



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

**MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE LA CO-DIGESTIÓN DE
LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS Y LODOS DE PURGA DE
AGUAS RESIDUALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

EDER JUSIN MÉNDEZ OLIVEROS

TUTOR PRINCIPAL

DR. ALFONSO DURÁN MORENO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, FEBRERO DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidenta : Dra. Marisela Bernal González

Secretaria : Dra. Rosalinda Campuzano Ángeles

Vocal 1 : Dr. Iván Moreno Andrade

Vocal 2 : Dr. Oscar González Barceló

Vocal 3 : Dr. Alfonso Durán Moreno

Lugar donde se realizó la tesis

Laboratorio de Ingeniería Ambiental, 301 a 303. Conjunto E. Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR DE TESIS

Dr. Alfonso Durán Moreno

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por facilitar sus instalaciones y servicios para el desarrollo de este trabajo y por el orgullo que representa formar parte de ellas.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través del proyecto 247006 BioGas-CEAR / 07/2017, "CEMIE-Clúster Biocombustibles Gaseosos

Al Dr. Alfonso Durán Moreno por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación durante este periodo, así como por la orientación, los consejos y el apoyo brindado en diversos aspectos, que me han permitido crecer en lo personal y lo profesional.

A los integrantes del comité tutorial, Dr. Oscar González Barceló por el apoyo y disposición mostrados en todo momento para guiarme en el desarrollo de una parte importante de este trabajo y al Dr. Iván Moreno Andrade por sus aportes y orientación durante el proyecto.

A las integrantes del jurado ampliado, Dra. Marisela Bernal González y Dra. Rosalinda Campuzano Ángeles por sus observaciones y comentarios que han permitido enriquecer este trabajo.

A la M. en C. María Fe Altamirano Corona por su amistad, consejos, aportes, orientación, y apoyo incondicional durante el tiempo que compartimos dentro y fuera de la universidad.

A mis amigos, compañeros y personal del laboratorio 301 por los buenos momentos y el apoyo recibido.

A mis nuevos amigos de la Maestría, por el esfuerzo y dedicación que compartimos, así como por la convivencia y la confianza. Fue excelente coincidir con todos.

A mi familia, parte fundamental en mi vida. A quienes aún me acompañan y a los que se han ido.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
2.2 JUSTIFICACIÓN.....	7
2.3 OBJETIVO	8
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	9
3.1.1 Digestión anaerobia de FORSU	11
3.1.2 Digestión anaerobia de lodos de PTAR.....	13
3.2 CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODOS DE PTAR	16
3.2.1 Composición química de los sustratos	17
3.2.1.1 Materiales orgánicos ricos en hidratos de carbono.....	17
3.2.1.2 Materiales orgánicos ricos en proteínas.....	18
3.2.1.3 Materiales orgánicos ricos en grasas.....	19
3.2.2 Temperatura	19
3.2.3 pH	20
3.2.4 Tamaño de partícula.....	20
3.2.5 Relación carbono/nitrógeno	21
3.2.6 Carga orgánica	21
3.2.7 Tiempo de retención de sólidos.....	22
3.3 MODELACIÓN DEL PROCESO DE CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	22
3.3.1 Primeros modelos	23
3.3.2 Modelación matemática	25
3.3.2.1 Modelos cinéticos básicos	25
3.3.2.2 ADM1	25
3.3.2.3 Modelos estadísticos.....	27
3.3.2.4 Modelos CFD	29
3.3.2.5 Otros enfoques de algoritmos.....	29

3.3.3 Modelación de la co-digestión anaerobia de lodos de tratamiento de agua residual con residuos orgánicos.....	32
3.4 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS ANALIZADOS	34
3.5 COMUNIDAD MICROBIANA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	35
3.6 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	38
4. METODOLOGÍA.....	41
4.1 TOMA DE MUESTRAS DE FORSU, LODO DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO	41
4.2 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE FORSU, LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO.....	42
4.3 CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES	42
4.4 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES.....	44
4.5 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA	45
4.6 MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE LA CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES	45
4.7 CALIBRACIÓN DEL MODELO DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN ADM1	46
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	46
4.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE FORSU, LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO... 48	
5.2 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO.....	48
5.3 PRUEBAS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO A FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES POR INDIVIDUAL Y EN CO-DIGESTIÓN.....	50
5.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE LA DE CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODO DE PURGA DE AGUA RESIDUAL.....	56
5.5 CALIBRACIÓN Y MODELACIÓN EN ADM1 CON EL SOFTWARE AQUASIM 2.0.....	67
6. CONCLUSIONES	90
7. RECOMENDACIONES.....	92
8. BIBLIOGRAFÍA.....	93
9. ANEXOS.....	110
9.1 PRUEBA DE ANOVA DE UN FACTOR PARA COMPARACIÓN DE RESULTADOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CH ₄	110
9.2 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS A TRAVÉS DE TÉCNICAS DE PROTEÓMICA.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Temperaturas de crecimiento óptimo para algunos microorganismos metanogénicos.....	19
Tabla 3.2	Ventajas y limitaciones de cinco categorías de modelos.....	37
Tabla 3.3	Modelos actuales de co-digestión.....	37
Tabla 3.4	Evaluación de los modelos propuestos por Kythreotou <i>et al.</i> (2014) y Xie <i>et al.</i> (2016) con respecto a su utilidad en el presente trabajo.....	42
Tabla 3.5	Taxonomía de la mayoría de las poblaciones microbianas detectadas durante la co-digestión anaerobia.....	43
Tabla 3.6	Vía metanogénica de la mayoría de los metanógenos difusos.....	44
Tabla 3.7	Límites de inhibición de <i>Methanosaeta</i> y <i>Methanosarcina</i> para algunos de los principales parámetros de la digestión anaerobia.....	44
Tabla 4.1	Etapas de la metodología.....	49
Tabla 4.2	Relaciones FORSU/Lodos de purga para digestión anaerobia y co-digestión.....	51
Tabla 4.3	Preparación de los recipientes de prueba.....	51
Tabla 4.4	Preparación de los controles.....	53
Tabla 4.5	Descripción del medio básico anaerobio.....	52
Tabla 4.6	Selección de pruebas para análisis proteómicos y etapa de muestreo.....	53
Tabla 4.7	Métodos analíticos.....	54
Tabla 5.1	Caracterización de sustratos e inóculo.....	58
Tabla 5.2	Producción experimental y teórica de metano del proceso de co-digestión anaerobia.....	60
Tabla 5.3	Microorganismos identificados en los sustratos e inóculo previo al proceso de co-digestión anaerobia.....	65
Tabla 5.4	Microorganismos identificados al final de los procesos de mono-digestión y co-digestión anaerobia.....	66
Tabla 5.5	Fraccionamiento de la DQO de los sustratos (% de composición).....	77
Tabla 5.6	Valores de las variables de estado para las etapas de hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis.....	78
Tabla 5.7	Valores de la literatura para las variables de estado correspondientes a los consumidores de las fases acidogénica, acetogénica y metanogénica.....	79
Tabla 5.8	Valores de concentración de biomasa microbiana calculados a partir de las proporciones usadas en ADM1.....	79
Tabla 5.9	Valores modificados y de referencia para las constantes utilizadas en la calibración del modelo en las diferentes proporciones de mezcla.....	80
Tabla 5.10	Valores de producción obtenidos experimentalmente y valores calculados por el modelo al tiempo de finalización del proceso de co-digestión anaerobia.....	96
Tabla 9.1	Resultados del valor p obtenidos e hipótesis aceptada para los sustratos comparados con la FORSU por individual.....	130
Tabla 9.2	Resultados del valor p obtenidos e hipótesis aceptada para sustratos comparados con el Lodo de purga por individual.....	130
Tabla 9.3	Resultados del valor p obtenidos e hipótesis aceptada para la prueba experimental y simulada.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Tratamiento de agua residual y generación de lodos.....	21
Figura 3.2	Rendimiento promedio de metano obtenido a través de la digestión anaerobia de diferentes residuos.....	23
Figura 3.3	Diagrama de flujo de la co-digestión anaerobia.....	25
Figura 3.4	Procesos bioquímicos del modelo ADM1, así como el número de variables, ecuaciones y otros parámetros del modelo.....	35
Figura 3.5	Comparación de modelos matemáticos entre la mono-digestión de lodos de tratamiento de agua residual y co-digestión de lodos de tratamiento de agua residual y residuos orgánicos	40
Figura 5.1	FORSU de la planta piloto de digestión anaerobia de la UNAM (Cuautitlán Izcalli, Estado de México).....	56
Figura 5.2	Lodo de purga de agua residual (planta de tratamiento Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM).....	57
Figura 5.3	Lodo granular del reactor UASB (Grupo Modelo, CDMX).....	57
Figura 5.4	Potencial Bioquímico de Metano del proceso de co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga.....	59
Figura 5.5	Producción de metano diaria a partir del proceso de co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga.....	63
Figura 5.6	Principales elementos de la estructura de un modelo en AQUASIM 2.0.....	76
Figura 5.7	Producción de metano calculada a partir de FORSU comparada con la producción de metano experimental.....	81
Figura 5.8	Producción de metano calculada para la co-digestión 80/20 comparada con la producción de metano experimental.....	83
Figura 5.9	Producción de metano calculada para la co-digestión 60/40 comparada con la producción de metano experimental.....	84
Figura 5.10	Producción de metano calculada para la co-digestión 40/60 comparada con la producción de metano experimental.....	86
Figura 5.11	Producción de metano calculada para la co-digestión 20/80 comparada con la producción de metano experimental.....	89
Figura 5.12	Producción de metano calculada a partir de Lodo de purga comparada con la producción de metano experimental.....	91
Figura 9.1	Cámara de electroforesis BIO-RAD.....	135
Figura 9.2	Patrón electroforético en 1D de las proteínas obtenidas por fenol básico (FORSU, Lodo anaerobio granular y Lodo de purga de PTAR) así como del marcador molecular y lisozima como referencia.....	132
Figura 9.3	Patrón electroforético en 1D de las proteínas obtenidas por fenol básico (FORSU, Lodo de purga y las co-digestiones 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 todas al final del proceso, así como del marcador molecular y lisozima).....	133

