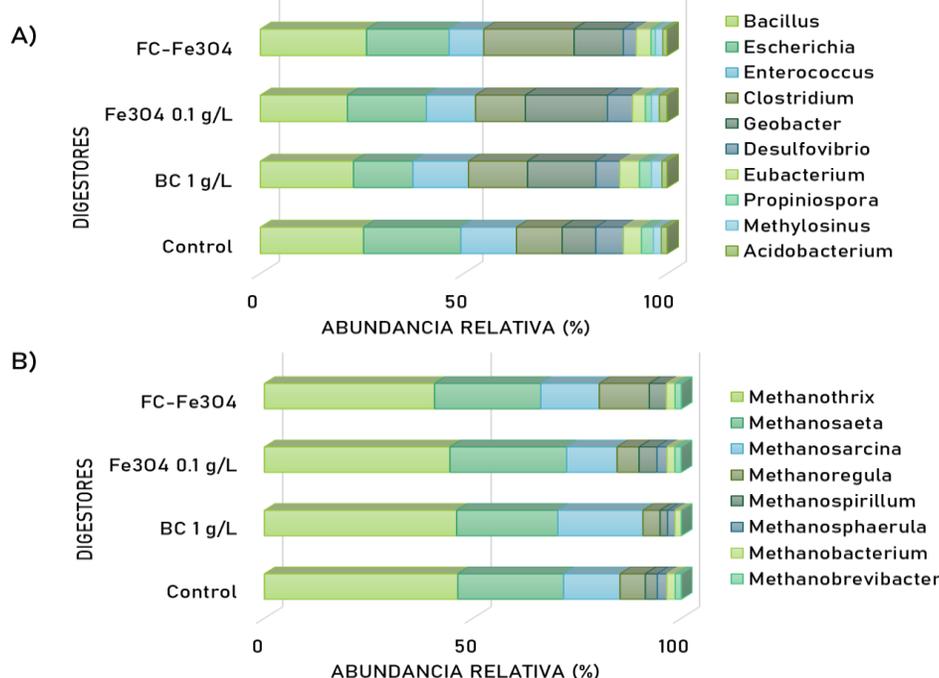


Figura 64. Abundancia relativa de bacterias (A) y arqueas metanogénicas (B) a nivel género con la adición de MC.

Al ser *Methanotherix soehngenii*, *Methanosaeta harundinacea* y *Methanosarcina barkeri* las especies con mayor abundancia relativa en todos los tratamientos, es posible estimar que aproximadamente un 60-70% de la ruta metabólica dominante es la vía acetoclástica, ya que las primeras dos sólo pueden usar el acetato como fuente de carbono para la producción de metano. El mecanismo estimulante para la degradación sintrófica mejorada se puede atribuir principalmente a la evidencia del enriquecimiento de bacterias sintróficas como *Geobacter*. La disminución de metanógenos hidrogenotróficos como *Methanobrevibacter* y *Methanospirillum* y el aumento de metanógenos acetoclásticos como los ya mencionados, constituyen, de acuerdo con Xie *et al.* (2020) un indicador de que la DIET destaca sobre la HIET.

7.10 Análisis proteómico

Derivado de la metodología de purificación de proteínas, el gel 2D SDS-PAGE y el proceso de identificación de proteínas por nano espectrometría de masas, fue posible identificar proteínas funcionales importantes en los procesos catalíticos que pudieron relacionar las rutas metabólicas dominantes en el proceso.

Para este análisis se comparó la adición de magnetita suspendida (1 g/L) con respecto al control de FORSU. Como es posible observar en la Figura 65, bajo las mismas condiciones de operación en los reactores, y el mismo procedimiento de extracción y purificación de las proteínas, se obtuvieron patrones electroforéticos muy semejantes.

Sin embargo, la cantidad de proteínas expresadas con magnetita mejoró sustancialmente y algunas de ellas se regularon al alza cuando se adicionó magnetita. Los cuadros rojos muestran similitudes en la expresión del proteoma y las flechas blancas en la Figura 65B indican las proteínas que con la adición de Fe_3O_4 se intensificaron o formaron parte de las rutas metabólicas.

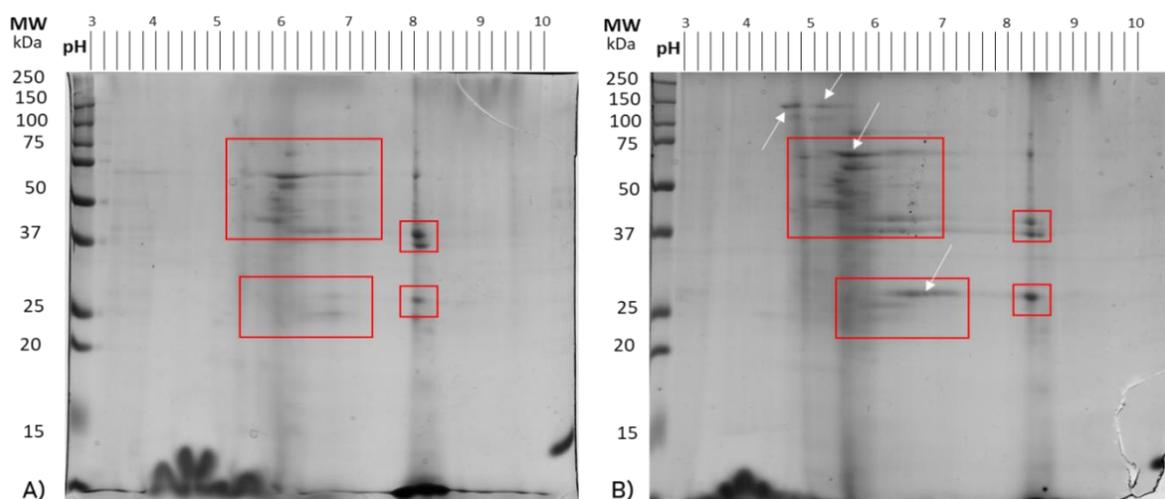


Figura 65. Patrón electroforético 2D del control y el reactor adicionado con magnetita (B).

Por medio de la biblioteca genómica generada con un amplio grupo de bacterias y arqueas metanogénicas, se identificaron las proteínas que representaron la mayor abundancia relativa, al menos del universo analizado. La Figura 67 muestra un mapa de calor con las proteínas más relevantes y los microorganismos asociados a ellas. Cabe señalar que, a partir de repetidas búsquedas, se encontraron más de 400 proteínas en las muestras. Sin embargo, se descartaron aquellas que correspondían a organismos del dominio Eukarya, como ratas, res, pollo, vegetales, frutas, pino y otras especies vegetales identificadas y esperadas debido a la naturaleza del sustrato de digestión. Además, se priorizaron proteínas con funciones catalíticas relevantes, regulación y transporte, en lugar de aquellas proteínas que forman parte de la estructura de las células, centrando el análisis en torno a oxidorreductasas, ligasas y transferasas (principalmente las que corresponden a transporte transmembrana y a donación/aceptación de electrones).

En el proceso de DA estimulado con magnetita, la mayor abundancia fue de las proteínas Acetil coenzima A sintetasa y Acetil CoA descarboxilasa sintasa, fundamentales en la conversión a metano por vía acetoclástica y un intermediario esencial en la unión de vías anabólicas y catabólicas a través de esta ruta. Del mismo modo, 5,10-metilntetrahidrometanopterina reductasa y tetrahidrometanopterina metiltransferasa son proteínas clave en la vía de metanogénesis hidrogenotrófica, para la producción de Metil coenzima M reductasa, presente en las tres rutas metabólicas de

metanogénesis, justo en el paso previo a la conversión final a metano (Harichi *et al.*, 2022). Su ubicación dentro del proceso bioquímico de DA, se muestra a continuación en la Figura 66 enmarcadas en color verde.

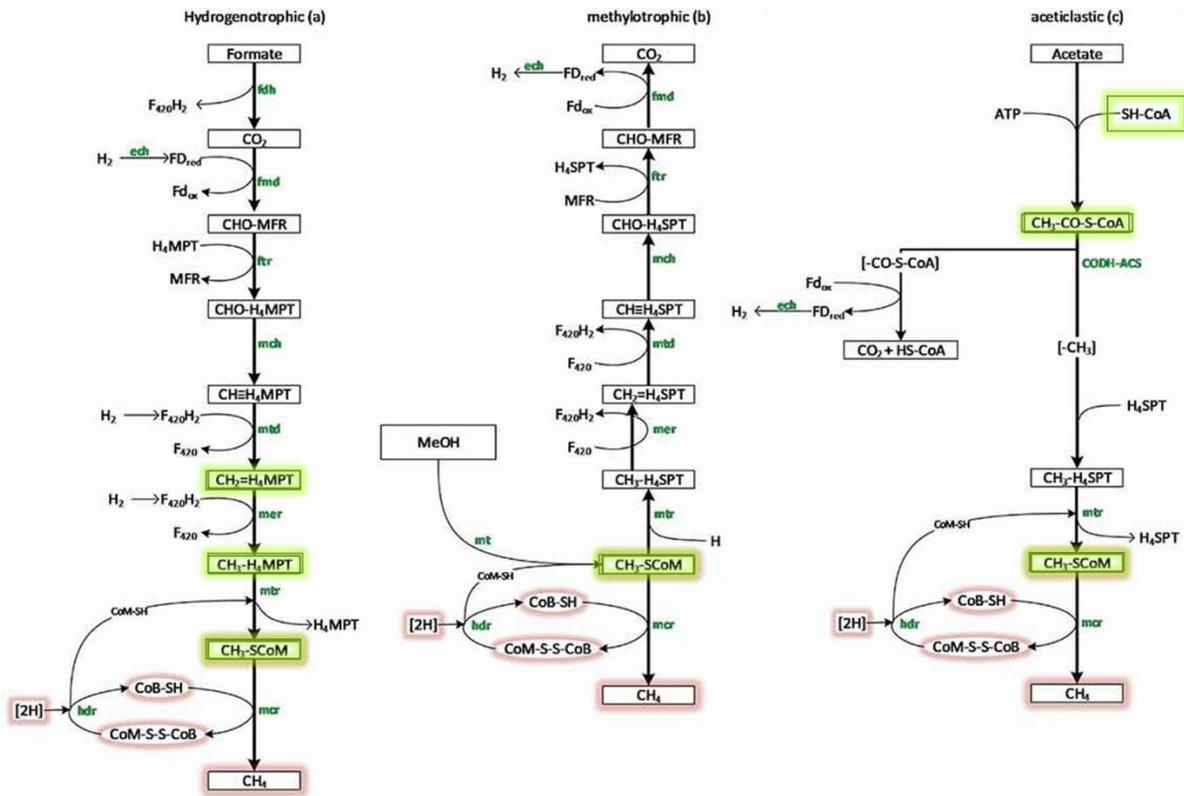


Figura 66. Vías de metanogénesis hidrogenotrófica (A), metilotrófica (B) y acetoclástica (C). Adaptado de Harichi *et al.* (2022).

Otro punto importante, es que una gran cantidad de proteínas con funciones muy variables, encontradas en este trabajo, utilizan metales como cofactores, principalmente Mg, Mn, Zn y Fe, elementos que, como se evidenció en la caracterización de los MC, están presentes, principalmente en el biocarbón, pero también en la magnetita. Los iones metálicos a nivel celular tienen efectos sobre el crecimiento celular, procesos de transporte y deshidrogenasas (Lizama *et al.*, 2019). Tal es el caso, por ejemplo, de fosfoglicerato mutasa, fundamental en la glucogénesis, que depende de Mg y Mn; Acetil coenzima A sintetasa, que tiene como cofactor al Mg, la pirofosfatasa inorgánica dependiente de manganeso, que como su nombre lo dice requiere de este metal para catalizar sus reacciones o la enolasa, que utiliza el Mg también para la degradación de carbohidratos a través de la glucólisis (UNIPROT, 2022), todas ellas presentes en los resultados del análisis.

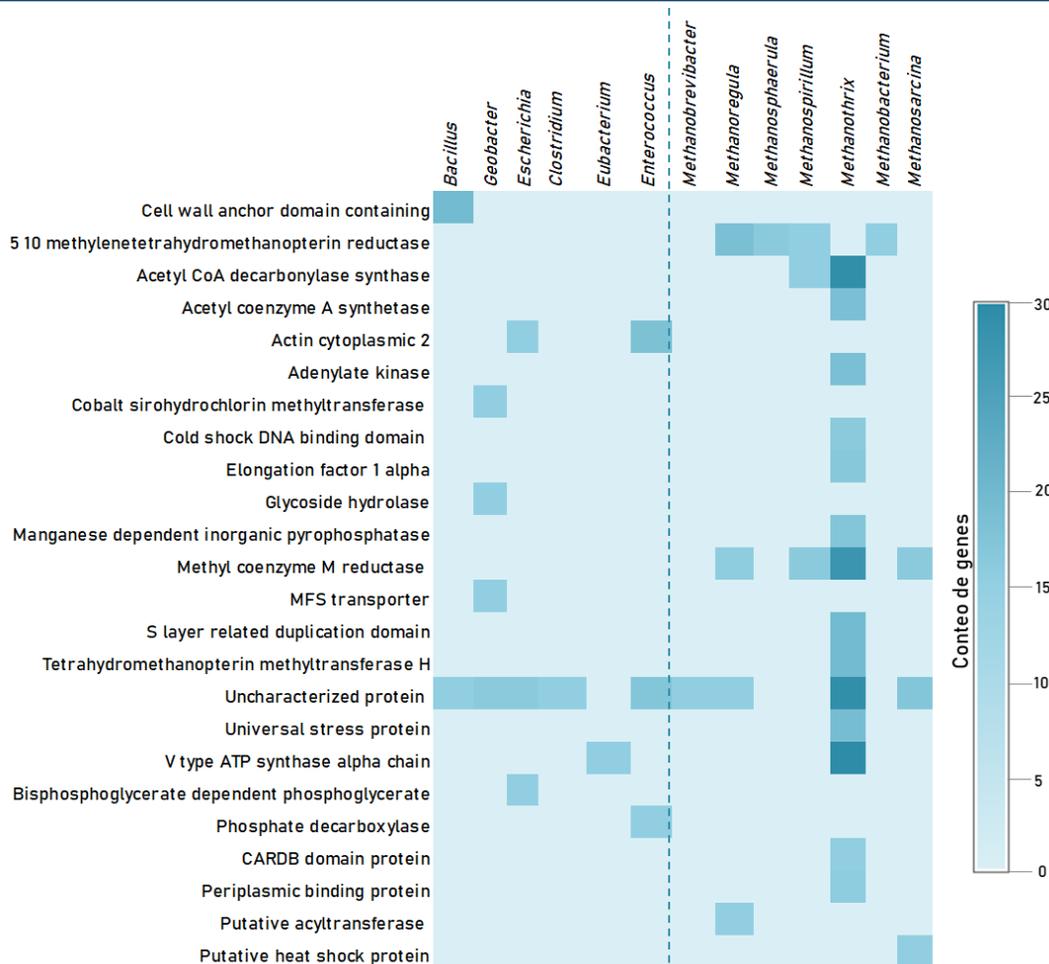


Figura 67. Mapa de calor para las proteínas más abundantes y los microorganismos asociados.

El hierro es fundamental como elemento para mantener la estabilidad anaerobia, principalmente como cofactor de la monóxido de carbono deshidrogenasa, que es una enzima que interviene en el consumo de ácido acético; así como la presencia de hierro en varias hidrogenasas durante la metanogénesis y oxidación del propionato (Qiang *et al.*, 2012). A través del análisis también se puso en evidencia la actividad de la enzima transportador MFS de *Geobacter sulfurreducens*, una transferasa transmembrana capaz de mandar electrones desde el acetato hasta las Fe (III) reductasas terminales en la membrana externa, así como tiene también la capacidad de transferir electrones desde el acetato hasta sustancias húmicas o moléculas redox presentes en el medio (Lloyd *et al.*, 2006), como es el caso de los contenidos en los materiales conductores analizados en este trabajo. Para *Geobacter* también se observó la presencia de cobalto sirohdroclorina C20 metiltransferasa, una proteína que de acuerdo con la base de datos UNIPROT, participa en la biosíntesis de cobalamina (vitamina B12) y a su vez es esencial para de la síntesis de cofactores como riboflavina o ubiquinona, con actividad catalítica redox fundamental para la degradación completa de los sustratos orgánicos.