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADM1	Anaerobic Digestión Model No. 1 (Modelo de Digestión Anerobia No.1)
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGV	Ácidos grasos volátiles
AMPTS	Automatic Methane Potential Test System (Sistema Automático de Prueba de Potencial de Metano)
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de varianza)
C/N	Relación carbono/nitrógeno
CO	Carga orgánica
DQO	Demanda química de oxígeno
FORSU	Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos
I/S	Relación inóculo sustrato
IWA	International Water Association (Asociación Internacional del Agua)
MRS	Microorganismos reductores de sulfato
N-NH₄	Nitrógeno amoniacal
NT	Nitrógeno total
PBM	Potencial Bioquímico de Metano
pH	Potencial de Hidrógeno
PT	Fósforo total
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
RSU	Residuos sólidos urbanos
SF	Sólidos fijos
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TRS	Tiempo de retención de sólidos
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reactor anaerobio de flujo ascendente)
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria

RESUMEN

La producción mundial de residuos sólidos urbanos es de aproximadamente 1300 millones de toneladas por año y se estima que, en 2025, aumente a 2200 con aproximadamente el 46% de contenido orgánico. Además, se generan grandes cantidades de lodos a partir del proceso de tratamiento biológico de las aguas residuales. Su disposición final incorrecta puede provocar problemas de salud pública y ambientales. Entre las tecnologías para la generación de energía a partir de biomasa y residuos se encuentra la digestión anaerobia, que implica la degradación y estabilización de materiales orgánicos y conduce a la formación de biogás. Este tratamiento proporciona un método para reducir la contaminación de las operaciones agrícolas e industriales y compensar el uso de combustibles fósiles y se considera uno de los más eficientes para residuos orgánicos y aguas residuales. Una opción para mejorar los rendimientos de la digestión anaerobia de los residuos sólidos es la co-digestión, es decir, la digestión anaerobia de dos o más sustratos de origen diferente. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar la producción de metano a partir de la co-digestión anaerobia de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) y lodo de purga de agua residual en condiciones mesofílicas. Al final de la co-digestión la prueba 80/20 v/v (FORSU/Lodo de purga) presentó el mayor rendimiento con 483.7 mLCH₄/gSV. En ninguna prueba se presentaron efectos sinérgicos entre los sustratos. También, se hizo la identificación de especies de microorganismos presentes en los sustratos e inóculo través de técnicas proteómicas para conocer los principales grupos participantes en el proceso, encontrándose 24 especies en total con predominio del grupo de las arqueas metanogénicas. Además, se realizó la calibración del modelo ADM1 para la co-digestión anaerobia de los sustratos usados a través de AQUASIM 2.0 para evaluar su eficiencia en la representación de las pruebas mediante la comparación con la información experimental. Los resultados obtenidos muestran similitud con los datos experimentales con desviaciones entre 0.5% y 8%.

ABSTRACT

World municipal solid waste production is approximately 1300 million tons per year and it is estimated that in 2025, it will rise to 2200 million tons per year with approximately 46% organic contents. In addition, large quantities of sewage sludge are generated from wastewater biological treatment. Improper wastes management can cause adverse impacts on public health and environment. Among energy production technologies from biomass and wastes is anaerobic digestion, which involves degradation and stabilization of organic materials and leads to biogas formation. This treatment provides a method to reduce pollution from agricultural and industrial operations and compensates fossil fuels use, and is considered one of the most efficient for organic waste and sewage. An option to improve anaerobic digestion performance of solid waste is co-digestion, that is, anaerobic digestion of two or more substrates from different origin. Therefore, the aim of this work was to evaluate methane production generated from anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and sewage sludge under mesophilic conditions. At the end of co-digestion, highest methane yield was observed in 80/20 v/v test (OFMSW/sewage sludge) with 483.7 mLCH₄/gVS. No synergistic effects between substrates in tests occurred. Also, microorganisms species identification in substrates and inoculum was made through proteomic techniques to know main participating groups in process, finding a total of 24 species, with methanogenic archaea predominance. In addition, ADM1 model was calibrated for used substrates through AQUASIM 2.0 to assess tests representation efficiency by comparing with experimental information; results shown differences between 0.5% and 8% with experimental data.

1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es el problema ambiental más inminente que el mundo enfrenta hoy. El aumento de la temperatura global tendrá efectos importantes en los ecosistemas, la vida silvestre, las cadenas alimentarias y, finalmente, en la vida humana. Existe un consenso general de que el calentamiento global se debe a la emisión antropogénica a gran escala de gases de efecto invernadero, causados principalmente por la generación de calor y energía. En este sentido, los recursos renovables como la energía de la biomasa y los residuos se consideran una de las fuentes de energía renovables futuras más prometedoras, especialmente porque se puede garantizar una generación de energía continua a partir de estas fuentes, a diferencia de otros tipos, como la energía solar y la energía eólica. Los materiales de desecho como lodos de plantas de tratamiento de agua residual, estiércol y residuos de cultivos son de importancia específica ya que estas fuentes no compiten con los cultivos alimenticios en el uso de la tierra (Appels *et al.*, 2011).