Es importante destacar que el género *Methanosarcina*, activó proteínas de choque térmico o “heat shock protein”, así como proteína universal de estrés (universal stress protein), las cuales se regulan al alza cuando una célula se encuentra en un medio ambiente que le provoca cualquier tipo de estrés, como puede ser un cambio drástico de temperatura o presión osmótica, la presencia de sustancias inhibitorias (exceso de AGV, amoníaco, o metales pesados). En este sentido, la proporción de estas proteínas disminuyó con la adición de magnetita en un 7 y 12% respectivamente. En la Tabla 22 se muestran las principales diferencias con respecto al control sin MC para las proteínas más abundantes, resultando evidente, un enriquecimiento de la vía acetoclástica dominada por la actividad de *Methanotherx soehngenii* y *Methanotherx harundinacea*, aunque con una ligera mejora en las proteínas responsables de la conversión por medio de H₂/CO₂ que confirman una mejora en el sintrofismo del sistema.

Tabla 22

Diferencias en la expresión de las proteínas más abundantes con la adición de magnetita respecto al control

Proteína	Regulación (%)
5,10 methylenetetrahydromethanopterin reductase	↑ 9.6
Acetyl CoA decarboxylase synthase	↑ 2.9
Acetyl coenzyme A synthetase	↑ 4.8
Methyl coenzyme M reductase	↑ 18.5
MFS transporter	↑ 11.3
Putative heat shock protein	↓ 7.1
Tetrahydromethanopterin methyltransferase H	↑ 16.5
Universal stress protein	↓ 12.1%

Finalmente, cabe mencionar que del total de proteínas identificadas por el software Global ProteinLynx, 14% fueron proteínas no caracterizadas, las cuales en algunos casos pueden tener información limitada sobre su estructura, secuenciación y función, y aunque es accesible al público en general, se debe manejar con precaución debido a que no han sido revisadas y avaladas por un comité científico, razón por la cual no se analizaron en el presente trabajo.

8. CONCLUSIONES

Con base en la investigación realizada es posible llegar a las siguientes conclusiones:

El carbón activado granular (CAG), el biocarbón (BC) y la magnetita (Fe_3O_4), siendo los tres materiales conductores (MC), poseen propiedades fisicoquímicas que pueden asociarse a un efecto positivo en la producción de metano en el proceso de digestión anaerobia. CAG, BC y Fe_3O_4 confieren un pH básico al medio acuoso que permite mejorar la capacidad de amortiguamiento en el sistema anaerobio y evitar inhibiciones por acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV). Su morfología es apropiada para la colonización de microorganismos y la formación de biopelículas, en sus superficies hay metales alcalinos (K^+ y Na^+), alcalinotérreos (Mg^{2+} y Ca^{2+}) y otros metales (Fe^{3+} y Mn^{2+}), que además de mejorar la capacidad *buffer* aportan oligoelementos esenciales para la actividad metabólica de los microorganismos y cofactores enzimáticos clave en la conversión final a metano. Particularmente los materiales carbonosos presentan diversos grupos funcionales aromáticos, siendo las quinonas las más reconocidas como mediadores redox.

A partir de los controles es posible concluir que los MC, aun cuando poseen un alto contenido de sólidos volátiles (CAG y BC), no son consumidos por los microorganismos en el reactor anaerobio. Por otra parte, los controles con materiales no conductores permiten inferir que el incremento en la producción de biogás no se atribuye exclusivamente a que los microorganismos usen los materiales como matriz inmovilizadora y aunque la conductividad eléctrica tiene significancia, no es el factor determinante en la mejora, puesto que el incremento en el rendimiento no es directamente proporcional al valor de este parámetro.

Los materiales y dosis con mejores resultados y significancia estadística fueron Fe_3O_4 0.1 g/L y BC 1 g/L con un incremento de 30.1% (148.1 mL NCH_4 /g $_{\text{SV}}$) y 20.3% (96.1 mL NCH_4 /g $_{\text{SV}}$) respectivamente. Los tres materiales comparten que, a menores dosis, mayor es el rendimiento de metano. Por el contrario, una dosis alta de BC y una dosis media y alta de CAG reducen su rendimiento por debajo del grupo control. Del modelo modificado de Gompertz se concluye que la fase de latencia es muy reducida, del orden de horas. Para el control de FORSU es de 6 horas y comparado con BC 5 g/L y Fe_3O_4 0.5 g/L, éstos lograron reducir el tiempo de latencia en un 57%, es decir a 2.6 horas. La tasa máxima de producción de metano logra incrementarse en un 20 y 15% con biocarbón 10 g/L y Fe_3O_4 0.1 g/L con respecto al control sin adición de MC y, por su parte, la producción máxima de metano que se obtuvo en los ensayos adicionados con Fe_3O_4 0.1 g/L fue de 604.14 y 618.25 mL NCH_4 /g $_{\text{SV}}$ para los datos modelados y experimentales respectivamente.

La adición de magnetita y biocarbón de forma suspendida permite obtener mejores rendimientos en los parámetros cinéticos más relevantes de la digestión anaerobia (fase de latencia, tasa de producción y rendimiento máximo de metano) con respecto a su



adición al sistema de forma inmovilizada. Si bien con las condiciones probadas no se evidenció un efecto sinérgico superior al combinar dos materiales con propiedades conductoras, adsorbentes, de gran área superficial o con mecanismos DIET distintos, los resultados obtenidos constituyen un punto de partida para futuras investigaciones. Además, los métodos de inmovilización de magnetita y biocarbón sobre fibras no tejidas utilizando impregnación húmeda con revestimiento de quitosano y termofijación permite lograr una mejor retención de los MC.

La incorporación del biocarbón y la magnetita permitieron reducir los valores de potencial redox alrededor de -300 mV lo cual favoreció la degradación de acetato y en general propició mejores capacidades metabólicas en el consorcio microbiano anaerobio. El biocarbón es el MC que acelera en mayor medida la acidificación y la concentración de AGV sin mostrar inhibición y recuperándose más rápidamente manteniendo un proceso estable y con condiciones de pH adecuadas para las arqueas metanogénicas.

La ruta de metanogénesis acetoclástica se mejoró con ambos materiales, enriqueciendo la presencia de bacterias oxidantes de acetato sintróficas como *Geobacter spp.* y arqueas de las familias Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae, particularmente las especies *M. soehngenii*, *M. harundinacea* y *M. barkeri*. Asimismo, se pudo constatar la regulación al alza de proteínas clave en esta vía metabólica como acetil coenzima A sintetasa, acetil CoA descarboxilasa sintasa, metil coenzima M reductasa y transferasas transmembrana capaces de oxidar acetato u otros compuestos orgánicos a partir del Fe (III). Las proteínas universales de estrés (universal stress protein) se regularon a la baja cuando se incorporó magnetita, lo cual es indicativo de un proceso más estable y energética y metabólicamente más adecuado para los microorganismos.

Finalmente, no es posible considerar como único parámetro importante la conductividad de los materiales ni tampoco a la DIET como el fenómeno estimulado exclusivo y causa de las mejoras observadas en el rendimiento del proceso. Por lo tanto, también se deben tomar en cuenta otras propiedades de superficie de los materiales, como su biocompatibilidad, presencia de moléculas redox o microelementos, área de superficie específica, capacidad amortiguadora, entre otras, sin dejar de lado la identificación de las modificaciones en la comunidad microbiana y su actividad metabólica cuando este tipo de materiales se incorporan al sistema de digestión anaerobia.



9. RECOMENDACIONES

En futuros trabajos sobre la digestión anaerobia bioestimulada con materiales conductores se pueden considerar las siguientes recomendaciones.

- Determinar el perfil del biogás mediante cromatografía de gases para obtener información sobre el porcentaje de metano, ya que algunas investigaciones han encontrado que materiales carbonosos como el carbón activado y el biocarbón pueden constituir una estrategia de enriquecimiento del biogás *in situ*. Si esto ocurre, la necesidad de equipos de limpieza y enriquecimiento a mayores escalas podría disminuir y, por ende, reducir costos de operación en una planta.
- Con la finalidad de llegar a resultados más detallados, sería deseable caracterizar el perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) en lugar de únicamente obtener la cantidad de AGV totales, esto permitiría correlacionar mejor los resultados de proteómica obtenidos y poder encontrar mayores evidencias de las rutas metabólicas favorecidas.
- Al día de hoy ya se ha puesto en evidencia por diversos autores la mejora que conlleva la adición de los materiales conductores, principalmente carbonosos y férricos al proceso de digestión anaerobia, sin embargo, sería útil evaluar cómo influyen éstos en la estabilidad de un proceso operado en continuo y con variaciones en la tasa de carga orgánica u otros parámetros típicos en operaciones a gran escala. Asimismo, se vuelve relevante analizar la forma más conveniente de adición de los materiales conductores en un régimen de operación como éste, de tal forma que los materiales conductores no representen un consumible en cada descarga del reactor.
- Finalmente, realizar una simulación del proceso bioestimulado con algún material conductor a escala piloto o industrial sería deseable, sin embargo, para llegar a resultados más precisos, será necesario formular un modelo cinético que describa la digestión anaerobia bioestimulada, ya que, hasta este momento, no existe información al respecto en la literatura. Y adicionalmente, realizar la evaluación económica para verificar su viabilidad.