Entre las tecnologías disponibles para la generación de energía a partir de biomasa y residuos se encuentra la digestión anaerobia, proceso que implica la degradación y estabilización de materiales orgánicos por bacterias y arqueas metanogénicas que conduce a la formación de biogás. Este proceso puede ser dividido en cuatro etapas; la hidrólisis consiste en la descomposición de las macromoléculas de materia orgánica en monómeros fáciles de disolver incluyendo la transformación de carbohidratos, proteínas y grasas en azúcar, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. En la segunda etapa, acidogénesis, los monómeros son descompuestos en ácidos grasos de cadena corta incluyendo ácidos grasos volátiles; ácido láctico, ácido pirúvico, ácido acético y ácido fórmico. Posteriormente, en el proceso de acetogénesis, los ácidos grasos volátiles (AGV) empiezan a ser digeridos en ácido acético e hidrógeno. En la última etapa, llamada metanogénesis, el hidrógeno y ácido acético son transformados en metano por las arqueas metanogénicas (Ren, 2018).

Este tratamiento proporciona un método para reducir la contaminación de las operaciones agrícolas e industriales y compensar el uso de combustibles fósiles. Como una de las tecnologías más eficientes para el tratamiento de residuos y aguas residuales, la digestión anaerobia se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de lodos de tratamiento de agua residual y en el tratamiento de residuos industriales orgánicos. Además, ofrece ventajas significativas, como baja producción de lodos, bajo requerimiento de energía y la posible recuperación de energía en forma de biogás (Chen *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2015).

Sin embargo, la digestión anaerobia de un solo sustrato presenta algunos inconvenientes relacionados con sus propiedades del sustrato. Por ejemplo, los lodos de plantas de tratamiento se caracterizan por cargas orgánicas bajas, el estiércol de animales tiene cargas orgánicas bajas y altas concentraciones de nitrógeno que pueden inhibir la metanogénesis; la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) tiene materiales indeseados así como una alta concentración de metales pesados; los cultivos y residuos agroindustriales son sustratos estacionales, los cuales pueden carecer de nitrógeno y los residuos de mataderos incluyen riesgos asociados con concentraciones altas de nitrógeno y/o ácidos grasos de cadena larga, ambos potenciales inhibidores de la actividad metanogénica. La mayoría de estos problemas pueden ser solucionados con la adición de un co-sustrato lo que ha sido llamado recientemente co-digestión anaerobia (Mata-Álvarez *et al.*, 2014).

La co-digestión anaerobia es la digestión anaerobia simultánea de dos o más sustratos; es una opción para superar las desventajas de la mono-digestión y mejorar la viabilidad económica de las plantas de digestión anaerobia debido a la mejora en la producción de biogás y el rendimiento de metano. Además, puede dar los siguientes beneficios: mejorar la estabilización del proceso, diluir sustancias inhibitorias, balance de nutrientes, lograr el contenido de humedad requerida en la alimentación del digestor, incrementar la carga de materia orgánica biodegradable y produce efectos sinérgicos entre los microorganismos. Este proceso puede potenciar la producción de biogás del 25 al 400% sobre la mono-digestión de los mismos sustratos (Hagos *et al.*, 2017).

Los lodos provenientes de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) y FORSU son dos residuos con un alto potencial de metano debido a su contenido de sólidos volátiles; especialmente en el caso de la FORSU, los problemas derivados de su disposición en rellenos sanitarios o incineración pueden ser resueltos por el proceso de co-digestión (Nielfa *et al.*, 2015). La FORSU es la fracción orgánica de residuos orgánicos húmedos y compostables de rápida degradación encontrada en los residuos sólidos urbanos; es decir, todo aquel residuo sólido biodegradable (Durán *et al.*, 2014). Puede comprender desperdicio de alimentos, jardín, papel y otros residuos orgánicos y es altamente biodegradable con pocos materiales inertes y micro contaminantes y típicamente tiene un alto rendimiento energético superior a 200 m³ de biogás (aproximadamente 400 kWh de potencia) por tonelada tratada; sin embargo, la caracterización de sus propiedades debe tomar en cuenta el contexto regional, estacional y socioeconómico. Un co-sustrato ideal para este residuo debería estar caracterizado por una concentración de materia orgánica equivalente a la FORSU para reducir la necesidad de cambiar el tiempo de retención hidráulica del digestor y fácilmente degradable con alto potencial de generación de biogás, sin materiales tóxicos, con presencia de macro y micro nutrientes, suministro abundante, almacenable y barato si se necesita comprar. Entre los co-sustratos, el más ampliamente usado es el lodo de tratamiento de agua residual. Específicamente, la co-digestión de FORSU y lodo tiene beneficios tales como la mejora en el contenido de humedad, micro y macronutrientes, capacidad de amortiguación y una mejor relación C/N. También proporciona al lodo la dilución de compuestos como metales pesados, productos farmacéuticos y patógenos (Tyagi *et al.*, 2018).

En bioprocesos la aplicación de modelos matemáticos permite representar y predecir el comportamiento dinámico del sistema y por lo tanto el establecimiento de estrategias de control y medidas de gestión operativas. En el caso de la co-digestión los modelos han sido usados para evaluar la producción de metano, combinando parámetros operacionales tales como el tiempo de retención hidráulico y características del sustrato que difieren entre plantas de tratamiento de aguas residuales. El modelo de digestión anaerobia ADM1 (por sus siglas en inglés de Anaerobic Digestión Model No. 1) de la International Water Association (IWA) es un ejemplo de un modelo general efectivo que puede ser aplicado a muchas clases de sustratos orgánicos, el cual requiere una caracterización de la biodegradabilidad de los sustratos requeridos antes de usarlo (Hidaka *et al.*, 2015). Desafortunadamente, la aplicación adecuada del modelado para las estrategias de control sigue siendo un tema complejo y no resuelto (Carrera-Chapela *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

La co-digestión anaerobia surgió a fines de la década de 1970, permitiendo el tratamiento de una amplia gama de residuos orgánicos. La co-digestión de dos o más sustratos proporciona una mejor disponibilidad y equilibrio de macro y micronutrientes, dilución de compuestos tóxicos o inhibidores, balance de humedad y mejor capacidad de amortiguación de la mezcla con respecto a la mono-digestión. Además, permite efectos sinérgicos positivos (efectos de mayor magnitud por acción de la mezcla de sustratos con respecto al efecto de cada sustrato de forma individual (Vivekanand *et al.*, 2018)) sobre la eficiencia del proceso: incremento de la fracción biodegradable, ampliación de la comunidad microbiana involucrada en el proceso de digestión y mayores concentraciones de biomasa activa; lo que conduce a una mejor estabilidad del proceso y mayor generación de biogás (Tyagi *et al.*, 2018).

Inicialmente, la co-digestión anaerobia se centró en la mezcla de sustratos que favorecen las interacciones, por ejemplo, el equilibrio de macro y micronutrientes, el balance de humedad y/o los compuestos tóxicos o inhibidores diluidos. En estas circunstancias, la co-digestión produce más metano que el producido en ambas digestiones individuales. Sin embargo, hoy en día, debido a las perspectivas industriales y ya que la producción de metano es consecuencia del incremento de la carga orgánica en lugar de los sinergismos, todas las clases de mezclas son consideradas y usadas (Mata-Alvarez *et al.*, 2014).

Con respecto a la co-digestión anaerobia, se han publicado varios artículos que investigan la interacción del estiércol de ganado con otras fuentes de biomasa para mejorar las tasas de producción de biogás. En los últimos quince años los mayores esfuerzos de investigación se han enfocado al estudio de la digestión conjunta de diferentes combinaciones de residuos municipales, industriales y agrícolas, por lo que las publicaciones sobre co-digestión anaerobia muestran un incremento considerable; esto indica que es un proceso factible y aplicable en la mejora de la producción de biogás y la protección ambiental. Sin embargo, la diferencia en la composición de la materia prima debe ajustarse para algunos residuos locales complejos (Hagos *et al.*, 2017).

El aumento en las publicaciones sobre el proceso de co-digestión anaerobia en la última década refleja la viabilidad y la idoneidad del proceso en el mejoramiento de la generación de biogás y la sostenibilidad ecológica, así como el potencial de uso de las diferentes clases de residuos como materia prima en el proceso. Sin embargo, algunos desafíos necesitan ser confrontados para convertir la producción a escala de laboratorio a nivel industrial. Pero la investigación perspicaz de los factores que afectan la co-digestión anaerobia, el ajuste de los parámetros operativos y las estrategias de optimización siguen requiriendo mayor investigación. En este sentido, los modelos existentes no pueden evaluar las propiedades complejas y el proceso de conversión de la materia prima de entrada de manera eficiente. Se requiere un análisis exhaustivo que facilite el proceso de simulación y los efectos de algunos elementos que intervienen en el proceso también deben estudiarse en el futuro. Por lo cual, la exploración de todos estos problemas es esencial para desarrollar un modelo más robusto para el proceso (Siddique y Wahid, 2018).

En la actualidad, la co-digestión anaerobia puede ser considerada como el tema más relevante dentro de la investigación en digestión anaerobia (Mata-Alvarez *et al.*, 2014; Hagos *et al.*, 2017).

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción mundial de residuos sólidos urbanos es de aproximadamente 1300 millones de toneladas por año y se estima que, en 2025, aumentará a 2200 con aproximadamente el 46% de contenido orgánico (Campuzano y González-Martínez, 2016). Esta situación puede generar problemas de salud pública y protección del ambiente al atraer vectores de enfermedades y exponer a las personas que viven cerca de los sitios de disposición de residuos; por lo que se deben realizar esfuerzos para aumentar la reducción, el reciclaje y la recuperación de materiales útiles a partir de residuos (Tyagi *et al.*, 2018).

Aunado a lo anterior, en 2008 se produjeron más de 10 millones de toneladas de sólidos secos de lodos de PTAR en 26 estados miembros de la Unión Europea (Kacprzak *et al.*, 2017). En 2013, en China se produjeron aproximadamente 6.25 millones de toneladas secas de lodos y en EE. UU., la cantidad de biosólidos generados anualmente a partir de lodos de aguas residuales estabilizadas es superior a 8 millones de toneladas secas (Liu *et al.*, 2016 a).

En México se producen anualmente 14.27 millones de toneladas de residuos orgánicos (SEMARNAT, 2017) y 232 mil toneladas de lodos de provenientes de los sistemas de tratamiento de agua residual (INECC-SEMARNAT, 2012); por lo cual, la implementación de la co-digestión anaerobia entre estos sustratos, se presenta como una alternativa viable, teniendo como valor agregado la recuperación de energía en forma de biogás.

En los últimos años, el interés por las energías renovables ha crecido, impulsado por la preocupación por el calentamiento global, la seguridad energética, la recuperación de recursos y la alta producción de residuos sólidos orgánicos, así como los problemas relacionados con su eliminación. Por lo que ha surgido la necesidad de desarrollar y optimizar tecnologías que faciliten el tratamiento adecuado de los residuos (Kouas *et al.*, 2018). En este sentido, la modelación es una herramienta importante para evaluar aspectos de bioprocesos, diseño de procesos, determinación de condiciones óptimas de operación y control de los procesos de digestión anaerobia. Mejoran la comprensión del sistema, la formulación y validación de hipótesis y pueden predecir el rendimiento del sistema (Mendes *et al.*, 2015; Kouas *et al.*, 2018).

Por lo anterior, surge la intención de evaluar la producción de metano a partir de la co-digestión anaerobia de estos residuos y utilizar una herramienta eficiente y accesible para representar el comportamiento del proceso en el que se consideren los principales aspectos entre FORSU y lodos de tratamiento de agua residual.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Durante la digestión anaerobia de la biomasa, mediante una serie de reacciones bioquímicas, se genera el biogás, producto de la descomposición anaerobia de materia orgánica. El cual, está constituido principalmente por metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2). Este biogás puede ser capturado y usado como combustible y/o electricidad. De esta forma, la digestión anaerobia, como método de tratamiento de residuos, permite disminuir la cantidad de materia orgánica contaminante, estabilizándola y al mismo tiempo, produciendo energía con un biocombustible gaseoso (FAO, 2011). La digestión anaerobia es un proceso biológico que convierte sustratos complejos en biogás y digestato por acción microbiana en ausencia de oxígeno a través de cuatro etapas sucesivas principales denominadas, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Es una de las tecnologías más antiguas para estabilizar los residuos orgánicos y muy adecuada debido a sus impactos ambientales limitados y su alto potencial de recuperación de energía. Tales aspectos positivos, junto con las preocupaciones sobre el crecimiento de la población, el aumento de la demanda de energía y el calentamiento global han promovido una mayor investigación sobre el desarrollo y la mejora del proceso (Ariunbaatar *et al.*, 2014). El uso de la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales comenzó tarde en México en comparación con países europeos o de América del Norte. El primer digester fue construido en 1987. El desarrollo posterior fue lento debido a la crisis económica y la reducción de la disponibilidad de fondos públicos y privados para resolver problemáticas ambientales (Monroy *et al.*, 2000).

Una opción interesante para mejorar los rendimientos de la digestión anaerobia de los residuos sólidos es la co-digestión, es decir, la digestión anaerobia de dos o más sustratos de origen diferente que en la mayoría de los casos mejora los rendimientos de biogás. Su principal ventaja consiste en aprovechar la sinergia de la mezcla, compensando las carencias que cada uno de los sustratos tengan por separado. Sus objetivos generales son: aprovechar la complementariedad de los compuestos para dar lugar a procesos más eficaces, compartir instalaciones y unificar metodologías reduciendo así costos de inversión y explotación y amortiguar las variaciones temporales en producción y composición de cada residuo por separado (Lara, 2014).

En la FORSU el contenido de materia orgánica biodegradable, la relación carbono/nitrógeno (C/N), así como el porcentaje de materia seca son mayores en comparación con el lodo de PTAR. Sin embargo, una mayor concentración de macronutrientes y micronutrientes contenidos en los lodos compensa la falta de nutrientes que suele caracterizar a la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (RSU) (Esteban, 2014).