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adhikari, R. Y., Malvankar, N. S., Tuominen, M. T., Lovley, D. R., 2016. Conductivity of individual *Geobacter pili*. *RSC Advances*, 6(10).
2. Aguilar-Moreno, G. S., Navarro-Cerón, E., Velázquez-Hernández, A., Hernández-Eugenio, G., Aguilar-Méndez, M. Á., Espinosa-Solares, T., 2020. Enhancing methane yield of chicken litter in anaerobic digestion using magnetite nanoparticles. *Renewable Energy*, 147, 204-213.
3. Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2014. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere* 99, 19-33.
4. Akindele, A. A., Sartaj, M., 2018. The toxicity effects of ammonia on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Waste management*, 71, 757-766.
5. Al-Amshawee, S., Yunus, M. Y. B. M., Lynam, J. G., Lee, W. H., Dai, F., & Dakhil, I. H., 2021. Roughness and wettability of biofilm carriers: A systematic review. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101233.
6. Ampese, L. C., Sganzerla, W. G., Ziero, H. D. D., Mudhoo, A., Martins, G., & Forster-Carneiro, T., 2022. Research progress, trends, and updates on anaerobic digestion technology: A bibliometric analysis. *Journal of Cleaner Production*, 331, 130004.
7. Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Van Lier, J. B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water science and technology*, 59(5), 927-934.
8. Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., Stams, A. J., 2011. Biomethanation and its potential. In *Methods in enzymology* (Vol. 494, pp. 327-351). Academic Press.
9. Anwar, N., Wang, W., Zhang, J., Li, Y., Chen, C., Liu, G., & Zhang, R., 2016. Effect of sodium salt on anaerobic digestion of kitchen waste. *Water Science and Technology*, 73(8), 1865-1871.
10. APHA. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater 21a ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Washington D.C., EEUU.
11. Augustin, J. C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000. Significance of Inoculum Size in the Lag Time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4), 1706-1710.
12. Awe, O. W., Zhao, Y., Nzihou, A., Pham Minh, D., Lyczko, N., 2018. Anaerobic co-digestion of food waste and FOG with sewage sludge-realising its potential in Ireland. *International Journal of Environmental Studies*, 75(3), 496-517.
13. Ayaz, M., Feizienė, D., Tilvikienė, V., Akhtar, K., Stulpinaitė, U., & Iqbal, R., 2021. Biochar Role in the Sustainability of Agriculture and Environment. *Sustainability*, 13(3), 1330.
14. Baek, G., Jung, H., Kim, J., Lee, C., 2017. A long-term study on the effect of magnetite supplementation in continuous anaerobic digestion of dairy effluent-magnetic separation and recycling of magnetite. *Bioresour. Technol.* 241, 830-840.
15. Baek, G., Kim, J., Cho, K., Bae, H., Lee, C., 2015. The biostimulation of anaerobic digestion with (semi) conductive ferric oxides: their potential for enhanced biomethanation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(23), 10355-10366.
16. Baek, G., Kim, J., Kim, J., Lee, C., 2018. Role and potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *Energies*, 11(1), 107.

17. Baek, G., Rossi, R., Saikaly, P. E., & Logan, B. E., 2021. The impact of different types of high surface area brush fibers with different electrical conductivity and biocompatibility on the rates of methane generation in anaerobic digestion. *Science of the Total Environment*, 787, 147683.
18. Báez-Santana S. A., 2019. Evaluación de un material adsorbente compuesto de carbón activado en polvo termofijado en un material polimérico para tratar aguas residuales urbanas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
19. Bandosz, T. J., & Ania, C. O., 2006. Surface chemistry of activated carbons and its characterization. In *Interface science and technology* (Vol. 7, pp. 159-229). Elsevier.
20. Barua, S., Dhar, B. R., 2017. Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 244, 698-707.
21. Barua, S., Zakaria, B. S., & Dhar, B. R., 2018. Enhanced methanogenic co-degradation of propionate and butyrate by anaerobic microbiome enriched on conductive carbon fibers. *Bioresource technology*, 266, 259-266.
22. Cabbai, V., Ballico, M., Aneggi, E., Goi, D., 2013. BMP tests of source selected OFMSW to evaluate anaerobic codigestion with sewage sludge. *Waste management*. 33 (7), 1626-1632.
23. Cai, J., He, P., Wang, Y., Shao, L., Lü, F., 2016. Effects and optimization of the use of biochar in anaerobic digestion of food wastes. *Waste Management & Research*, 34(5), 409-416.
24. Capson-Tojo, G., Moscoviz, R., Ruiz, D., Santa-Catalina, G., Trably, E., Rouez, M., Escudié, R., 2018. Addition of granular activated carbon and trace elements to favor volatile fatty acid consumption during anaerobic digestion of food waste. *Bioresource Technology*, 260, 157-168.
25. Chang, I.S., Moon, H.S., Bretschger, O., Jang, J.K., Park, H.I., Neelson, K.H., Kim, B.H., 2006. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (2), 163-177.
26. Chen, S., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Liu, F., Fan, W., Lovley, D. R., 2014. Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Scientific Reports*, 4.
27. Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology*, 99(10), 4044-4064.
28. Cheng, Q., Call, D.F., 2016. Hardwiring microbes: Via direct interspecies electron transfer: Mechanisms and applications. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 968-980.
29. Chiappero, M., Norouzi, O., Hu, M., Demichelis, F., Berruti, F., Di Maria, F., ... & Fiore, S. (2020). Review of biochar role as additive in anaerobic digestion processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110037.
30. Chiu, S. L., Lo, I. M., 2018. Identifying key process parameters for uncertainty propagation in environmental life cycle assessment for sewage sludge and food waste treatment. *Journal of cleaner production*, 174, 966-976.
31. Choong, Y. Y., Norli, I., Abdullah, A. Z., Yhaya, M. F., 2016. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. *Bioresource technology*, 209.
32. Chu, D., Barnes, D. J., 2016. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
33. Cruz, I. A., Chuenchart, W., Long, F., Surendra, K. C., Andrade, L. R. S., Bilal, M., ... & Ferreira, L. F. R., 2022. Application of machine learning in anaerobic digestion: Perspectives and challenges. *Bioresource Technology*, 345, 126433.



34. Dang, Y., Holmes, D. E., Zhao, Z., Woodard, T. L., Zhang, Y., Sun, D., Lovley, D. R., 2016. Enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with carbon-based conductive materials. *Bioresource Technology*, 220, 516–522.
35. Dang, Y., Sun, D., Woodard, T.L., Wang, L.Y., Nevin, K.P., Holmes, D.E., 2017. Stimulation of the anaerobic digestion of the dry organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with carbon-based conductive materials. *Bioresour. Technol.* 238, 30–38.
36. De Bok, F. A. M., Plugge, C. M., Stams, A. J. M., 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*, 38(6), 1368-1375.
37. De La Rubia, M.A., Raposo, F., Rincón, B., Borja, R., 2009. Evaluation of the hydrolytic–acidogenic step of a two-stage mesophilic anaerobic digestion process of sunflower oil cake. *Bioresour. Technol.* 100, 4133–4138.
38. DiLallo, R., Albertson, O. E., 1961. Volatile Acids by Direct Titration. *Water Pollution Control Federation*. 33 (4), 356-365.
39. Do, X. H., & Lee, B. K., 2013. Removal of Pb²⁺ using a biochar–alginate capsule in aqueous solution and capsule regeneration. *Journal of environmental management*, 131, 375-382.
40. Dong, Y. D., Zhang, H., Zhong, G. J., Yao, G., & Lai, B. (2021). Cellulose/carbon composites and their applications in water treatment—a review. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126980.
41. Dubé, C. D., Guiot, S. R., 2015. Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: a review. In *Biogas Science and Technology* (pp. 101-115). Springer, Cham.
42. 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 (3), 350-356.
43. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L., 2017. A practical beginner’s guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197-206.
44. El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., Gorby, Y. A., 2010. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18127-18131.
45. European Biogas Association Statistical Report, 2020. <https://www.europeanbiogas.eu/eba-statistical-report-2020/>
46. Fagbohunbe, M. O., Herbert, B. M. J., Hurst, L., Ibeto, C. N., Li, H., Usmani, S. Q., Semple, K. T., 2017. The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. *Waste Management*, 61, 236–249.
47. Fisgativa, H., Tremier, A., Dabert, P., 2016. Characterizing the variability of food waste quality: A need for efficient valorisation through anaerobic digestion. *Waste management*, 50, 264-274.
48. Fu, L., Zhou, T., Wang, J., You, L., Lu, Y., Yu, L., Zhou, S., 2019. NanoFe₃O₄ as solid electron shuttles to accelerate acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *Frontiers in microbiology*, 10.
49. Gadhamshetty, V., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., Johnson, D. C., 2010. Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model international journal of hydrogen energy, 35(2), 479-490.
50. Ge, X., Matsumoto, T., Keith, L., Li, Y., 2014. Biogas energy production from tropical biomass wastes by anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 169, 38–44.
51. Ghanimeh, S., Khalil, C. A., Mosleh, C. B., Habchi, C., 2018. Optimized anaerobic-aerobic sequential system for the treatment of food waste and wastewater. *Waste Management*, 71, 767-774.
52. Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95.



53. Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (30), 11358-11363.
54. Gujer, W., Zehnder, A. J., 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water science and technology*, 15(8-9), 127-167.
55. Guskos, N., Papadopoulos, G. J., Likodimos, V., Patapis, S., Yarmis, D., Przepiera, A., Aidinis, K., 2002. Photoacoustic, EPR and electrical conductivity investigations of three synthetic mineral pigments: hematite, goethite and magnetite. *Materials Research Bulletin*, 37(6), 1051-1061.
56. Hao, X., Wei, J., van Loosdrecht, M. C., & Cao, D. (2017). Analysing the mechanisms of sludge digestion enhanced by iron. *Water research*, 117, 58-67.
57. Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojoumi, S. A., Parchami, M., Parchami, M., Taherzadeh, M. J., 2022. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. *Bioengineered*, 13(3), 6521-6557.
58. Hassaneen, F. Y., Abdallah, M. S., Ahmed, N., Taha, M. M., Abd ElAziz, S. M. M., El-Mokhtar, M. A., ... & Allam, N. K., 2020. Innovative nanocomposite formulations for enhancing biogas and biofertilizers production from anaerobic digestion of organic waste. *Bioresource technology*, 309, 123350.
59. Hobbs, S. R., Landis, A. E., Rittmann, B. E., Young, M. N., Parameswaran, P., 2018. Enhancing anaerobic digestion of food waste through biochemical methane potential assays at different substrate: inoculum ratios. *Waste Management*, 71, 612-617.
60. Ishii, S. I., Kosaka, T., Hori, K., Hotta, Y., Watanabe, K., 2005. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 7838-7845.
61. Jaafar, N. M., Clode, P. L., Abbott, L. K., 2014. Microscopy observations of habitable space in biochar for colonization by fungal hyphae from soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(3), 483-490.
62. Jiang, Q., Liu, H., Zhang, Y., Cui, M. H., Fu, B., & Liu, H. B. (2021). Insight into sludge anaerobic digestion with granular activated carbon addition: methanogenic acceleration and methane reduction relief. *Bioresource Technology*, 319, 124131.
63. Jin, Z., Zhao, Z., & Zhang, Y., 2019. Potential of direct interspecies electron transfer in synergetic enhancement of methanogenesis and sulfate removal in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor with magnetite. *Science of The Total Environment*, 677, 299-306.
64. Jing, Y., Wan, J., Angelidaki, I., Zhang, S., Luo, G., 2017. iTRAQ quantitative proteomic analysis reveals the pathways for methanation of propionate facilitated by magnetite. *Water research*, 108, 212-221.
65. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., Johnson, M. K., 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 247-281.
66. Jung, M. J., Kim, J. W., Im, J. S., Park, S. J., Lee, Y. S., 2009. Nitrogen and hydrogen adsorption of activated carbon fibers modified by fluorination. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15(3), 410-414.
67. Júnior, A. D. N. F., Koyama, M. H., de Araújo Júnior, M. M., Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renewable Energy*, 89, 245-252.
68. Kanaujia, N., & Singh, J., 2022. Composition, characteristics and challenges of OFMSW for biogas production: Influence of mechanism and operating parameters to improve digestion process. In *Advanced Organic Waste Management* (pp. 207-223). Elsevier.



69. Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environmental microbiology*, 14(7), 1646-1654.
70. Kato, S., Nakamura, R., Kai, F., Watanabe, K., Hashimoto, K., 2010. Respiratory interactions of soil bacteria with (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environmental microbiology*, 12(12), 3114-3123.
71. Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., Van Woerden, F., 2018. What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050. World Bank Publications.
72. Kim, M. J., Kim, S. H., 2017. Minimization of diauxic growth lag-phase for high-efficiency biogas production. *Journal of Environmental management*, 187, 456-463.
73. Kim, N. K., Lee, S. H., Kim, Y., & Park, H. D., 2022. Current understanding and perspectives in anaerobic digestion based on genome-resolved metagenomic approaches. *Bioresource technology*, 344, 126350.
74. Klüpfel, L., Keiluweit, M., Kleber, M., Sander, M., 2014. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environmental science & technology*, 48(10), 5601-5611.
75. Koch, K., Helmreich, B., Drewes, J. E., 2015. Co-digestion of food waste in municipal wastewater treatment plants: effect of different mixtures on methane yield and hydrolysis rate constant. *Applied Energy*, 137, 250-255.
76. Komnitsas, K., Zaharaki, D., Pylotis, I., Vamvuka, D., Bartzas, G., 2015. Assessment of pistachio shell biochar quality and its potential for adsorption of heavy metals. *Waste Biomass Valorization* 6 (5), 805-816.
77. Kornilitsina, E. V., Lebedeva, E. A., Astaf'eva, S. A., & Trukhinov, D. K., 2021. Modification of carbon fiber by magnetite particles. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1047, No. 1, p. 012051). IOP Publishing.
78. Kulikova, N. A., & Perminova, I. V., 2021. Interactions between Humic Substances and Microorganisms and Their Implications for Nature-like Bioremediation Technologies. *Molecules*, 26(9), 2706.
79. Kwak, H. W., Hong, Y., Lee, M. E., & Jin, H. J., 2018. Sericin-derived activated carbon-loaded alginate bead: An effective and recyclable natural polymer-based adsorbent for methylene blue removal. *International journal of biological macromolecules*, 120, 906-914.
80. Le, T. X. H., Bechelany, M., & Cretin, M., 2017. Carbon felt based-electrodes for energy and environmental applications: A review. *Carbon*, 122, 564-591.
81. Lebuhn, M., Weiß, S., Munk, B., Guebitz, G. M., 2015. Microbiology and molecular biology tools for biogas process analysis, diagnosis and control. In *Biogas Science and Technology* (pp. 1-40). Springer, Cham.
82. Lee, J. Y., Lee, S. H., Park, H. D., 2016. Enrichment of specific electro-active microorganisms and enhancement of methane production by adding granular activated carbon in anaerobic reactors. *Bioresource technology*, 205, 205-212.
83. Lei, Y., Sun, D., Dang, Y., Chen, H., Zhao, Z., Zhang, Y., Holmes, D. E., 2016. Stimulation of methanogenesis in anaerobic digesters treating leachate from a municipal solid waste incineration plant with carbon cloth. *Bioresource technology*, 222, 270-276.
84. León-García, G. J., Razo-Flores, E., Cervantes, F. J., 2007. Propiedades catalíticas del humus y su potencial aplicación en la degradación de contaminantes prioritarios. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3(2), 118-128.
85. Li, D., Song, L., Fang, H., Li, P., Teng, Y., Li, Y. Y., Niu, Q., 2019. Accelerated bio-methane production rate in thermophilic digestion of cardboard with appropriate biochar: Dose-response kinetic assays, hybrid synergistic mechanism, and microbial networks analysis. *Bioresource technology*, 290, 121782.