Para proporcionar una mayor comprensión de los mecanismos que influyen en el proceso de digestión anaerobia, se han desarrollado diversos modelos. Desde los modelos matemáticos dinámicos iniciales de digestores de finales de la década de 1960, hasta modelos más complejos para dar cuenta de las interacciones e inhibiciones microbianas significativas. Idealmente, se supone que los modelos de proceso deben describir los aspectos cualitativos y cuantitativos de las reacciones microbianas. Sin embargo, la tarea de obtener las constantes cinéticas válidas que se requieren se complica por el hecho de que la digestión anaerobia es en sí misma un proceso dinámico complejo de múltiples etapas que implica varios grupos microbianos. El poder predictivo de los modelos está limitado por la falta de conocimiento sobre los microorganismos específicos involucrados y su metabolismo. Por lo tanto, los esfuerzos para desarrollar un modelo de digestión

anaerobia factible generalmente se basan en suposiciones que a su vez conducen a la desestimación de los fenómenos reales (Yu *et al.*, 2013). A pesar de lo anterior, el uso de modelos para la predicción del rendimiento y el control del proceso en una amplia gama de condiciones de diseño y operación, es atractivo (Zhou *et al.*, 2012).

2.3 OBJETIVO

Evaluar la producción de biogás a partir de la co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga de agua residual a través del uso de reactores a escala de laboratorio y un modelo para la identificación del proceso con mayor rendimiento.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Caracterizar fisicoquímicamente los sustratos FORSU y lodos de purga de agua residual para la evaluación de su influencia en la producción de biogás.
- 2.** Medir la producción de biogás a partir de la digestión anaerobia de los sustratos individualmente y en co-digestión para la determinación de su eficiencia
- 3.** Calibrar la modelación de la co-digestión anaerobia FORSU y lodos de purga de aguas residuales en ADM1 para la identificación las principales variables que intervienen en el proceso.
- 4.** Identificar las comunidades microbianas presentes en la co-digestión anaerobia de FORSU y lodos de purga de agua residual para el análisis de las rutas metabólicas predominantes.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA

Existen diversas definiciones para la digestión anaerobia realizadas por diferentes autores. Van Lier *et al.* (2008) la consideran como el proceso de fermentación en el que la materia orgánica es degradada y se produce biogás, compuesto principalmente de metano y dióxido de carbono; Ward *et al.* (2008) como el proceso de descomposición de la materia orgánica por un consorcio microbiano en un ambiente libre de oxígeno; Fernández Rodríguez *et al.* (2012) la han definido como un proceso biológico adecuado para el tratamiento de residuos orgánicos que degrada el material orgánico sin oxígeno, generando metano y un residuo digerido similar al compost producido aeróbicamente; mientras que Jain *et al.* (2015) la exponen como un método para descomponer la materia orgánica con la ayuda de una variedad de microorganismos anaerobios en condiciones anaerobias o sin oxígeno cuyo producto final incluye biogás (compuesto por CH₄, CO₂ e impurezas) y un residuo orgánico y recientemente, para Cardona *et al.* (2019) es un proceso biológico de múltiples etapas que permite convertir varios tipos de residuos orgánicos en una energía renovable, el biogás (compuesto de CH₄ y CO₂) y el digestato. Para el presente trabajo, se entenderá como el proceso biológico de degradación de la materia orgánica por medio de un consorcio microbiano en condiciones libres de oxígeno a través del cual se genera biogás y digestato como subproductos.

Este proceso ocurre en muchos lugares donde existe materia orgánica disponible y el potencial redox es bajo (cero oxígeno); este es el caso típico de los estómagos de rumiantes, pantanos, sedimentos de lagos y arroyos, rellenos sanitarios municipales o en alcantarillados. El tratamiento anaerobio es muy efectivo para remover compuestos orgánicos biodegradables dejando NH₄⁺, PO₄³⁻, S²⁻ en la solución. El tratamiento puede ser conducido en sistemas técnicamente simples y el proceso puede ser aplicado en cualquier escala y en casi cualquier lugar. Además, la cantidad de lodo de exceso producido es muy pequeña y bien estabilizada, incluso teniendo un valor de mercado cuando el lodo granular anaerobio se produce en el biorreactor. Así mismo, produce energía útil en forma de biogás en lugar de consumirla (Van Lier *et al.*, 2008). De manera general, el proceso de digestión anaerobia se realiza en reactores, llamados biodigestores o fermentadores que pueden incluir diversos sistemas integrados, tales como agitación, calentamiento y aislamiento térmico (Durán *et al.*, 2014).

La digestión anaerobia es un sistema complejo y dinámico que depende de varios microorganismos con diferentes condiciones de operación. También depende del tipo y estructura de los sustratos. Los carbohidratos, lípidos y proteínas son los principales constituyentes de los materiales orgánicos que los microorganismos pueden degradar en una forma más simple en un ambiente libre de oxígeno. Este sistema consta de las siguientes etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Siddique y Wahid, 2018).

Hidrólisis

Es el primer paso del proceso de digestión anaerobia; en esta etapa, las sustancias orgánicas complejas que las bacterias no pueden utilizar directamente (el sustrato) experimentan una reacción que reduce o descompone los polímeros a moléculas solubles simples con la ayuda de

enzimas hidrolíticas extracelulares (Jain *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019). Como las bacterias son incapaces de aprovechar la materia orgánica particulada, el primer paso en la degradación anaerobia consiste en la hidrólisis de polímeros. En este proceso las moléculas orgánicas complejas y no disueltas son degradadas a través de la acción de exoenzimas para producir moléculas más pequeñas las cuales pueden cruzar la pared celular y constituir las principales fuentes de carbono y energía para los microorganismos. Durante el proceso enzimático, las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos, los polisacáridos a azúcares simples y los lípidos a ácidos grasos de cadena larga (Durán *et al.*, 2014; Vögeli, 2014).

Acidogénesis

También conocida como fermentación, es la etapa intermediaria del metabolismo del sustrato como aceptor de electrones. En este proceso, las bacterias fermentativas convierten los monómeros solubles (compuestos reducidos) en productos terminales, como AGV, acompañados por la generación de materiales celulares. (Jain *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019). Durante la etapa de la acidogénesis, los productos de la hidrólisis (aminoácidos, azúcares simples y ácidos grasos de cadena larga), son difundidos al interior de las células bacterianas a través de la membrana celular y subsecuentemente fermentados u oxidados por vía anaerobia. La acidogénesis se lleva a cabo por un grupo amplio de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios. Los productos de la acidificación consisten en una variedad de compuestos orgánicos pequeños, principalmente AGV, así como H₂, CO₂, ácido láctico, etanol y amonio. Característicamente, los compuestos neutrales como los azúcares y proteínas son convertidos en ácidos grasos volátiles y ácido carbónico, siendo el principal producto final el acetato. Por lo tanto, los organismos fermentativos son designados como acidificadores o acidógenos. La acidogénesis es la etapa más rápida de conversión en la cadena alimenticia anaerobia (Gerardi, 2003; Van Lier *et al.*, 2008).