86. Li, G. Z., Vissers, J. P., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V., Geromanos, S. J., 2009. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, 9(6), 1696-1719.
87. Li, H., Chang, J., Liu, P., Fu, L., Ding, D., Lu, Y., 2015. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments. *Environmental microbiology*, 17(5), 1533-1547.
88. Li, L., Wang, J., Zhou, J., Yang, F., Jin, C., Qu, Y., ... & Zhang, L., 2008. Enhancement of nitroaromatic compounds anaerobic biotransformation using a novel immobilized redox mediator prepared by electropolymerization. *Bioresource Technology*, 99(15), 6908-6916.
89. Li, L., Wang, J., Zhou, J., Yang, F., Jin, C., Qu, Y., Zhang, L., 2008. Enhancement of nitroaromatic compounds anaerobic biotransformation using a novel immobilized redox mediator prepared by electropolymerization. *Bioresource technology*, 99(15), 6908-6916.
90. Li, Y., Wang, Z., Jiang, Z., Feng, L., Pan, J., Zhu, M., ... & Liu, H., 2022. Bio-based carbon materials with multiple functional groups and graphene structure to boost methane production from ethanol anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 344, 126353.
91. Linville, J. L., Shen, Y., Ignacio-de Leon, P. A., Schoene, R. P., Urgun-Demirtas, M., 2017. In-situ biogas upgrading during anaerobic digestion of food waste amended with walnut shell biochar at bench scale. *Waste Management & Research*, 35(6), 669-679.
92. Liu, C., Ye, J., Lin, Y., Wu, J., Price, G. W., Burton, D., & Wang, Y., 2020. Removal of Cadmium (II) using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biochar alginate beads in aqueous solutions. *Environmental Pollution*, 264, 114785.
93. Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., Lovley, D. R., 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy & Environmental Science*, 5(10), 8982-8989.
94. Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., Lovley, D. R., 2015. Magnetite compensates for the lack of a pilin-associated c-type cytochrome in extracellular electron exchange. *Environmental microbiology*, 17(3), 648-655.
95. Liu, S. (2017). How Cells Grow. *Bioprocess Engineering*, 629-697.
96. Lizama, A. C., Figueiras, C. C., Pedreguera, A. Z., & Espinoza, J. E. R., 2019. Enhancing the performance and stability of the anaerobic digestion of sewage sludge by zero valent iron nanoparticles dosage. *Bioresource technology*, 275, 352-359.
97. Lloyd, J. R., Leang, C., Myerson, A. L. H., Coppi, M. V., Cui, S., Methe, B., ... & Lovley, D. R., 2003. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal*, 369(1), 153-161.
98. Lovley, D. R., 2017. Happy together: microbial communities that hook up to swap electrons. *The ISME journal*, 11(2), 327.
99. Lovley, D. R., Phillips, E. J., 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(6), 1472-1480.
100. Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., Holmes, D. E., 2011. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 59, pp. 1-100). Academic Press.
101. Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C., 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382 (6590), 445e448.
102. Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A., Thommes, M., 2012. Characterization of porous solids and powders: surface area, pore size and density (Vol. 16). Springer Science & Business Media.



103. Lü, F., Luo, C., Shao, L., He, P., 2016. Biochar alleviates combined stress of ammonium and acids by firstly enriching *Methanosaeta* and then *Methanosarcina*. *Water research*, 90, 34-43.
104. Lu, J. S., Chang, J. S., & Lee, D. J., 2020. Adding carbon-based materials on anaerobic digestion performance: a mini-review. *Bioresource technology*, 300, 122696.
105. Luo, C., Lü, F., Shao, L., He, P., 2015. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes. *Water research*, 68, 710-718.
106. Luo, D., Yu, Q. W., Yin, H. R., & Feng, Y. Q., 2007. Humic acid-bonded silica as a novel sorbent for solid-phase extraction of benzo [a] pyrene in edible oils. *Analytica chimica acta*, 588(2), 261-267.
107. Luz, F. C., Cordiner, S., Manni, A., Mulone, V., Rocco, V., 2018. Biochar characteristics and early applications in anaerobic digestion-a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 2892-2909.
108. Madar, D., Dekel, E., Bren, A., Zimmer, A., Porat, Z., Alon, U., 2013. Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC systems biology*, 7(1), 136.
109. 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.
110. Martínez, C. M., Álvarez, L. H., Celis, L. B., & Cervantes, F. J., 2013. Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(24), 10293-10308.
111. Martins, G., Salvador, A. F., Pereira, L., Alves, M. M., 2018. Methane production and conductive materials: a critical review. *Environmental science & technology*, 52(18), 10241-10253.
112. Masebinu, S. O., Akinlabi, E. T., Muzenda, E., Aboyade, A. O., 2019. A review of biochar properties and their roles in mitigating challenges with anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 103, 291-307.
113. Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., Astals, S., 2014. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and sustainable energy reviews*, 36, 412-427.
114. McGlynn, S. E., Chadwick, G. L., Kempes, C. P., Orphan, V. J., 2015. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia. *Nature*, 526(7574), 531.
115. Mehariya, S., Patel, A. K., Obulisamy, P. K., Punniyakotti, E., Wong, J. W., 2018. Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. *Bioresource technology*, 265, 519-531.
116. Mei, R., Nobu, M. K., Narihiro, T., Yu, J., Sathyagal, A., Willman, E., Liu, W. T., 2018. Novel *Geobacter* species and diverse methanogens contribute to enhanced methane production in media-added methanogenic reactors. *Water research*, 147, 403-412.
117. Melosi, M. V., 2008. The sanitary city: Environmental services in urban America from colonial times to the present. University of Pittsburgh Pre.ch.2015.05.007
118. Mirjalili, M. (2019). Comparison of different synthesis methods for immobilization of magnetite nanoparticles on hydrolysed polyester fabric. *Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)*, 44(2), 141-147.
119. Modestra, J. A., Reddy, C. N., Krishna, K. V., Min, B., & Mohan, S. V., 2020. Regulated surface potential impacts bioelectrogenic activity, interfacial electron transfer and microbial dynamics in microbial fuel cell. *Renewable Energy*, 149, 424-434.



120. Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J., Plugge, C. M., 2010. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environmental microbiology reports*, 2(4), 489-499.
121. Muratçobanoğlu, H., Gökçek, Ö. B., Mert, R. A., Zan, R., Demirel, S., 2020. Simultaneous synergistic effects of graphite addition and co-digestion of food waste and cow manure: biogas production and microbial community. *Bioresource Technology*, 123365.
122. Myers, C. R., Nealson, K. H., 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 240(4857), 1319-1321.
123. Nevzorova, T., & Kutcherov, V., 2019. Barriers to the wider implementation of biogas as a source of energy: A state-of-the-art review. *Energy Strategy Reviews*, 26, 100414.
124. Ngo, T., Shahsavari, E., Shah, K., Surapaneni, A., & Ball, A. S., 2022. Improving bioenergy production in anaerobic digestion systems utilising chicken manure via pyrolysed biochar additives: A review. *Fuel*, 316, 123374.
125. Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., Nghiem, L. D., 2018. Microbial Community in Anaerobic Digestion System: Progression in Microbial Ecology. In *Water and Wastewater Treatment Technologies* (pp. 331-355). Springer, Singapore.
126. Park, J. H., Park, J. H., Lee, S. H., Jung, S. P., & Kim, S. H., 2020. Enhancing anaerobic digestion for rural wastewater treatment with granular activated carbon (GAC) supplementation. *Bioresource Technology*, 315, 123890.
127. Park, J.H., Kang, H.J., Park, K.H., Park, H.D., 2018. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. *Bioresour. Technol.* 254, 300–311.
128. Park, J.H., Park, J.H., Je Seong, H., Sul, W.J., Jin, K.H., Park, H.D., 2018b. Metagenomic insight into methanogenic reactors promoting direct interspecies electron transfer via granular activated carbon. *Bioresour. Technol.* 259, 414–422.
129. Pérez, A., Torres, P. 2008. Índices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Ingeniería y competitividad*. 10 (2), 1-52.
130. Poschet, F., Bernaerts, K., Geeraerd, A. H., Scheerlinck, N., Nicolai, B. M., Van Impe, J. F., 2004. Sensitivity analysis of microbial growth parameter distributions with respect to data quality and quantity by using Monte Carlo analysis. *Mathematics and Computers in Simulation*, 65(3), 231-243.
131. Qambrani, N. A., Rahman, M. M., Won, S., Shim, S., Ra, C., 2017. Biochar properties and eco-friendly applications for climate change mitigation, waste management, and wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 255-273.
132. Qiang, H., Lang, D. L., & Li, Y. Y., 2012. High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with an emphasis on Iron, Cobalt, and Nickel requirements. *Bioresource technology*, 103(1), 21-27.
133. Raposo, F., Banks, C. J., Siegert, I., Heaven, S., Borja, R., 2006. Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry*, 41(6), 1444-1450.
134. Rasit, N., Idris, A., Harun, R., Ghani, W. A. W. A. K., 2015. Effects of lipid inhibition on biogas production of anaerobic digestion from oily effluents and sludges: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 351-358.
135. Ren, Y., Yu, M., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Huang, Q., Liu, Y., 2018. A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. *Bioresource technology*, 247, 1069-1076.



136. Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D., ... Peck, M. W., 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*, 194(3), 686-701.
137. Romero, R. M., Valenzuela, E. I., Cervantes, F. J., Garcia-Reyes, R. B., Serrano, D., & Alvarez, L. H. (2020). Improved methane production from anaerobic digestion of liquid and raw fractions of swine manure effluent using activated carbon. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101576.
138. Saiful Amran, S. N. B., Wongso, V., Abdul Halim, N. S., Husni, M. K., Sambudi, N. S., & Wirzal, M. D. H. (2019). Immobilized carbon-doped TiO₂ in polyamide fibers for the degradation of methylene blue. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 7(3), 321-330.
139. Saquing, J. M., Yu, Y. H., Chiu, P. C., 2016. Wood-derived black carbon (biochar) as a microbial electron donor and acceptor. *Environmental Science & Technology Letters*, 3(2), 62-66.
140. Scholz, F., 2010. *Electroanalytical methods* (Vol. 1). Berlin: Springer.
141. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2020. *Diagnóstico Básico para la Gestión Integral de los Residuos*. Gobierno de México, México.
142. Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA), 2019. *Inventario de residuos sólidos de la Ciudad de México 2019*. Gobierno de la Ciudad de México, México.
143. Shahriari, H., Warith, M., Hamoda, M., Kennedy, K. J., 2012. Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. *Waste Management*, 32(1), 41-52.
144. Shahzeydi, A., Ghiaci, M., Jameie, L., & Panjepour, M., 2019. Immobilization of N-doped carbon porous networks containing copper nanoparticles on carbon felt fibers for catalytic applications. *Applied Surface Science*, 485, 194-203.
145. Shen, R., Jing, Y., Feng, J., Luo, J., Yu, J., Zhao, L., 2020. Performance of enhanced anaerobic digestion with different pyrolysis biochars and microbial communities. *Bioresource technology*, 296, 122354.
146. Shen, Y., Linville, J. L., Urgun-Demirtas, M., Schoene, R. P., Snyder, S. W., 2015. Producing pipeline-quality biomethane via anaerobic digestion of sludge amended with corn stover biochar with in-situ CO₂ removal. *Applied energy*, 158, 300-309.
147. Shen, Y., Yin, C., Li, C., & Zhu, N. (2022). Biomethane production from waste activated sludge promoted by sludge incineration bottom ash: The distinctive role of metal cations and inert fractions. *Science of The Total Environment*, 153147.
148. Shi, Y., Liu, M., Li, J., Yao, Y., Tang, J., & Niu, Q., 2022. The dosage-effect of biochar on anaerobic digestion under the suppression of oily sludge: Performance variation, microbial community succession and potential detoxification mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126819.
149. Stams, A. J., Plugge, C. M., 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 568.
150. Stevenson, F. J., 1994. *Humus chemistry: genesis, Composition, Reactions*, 2nd ed. Wiley, New York.
151. Su, C., Zhao, L., Liao, L., Qin, J., Lu, Y., Deng, Q., ... & Huang, Z., 2019. Application of biochar in a CIC reactor to relieve ammonia nitrogen stress and promote microbial community during food waste treatment. *Journal of Cleaner Production*, 209, 353-362.
152. Su, Y., Zhang, Y., Wang, J., Zhou, J., Lu, X., & Lu, H., 2009. Enhanced bio-decolorization of azo dyes by co-immobilized quinone-reducing consortium and anthraquinone. *Bioresource Technology*, 100(12), 2982-2987.



153. Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., Lovley, D. R., 2010. Direct Exchange of Electrons Within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria. *Science*, 330(6009), 1413–1415.
154. Tambone, F., Scaglia, B., D’Imporzano, G., Schievano, A., Orzi, V., Salati, S., Adani, F., 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion through a comparative study with digested sludge and compost. *Chemosphere*, 81(5), 577-583.
155. Tan, L. C., Lin, R., Murphy, J. D., & Lens, P. N. (2021). Granular activated carbon supplementation enhances anaerobic digestion of lipid-rich wastewaters. *Renewable Energy*, 171, 958-970.
156. Tao, J., Qin, L., Liu, X., Li, B., Chen, J., You, J., Chen, X., 2017. Effect of granular activated carbon on the aerobic granulation of sludge and its mechanism. *Bioresource technology*, 236, 60-67.
157. Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., de Carvalho, C. C., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241.
158. Tyagi, V. K., Fdez-Güelfo, L. A., Zhou, Y., Álvarez-Gallego, C. J., Garcia, L. I. R., Ng, W. J., 2018. Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 380–399.
159. Uddin, M. M., & Wright, M. M., 2022. Anaerobic digestion fundamentals, challenges, and technological advances. *Physical Sciences Reviews*.
160. Van Der Zee, F. P., Bisschops, I. A., Lettinga, G., Field, J. A., 2003. Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes. *Environmental science & technology*, 37(2), 402-408.
161. Van Zwieten, L., Kimber, S., Morris, S., Chan, K. Y., Downie, A., Rust, J., Cowie, A., 2010. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and soil*, 327(1-2), 235-246.
162. Venkiteswaran, K., Bocher, B., Maki, J., Zitomer, D., 2015. Relating anaerobic digestion microbial community and process function: supplementary issue: water microbiology. *Microbiology insights*, 8, MBI-S33593.
163. Viggi, C. C., Simonetti, S., Palma, E., Pagliaccia, P., Braguglia, C., Fazi, S., Harnisch, F., 2017. Enhancing methane production from food waste fermentate using biochar: the added value of electrochemical testing in pre-selecting the most effective type of biochar. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 303.
164. Wang, C., Liu, Y., Gao, X., Chen, H., Xu, X., & Zhu, L., 2018c. Role of biochar in the granulation of anaerobic sludge and improvement of electron transfer characteristics. *Bioresource technology*, 268, 28-35.
165. Wang, G., Li, Q., Gao, X., Wang, X.C., 2018. Synergetic promotion of syntrophic methane production from anaerobic digestion of complex organic wastes by biochar: Performance and associated mechanisms. *Bioresour. Technol.* 250, 812–820.
166. Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., Jiang, B., 2018b. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review. *Bioresource technology*, 248, 29-36.
167. Wang, Y., Wang, Z., Wang, L., Peng, J., Kou, X., Gao, L., ... & Zhao, K., 2022. Effects of Calamus-Derived Biochar on the Thermophilic Anaerobic Digestion of Long-SRT Waste Activated Sludge from the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.



168. Wang, Z., Wang, T., Si, B., Watson, J., & Zhang, Y., 2021. Accelerating anaerobic digestion for methane production: Potential role of direct interspecies electron transfer. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 145, 111069.
169. Wang, Z., Zhang, C., Watson, J., Sharma, B. K., Si, B., & Zhang, Y., 2022b. Adsorption or direct interspecies electron transfer? A comprehensive investigation of the role of biochar in anaerobic digestion of hydrothermal liquefaction aqueous phase. *Chemical Engineering Journal*, 435, 135078.
170. Wei, J., Hao, X., van Loosdrecht, M. C., & Li, J., 2018. Feasibility analysis of anaerobic digestion of excess sludge enhanced by iron: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 89, 16-26.
171. Wu, L. K., Wu, H., Zhang, H. B., Cao, H. Z., Hou, G. Y., Tang, Y. P., & Zheng, G. Q., 2018. Graphene oxide/CuFe₂O₄ foam as an efficient absorbent for arsenic removal from water. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1808-1819.
172. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., Kim, W.S., 2015. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2), 023501.
173. Xiao, L., Liu, F., Liu, J., Li, J., Zhang, Y., Yu, J., Wang, O., 2018. Nano-Fe₃O₄ particles accelerating electromethanogenesis on an hour-long timescale in wetland soil. *Environ. Sci. Nano* 5, 436-445.
174. Xie, S., Li, X., Wang, C., Kulandaivelu, J., & Jiang, G., 2020. Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: Performance and mechanisms. *Bioresource Technology*, 316, 123970.
175. Xu, F., Li, Y., Ge, X., Yang, L., Li, Y., 2018. Anaerobic digestion of food waste—challenges and opportunities. *Bioresource technology*, 247, 1047-1058.
176. Xu, S., He, C., Luo, L., Lü, F., He, P., & Cui, L., 2015. Comparing activated carbon of different particle sizes on enhancing methane generation in upflow anaerobic digester. *Bioresource technology*, 196, 606-612.
177. Yan, W., Zhang, L., Wijaya, S. M., & Zhou, Y., 2020. Unveiling the role of activated carbon on hydrolysis process in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 296, 122366.
178. Yan, W., Zhang, L., Wijaya, S. M., Zhou, Y., 2020. Unveiling the role of activated carbon on hydrolysis process in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 296, 122366.
179. Yang, C., Wu, J., Hou, Y., 2011. Fe₃O₄ nanostructures: synthesis, growth mechanism, properties and applications. *Chemical Communications*, 47(18), 5130-5141.
180. Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C., 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12-13), 1781-1788.
181. Yang, Y., Zhang, Y., Li, Z., Zhao, Z., Quan, X., Zhao, Z., 2017. Adding granular activated carbon into anaerobic sludge digestion to promote methane production and sludge decomposition. *Journal of Cleaner Production*, 149, 1101-1108.
182. Yousuf, A., Khan, M. R., Pirozzi, D., Ab Wahid, Z., 2016. Financial sustainability of biogas technology: Barriers, opportunities, and solutions. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy*, 11(9), 841-848.
183. Yuan, S. Z., Lu, H., Wang, J., Zhou, J. T., Wang, Y., & Liu, G. F., 2012. Enhanced biodecolorization of azo dyes by quinone-functionalized ceramsites under saline conditions. *Process Biochemistry*, 47(2), 312-318.
184. Yuan, T., Yuan, Y., Zhou, S., Li, F., Liu, Z., Zhuang, L., 2011. A rapid and simple electrochemical method for evaluating the electron transfer capacities of dissolved organic matter. *Journal of Soils and Sediments*, 11(3), 467-473.



185. Yun, S., Xing, T., Han, F., Shi, J., Wang, Z., Fan, Q., & Xu, H., 2021. Enhanced direct interspecies electron transfer with transition metal oxide accelerants in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 320, 124294.
186. Zhang, H., & Zhu, G., 2012. One-step hydrothermal synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles immobilized on polyamide fabric. *Applied Surface Science*, 258(11), 4952-4959.
187. Zhang, J., Zhao, W., Zhang, H., Wang, Z., Fan, C., & Zang, L., 2018. Recent achievements in enhancing anaerobic digestion with carbon-based functional materials. *Bioresource technology*, 266, 555-567.
188. Zhang, L., Jahng, D., 2012. Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Manage.* 32 (8), 1509-1515.
189. Zhang, P., Zheng, S., Liu, J., Wang, B., Liu, F., Feng, Y., 2018b. Surface properties of activated sludge-derived biochar determine the facilitating effects on *Geobacter* co-cultures. *Water research*, 142, 441-451.
190. Zhang, S., Li, X. Y., & Chen, J. P., 2010. Preparation and evaluation of a magnetite-doped activated carbon fiber for enhanced arsenic removal. *Carbon*, 48(1), 60-67.
191. Zhang, S., Li, X. Y., & Chen, J. P., 2010b. An XPS study for mechanisms of arsenate adsorption onto a magnetite-doped activated carbon fiber. *Journal of colloid and interface science*, 343(1), 232-238.
192. Zhang, Y., Wang, J., & Feng, Y., 2021. The effects of biochar addition on soil physicochemical properties: a review. *Catena*, 202, 105284.
193. Zhang, Y., Zhang, L., Yu, N., Guo, B., & Liu, Y., 2022. Enhancing the resistance to H₂S toxicity during anaerobic digestion of low-strength wastewater through granular activated carbon (GAC) addition. *Journal of Hazardous Materials*, 430, 128473.
194. Zhao, Z., Li, Y., Quan, X., Zhang, Y., 2017. Towards engineering application: Potential mechanism for enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with different types of conductive materials. *Water Research*, 115, 266-277.
195. Zhao, Z., Zhang, Y., Woodard, T. L., Nevin, K. P., Lovley, D. R., 2015. Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials. *Bioresource technology*, 191, 140-145.
196. Zhao, Z., Zhang, Y., Yu, Q., Dang, Y., Li, Y., Quan, X., 2016. Communities stimulated with ethanol to perform direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate. *Water research*, 102, 475-484.
197. Ziganshina, E. E., Bulynina, S. S., & Ziganshin, A. M., 2022. Impact of Granular Activated Carbon on Anaerobic Process and Microbial Community Structure during Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion of Chicken Manure. *Sustainability*, 14(1), 447.

ANEXOS

Anexo A. *Control negativo y control positivo de glucosa 10X*

Además del sustrato, será necesario contar con un blanco, el cual no tendrá fuente de carbono, solo inóculo y medio basal para las funciones celulares. Al final de los ensayos de Potencial Bioquímico de Metano, el resultado de este control endógeno se restará a cada ensayo con sustrato para obtener el volumen neto de metano debido únicamente al sustrato en estudio.

Adicional al control negativo, es preciso colocar un control positivo, el cual tendrá inóculo y un sustrato conocido, en este caso glucosa. Se deberán secar 12 g de glucosa anhidra durante 2 horas a 105 °C y dejar enfriar en un desecador. Pesar 10.6 g de glucosa seca y diluirla en 100 mL de agua destilada y después, aforar a 200 mL en un matraz volumétrico (solución de 50 g DQO de glucosa/L, considerando que 1 g DQO de glucosa= 1.06 g de glucosa). A cada control positivo se le añadirá 1.8 mL de la solución para añadir una concentración de 1 g DQO de glucosa al control positivo.

Anexo B. *Solución buffer de bicarbonato 10X*

Hay que tomar en cuenta que la alcalinidad del inóculo disminuirá al diluirlo con el sustrato y el medio mineral. Por lo tanto, habrá que adicionar bicarbonato de sodio para llevar la alcalinidad final de la mezcla (inóculo/sustrato/medio mineral) a un valor cercano a 3 g CaCO₃/L. Este valor de alcalinidad es suficiente para mantener el pH entre 6.8 y 7.2 Para preparar una solución de bicarbonato 10 veces concentrada diluir 25 g de NaHCO₃ en 1L de agua destilada.

Se medirá la alcalinidad antes de la adición de bicarbonato para estimar la cantidad de bicarbonato que se requiere adicionar. Una vez adicionado el bicarbonato se evaluará la alcalinidad de la mezcla final a usarse en el ensayo, para verificar que se alcanzó un valor cercano a 3 g CaCO₃/L. Si aún no se alcanza, adicionar lo que sea necesario. Repetir este paso hasta que se alcance la alcalinidad indicada.

Anexo C. *Solución de nutrientes 100X (A) y fosfatos 500X (B)*

Solución A (100X). Prepare la siguiente solución de sales como fuente de nutrientes (g/L): 100 g NH₄Cl, 5g CaCl₂·2H₂O, 10 g MgCl₂·6H₂O, 10 g NaCl. Aforar con agua destilada (Se empleará 3.6 mL de Solución A por cada réplica). Este medio está basado en el reportado por Angelidaki y Sanders (2004).

Solución B (500X). Preparar la siguiente solución de fosfatos, como parte del medio de cultivo basal (g/L): 200 g KH₂PO₄·3H₂O. Emplear agua destilada para preparar la solución (a cada réplica se le adiciona 0.72 mL de solución B). Este medio está basado en el reportado por Angelidaki y Sanders (2004).



Anexo D. Solución para unidad fijadora de CO₂

Para preparar la solución que va en la unidad fijadora de CO₂ se deberán preparar las siguientes soluciones:

- Solución A: preparar la solución de NaOH 3M, tomando en cuenta que las botellas se llenarán cada una con al menos 80 mL.
- Solución B: se prepara adicionando 0.4% de timolftaleína (40 mg de timolftaleína en 9 mL de etanol al 99.5% seguido de un 1 mL de agua).

Solución C: contendrá 5 mL de la solución B por 1 mL de la solución A. Adicionar 80 mL de esta solución en cada frasco del módulo de fijación de CO₂.

NOTA: Será necesario hacer un recambio de la solución C una vez que haya cambiado su color de azul intenso a un azul claro, una vez que ya esté en operación el AMPTS II. Este cambio de color se debe a un cambio de pH en la solución B y resultado de no poder fijar más CO₂ y que este pase al Dispositivo de Medición del Volumen de Gas. A 22 ° C, en teoría se pueden captar aproximadamente 2.9 L de CO₂ en cada botella antes de que sea necesario cambiarla.