Acetogénesis

Como consecuencia de la acidogénesis, los microorganismos acetógenos obligados reductores de protones, llevan a cabo la acetogénesis. Durante esta tercera etapa, los productos de la acidogénesis se oxidan a acetato, CO₂ y H₂ junto con metilamina y metanol que se utilizarán como sustratos directos para la producción de metano (Jain *et al.*, 2015; Chatterjee y Mazumder, 2019; Li *et al.*, 2019). Los sustratos acetogénicos más importantes son propionato y butirato, intermediarios clave en el proceso de digestión anaerobia. También lactato, etanol y metanol y aún H₂ y CO₂ son acetogénicamente convertidos en acetato, con la generación de subproductos como NH₃, CO₂ y H₂S. Durante estas reacciones la demanda química de oxígeno (DQO) es reducida y el pH decrece. El hidrógeno desempeña un importante papel intermediario en este proceso, ya que la reacción solo ocurrirá si la presión parcial es lo suficientemente baja como para permitir termodinámicamente la conversión de todos los ácidos (Van Lier *et al.*, 2008; Vögeli, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Metanogénesis

Es el último paso del proceso de anaerobia de la materia orgánica. La degradación metanogénica de cada sustrato depende tanto de la naturaleza del mismo como de la ruta metabólica

seleccionada por los microorganismos para su degradación (Durán *et al.*, 2014). Esta etapa es un proceso complejo logrado por la acción sinérgica de varias especies de microorganismos metanógenos anaerobios estrictos. El CH₄ y CO₂ se producen a partir de los productos de la acidificación (acetato, H₂ + CO₂ y metilamina + metanol) a través de la metanogénesis acetotrófica, metanogénesis hidrogenotrófica y metanogénesis metilotrófica. (Jain *et al.*, 2015, Chatterjee y Mazumder, 2019; Li *et al.*, 2019). Un grupo de arqueas metanogénicas reduce el dióxido de carbono usando hidrógeno como donador de electrones y descarboxilan acetato para formar CH₄. Generalmente cerca del 70% de la producción de metano se origina del acetato como precursor principal (Van Lier *et al.*, 2008). El biogás producto del proceso, consiste principalmente en CH₄ y CO₂, pero también descomposición contiene otras “impurezas”, como el sulfuro de hidrógeno, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno. El biogás con un contenido de metano superior al 45% es inflamable y cuanto mayor sea el contenido de CH₄, mayor será su valor energético (Vögeli, 2014). Las arqueas metanogénicas se dividen en 26 géneros. Morfológicamente exhiben casi todas las formas que se presentan en bacterias: cocos (Methanococcus), barras (Methanobacterium), barras cortas (Methanobrevibacter), Spirillaceae (Methanospirillum), sarcina (Methanosarcina) (Ziemiński y Frac, 2012; Manyi-Loh *et al.*, 2013).

3.1.1 Digestión anaerobia de FORSU

La gestión de los RSU se ha convertido en una de las principales preocupaciones mundiales debido a la creciente urbanización, la consiguiente generación de dichos residuos y los impactos adversos a la salud pública y el ambiente. Los niveles actuales de generación de RSU a nivel mundial se sitúan en aproximadamente 1300 millones de toneladas por año (1.2 kg per cápita por día) y se espera que aumenten a alrededor de 2200 millones de toneladas por año para 2025. Como resultado de los problemas de salud pública y protección del ambiente, se hacen cada vez más esfuerzos para aumentar la reducción, el reciclaje y la recuperación de materiales útiles a partir de residuos. Un componente clave, que es técnica y económicamente viable para la recuperación, es la energía de la FORSU que administrado de manera eficiente puede ser una fuente valiosa de energía renovable (Tyagi *et al.*, 2018).

La definición de FORSU varía regional y nacionalmente; en EE. UU., se considera una mezcla de alimentos, residuos de jardín y papel. En la Unión Europea se considera una mezcla de residuos de parques, jardines y cocinas (Campuzano y González-Martínez, 2016). Para efectos del presente documento se considera a la FORSU como la fracción orgánica de residuos orgánicos húmedos y compostables de rápida degradación encontrada en los residuos sólidos urbanos; es decir, todo aquel residuo sólido biodegradable (Durán *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista de la composición química la FORSU contiene los tres grupos principales de sustancias orgánicas biodegradables: carbohidratos, proteínas y lípidos. La presencia de estas está influenciada por aspectos sociales y económicos, en gran parte relacionados con la disponibilidad de alimentos, la variación estacional y los patrones de consumo, por lo que la composición depende de la región geográfica, número de habitantes y condición social, actividades económicas predominantes, hábitos alimentarios regionales, temporada y sistema de recolección (Alibardi y Cossu, 2015).

La degradación anaerobia de la FORSU tiene lugar naturalmente en los rellenos sanitarios y el biogás producido generalmente se libera a la atmósfera o se usa para la producción de energía. En estos, un sistema de pozos y tuberías recoge el biogás y lo transporta a una caldera o turbina donde se quema para generar calor o electricidad, o simplemente se quema. Actualmente la tendencia real es disminuir la cantidad de residuos dispuestos en los rellenos sanitarios y utilizar las instalaciones sólo para eliminar los residuos restantes (Campuzano y González-Martínez, 2016). En este sentido, las opciones de manejo están dirigidas a estabilizar la FORSU por medio de diferentes tecnologías, ya sea basadas en procesos térmicos o, más frecuentemente, en procesos biológicos como el compostaje o la digestión anaerobia (Alibardi y Cossu, 2015).

La generación de FORSU ha aumentado en los últimos años y su valorización es la estrategia más atractiva para evitar que se convierta en un problema (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2013). La digestión anaerobia de FORSU y otros residuos orgánicos se ha utilizado ampliamente como una forma de recuperar energía en forma de biogás y muchos investigadores, empresas y agencias gubernamentales están trabajando activamente para mejorar los procesos. En realidad, la digestión anaerobia es el proceso más prometedor y sostenible para el tratamiento de residuos orgánicos porque produce complementos de energía y fertilizantes como el compost rico en nitrógeno. Al procesar adecuadamente el biogás, ayuda a reducir las descargas de metano a la atmósfera, lo que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero, olores y problemas sanitarios de los vertederos. Por otro lado, existen desventajas como la complejidad de la puesta en marcha de los reactores, el aumento del tiempo de estabilización y la presencia de compuestos tóxicos e inhibidores cuando la FORSU no es adecuada. Sin embargo, se requiere un análisis complejo para el control del proceso porque es sensible a las diferentes composiciones de los residuos (Campuzano y González-Martínez, 2016).

Como sustrato principal la FORSU no ha sido estudiada como el estiércol o los lodos de plantas de tratamiento, por factores como el alto potencial de biogás de este tipo de residuo, el bajo número de plantas y su ubicación; sin embargo, ha sido típicamente usada como co-sustrato de los lodos de plantas de tratamiento por que en muchos lugares están equipadas con digestores anaerobios, por lo tanto, la co-digestión entre lodos de tratamiento y la FORSU ha sido considerada como una manera para reducir significativamente los costos de tratamiento de ambos residuos (Mata-Álvarez *et al.*, 2014).

La eliminación en vertederos o el tratamiento térmico son las formas más comunes de disposición de la FORSU debido principalmente sus características y por la presencia de materiales no deseados como vidrio, metales o plásticos en el digestato lo que representa un problema que debe tenerse en cuenta. Si se utiliza como fertilizante, el digestato requiere una fase posterior de tratamiento aerobio para la estabilización completa de la fracción orgánica, lo que aumenta los costos de todo el proceso. Por esta razón, es necesario atender la correcta separación de las fracciones no deseadas del flujo de material orgánico después de la fase de recolección para tener un material utilizable en plantas de digestión anaerobia y obtener un digestato de buena calidad (Novarino y Zanetti, 2012).

3.1.2 Digestión anaerobia de lodos de PTAR

El término lodo ha sido usado para designar a los subproductos semisólidos del tratamiento de aguas residuales (Von Sperling, 2007). Como residuo de una planta de tratamiento de aguas residuales, los lodos son una mezcla biológicamente activa de agua, materia orgánica (derivada de desechos humanos, residuos de alimentos, etc.), microorganismos vivos y muertos (incluidos patógenos) y contaminantes tóxicos inorgánicos y orgánicos (Kacprzak *et al.*, 2017).

Hay tres categorías principales de lodos: Lodos originados del tratamiento de aguas residuales urbanas (aguas residuales domésticas o la mezcla de aguas residuales domésticas con aguas residuales industriales y/o aguas pluviales de escorrentía), lodos originados del tratamiento de aguas residuales industriales y lodos del tratamiento de agua potable. Las características de los lodos dependen de la carga de contaminación original del agua tratada, y también de las características técnicas del tratamiento realizado. El tratamiento del agua concentra la contaminación presente en el agua y, por lo tanto, los lodos contienen una gran variedad de materia, suspendida o disuelta. Algunos compuestos pueden reutilizarse de manera útil (materia orgánica, nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, principalmente) mientras que otros compuestos son contaminantes (como metales pesados, contaminantes orgánicos y patógenos) (European Commission, 2001).

Lodos primarios

Son los lodos producidos durante el tratamiento primario de las aguas residuales. Los tratamientos pueden ser físicos o químicos para eliminar la materia en suspensión (sólidos, grasa y residuos). El tratamiento físico más común es la sedimentación la cual consiste en la eliminación de sólidos suspendidos de líquidos por asentamiento gravitacional. Otro tratamiento físico es la flotación, en esta, se introduce aire en las aguas residuales en forma de burbujas finas, que se adhieren a las partículas que se eliminarán; las partículas ascienden a la superficie y se eliminan mediante raspado. En la etapa mecánica, se pueden eliminar del 50 al 70% de los sólidos suspendidos y del 25 al 40% de la DBO. Los tratamientos químicos son la coagulación y la floculación, utilizadas para separar sólidos suspendidos cuando sus tasas de sedimentación normales son demasiado lentas para proporcionar una clarificación efectiva (European Commission, 2001; Manara y Zabaniotou, 2012).

Lodos secundarios o biológicos

Son lodos producidos durante el tratamiento biológico, o también llamado secundario, de aguas residuales. Durante el tratamiento secundario se elimina la materia biológica disuelta y suspendida. Los microorganismos autóctonos, en su mayoría bacterias, son los agentes activos que típicamente realizan el tratamiento en un hábitat controlado. El tratamiento secundario también requiere un proceso de separación de los microorganismos del agua tratada antes de la descarga o el tratamiento terciario. Los procesos de tratamiento biológico se consideran los métodos de tratamiento de aguas residuales más recomendables en aspectos ambientales y económicos. Los microorganismos descomponen los materiales orgánicos presentes en los residuos municipales y, por lo tanto, permiten la valorización de los residuos mediante la producción de compuestos de

alto valor agregado, como una amplia gama de sustancias derivadas de microorganismos, incluidos biopolímeros y biocombustibles que han sido obtenidos a nivel experimental (Manara y Zabaniotou, 2012).

Lodos mixtos

Los lodos primarios y secundarios se pueden mezclar entre sí generando un tipo de lodo denominado lodo mixto (European Commission, 2001).

Lodos terciarios

Los lodos terciarios se generan al realizar un tratamiento terciario como coagulación-floculación. Es un proceso adicional al tratamiento secundario diseñado para eliminar los nutrientes no deseados restantes (principalmente nitrógeno y fósforo) a través de procesos químicos o bacterianos de alto rendimiento. Estos tratamientos son necesarios cuando se requiere un alto nivel de descontaminación (European Commission, 2001; Manara y Zabaniotou, 2012).

Lodos digeridos

Después del tratamiento con agua, se deben realizar tratamientos adicionales en el lodo para estabilizar la materia orgánica y reducir el contenido en agua, el potencial de generación de olores, la carga patógena y el volumen y la masa global. Varios tratamientos pueden aplicarse a los lodos para lograr esto (European Commission, 2001). La Figura 3.1, muestra las etapas en las que se generan los diferentes tipos de lodos en el proceso del tratamiento de agua residual.

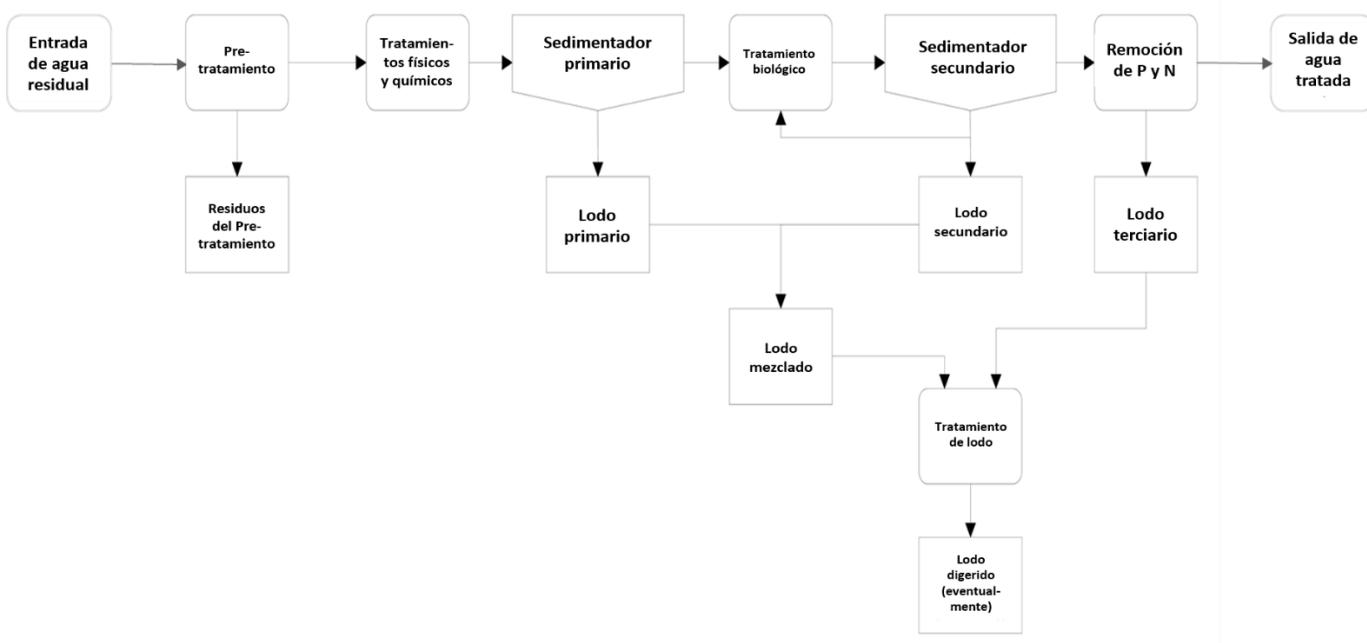


Figura 3.1. Tratamiento de agua residual y generación de lodos (Modificado de European Commission, 2001)

La gestión de los lodos de plantas de tratamiento de agua residual es un tema de creciente importancia. De acuerdo con las regulaciones europeas, los métodos de almacenamiento están siendo reemplazados por métodos que conducen a la estabilización de los residuos, al reciclaje seguro, al desarrollo de estrategias, legislación y programas. Su objetivo es promover la gestión ecológica de los lodos. Por consiguiente, estos métodos pueden conducir a la recuperación de valiosas materias primas de materiales potencialmente peligrosos, procesándolos para permitir su uso en la agricultura, la industria o la recuperación de energía y calor (Ciešlik *et al.*, 2015).

Grandes cantidades de lodos de aguas residuales se producen anualmente a partir de procesos de tratamiento biológico. Debido a las características de estos, el tratamiento y eliminación de lodos presentan desafíos crecientes para las PTAR. (Liu *et al.*, 2016; Córdova *et al.*, 2019). Este problema representa hasta el 50% de los costos operativos de una PTAR. Las cantidades diarias, expresadas como sólidos secos varían de 60 a 90 g por equivalente de población (Appels *et al.*, 2011).

Entre los procesos de tratamiento de lodos de aguas residuales, la digestión anaerobia es una tecnología prometedora debido a la capacidad de recuperación de energía, reducción de masa y eliminación de patógenos. Además, la degradación biológica de la materia orgánica en los lodos es un importante proceso de estabilización para su posterior aplicación en la tierra como mejorador de suelos (Liu *et al.*, 2016).

Debido a la naturaleza de las PTAR, los lodos residuales tienen una baja biodisponibilidad y/o biodegradabilidad. Esto se debe a que el lodo residual es una mezcla de diferentes células microbianas y compuestos orgánicos e inorgánicos que se adhieren junto con sustancias poliméricas extracelulares resistentes a la digestión anaerobia (Liu *et al.*, 2016).

Yuan y Zhu (2016) y Gil *et al.* (2018), mencionan que el lodo de aguas residuales se caracteriza por grandes tiempos de retención hidráulica o TRH (igual a 20-30 días lo que lleva a un gran volumen del digester, que eventualmente conduce a un alto costo) y la existencia de contaminantes químicos, como metales pesados, agentes patógenos y contaminantes orgánicos persistentes; así como por bajas cargas orgánicas y concentraciones altas de nitrógeno que pueden inhibir a los metanógenos, y que la mayoría de estos problemas podrían resolverse mediante la adición de un co-sustrato. Además, para mejorar la digestión anaerobia de este sustrato en términos de mayor rendimiento de metano, se recomienda implementar métodos de pretratamiento como los térmicos, ultrasónicos, químicos, de microondas y/o mecánicos (Gil *et al.*, 2018).

En general, se considera que, para el tratamiento de enormes cantidades de lodo, la digestión anaerobia es una tecnología económica y no dañina para el ambiente, ya que tiene la capacidad de reducir en aproximadamente 40% la carga total de biosólidos que deben eliminarse. Otras características beneficiosas incluyen la estabilización, mejora de la capacidad de deshidratación y el potencial de inactivar y reducir los microorganismos patógenos. Por lo tanto, se aplica cada vez más para reducir los costos operativos de una PTAR. La digestión anaerobia de lodos tiene la mayor capacidad de producción de biogás en general, aunque el rendimiento de metano obtenido a través de la digestión anaerobia depende de la composición del lodo. Sin embargo, en teoría, la producción de biogás es de 0.590 m³/kg de sólidos orgánicos secos como se muestra en la Figura 3.2; en la que también se aprecia el rendimiento de metano a partir de FORSU con un valor superior a 0.2 m³/kg de sólidos orgánicos secos, así como de otros residuos (Appels *et al.*, 2011).

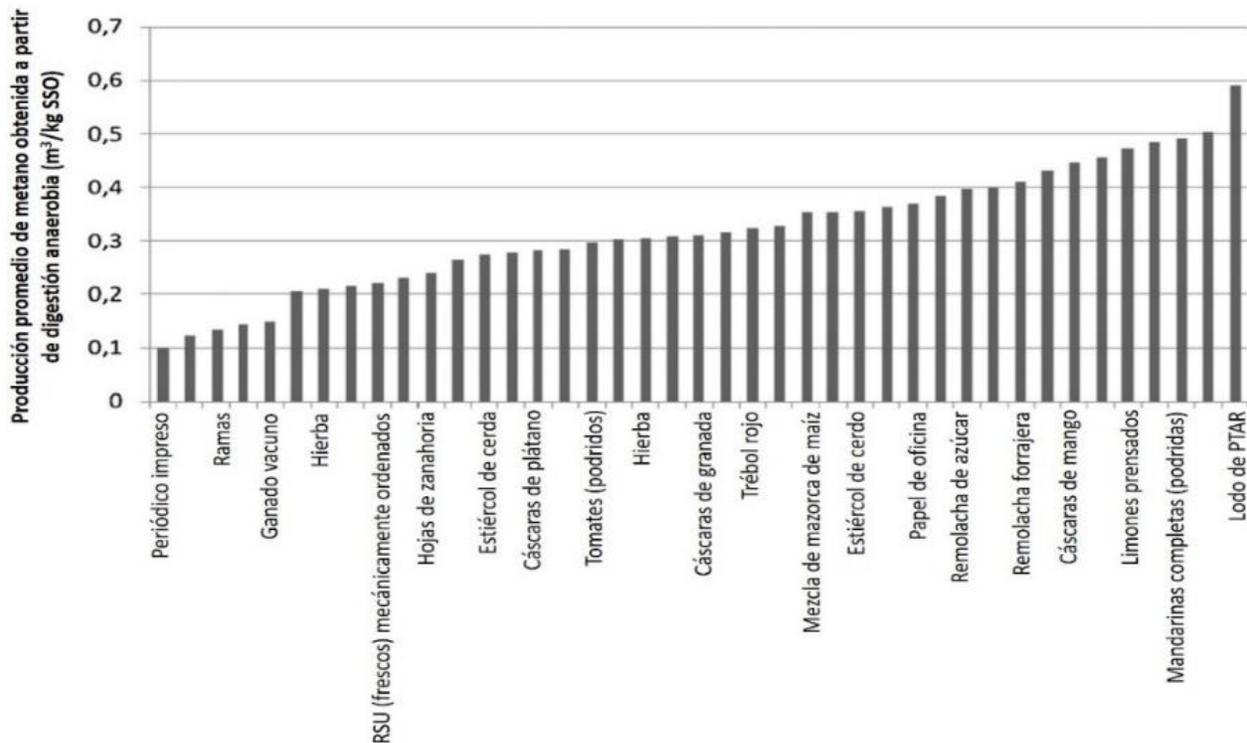


Figura 3.2. Rendimiento promedio de metano obtenido a través de la digestión anaerobia de diferentes residuos (Appels *et al.*, 2011)

Finalmente, siendo la digestión anaerobia un proceso ampliamente aplicado, existen deficiencias en la evaluación precisa de su rendimiento, las cuales se deben principalmente al hecho de que el proceso no se ha comprendido completamente. Con relación a lo anterior, se pueden identificar campos en los que se necesita más investigación para optimizar el proceso; estos incluyen la identificación de la dinámica de la comunidad microbiana; la extensión de los modelos existentes mediante la inclusión de datos de la comunidad microbiana; el desarrollo y optimización de los métodos de tratamiento previo para mejorar la degradabilidad de la biomasa y los residuos, y la mejora y purificación del biogás obtenido (incluida su transformación en componentes de mayor valor agregado) (Appels *et al.*, 2011).

3.2 CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODOS DE PTAR

La co-digestión anaerobia puede considerarse como la digestión instantánea de dos o más mezclas de sustrato y co-sustrato. Normalmente, los procesos de digestión anaerobia son diseñados para un solo sustrato. Sin embargo, el uso de una variedad de sustratos hace que el proceso sea más estable. Muchos investigadores han trabajado en la co-digestión usando varias mezclas de residuos industriales, agrícolas y municipales con el interés principal de mejorar la generación de biogás y metano (Siddique y Wahid, 2018).

El proceso puede tener distintas ventajas, que incluyen un aumento en la producción de metano, un mejor equilibrio de nutrientes en el digestor, mejora la estabilización del proceso, así como el

balance de nutrientes y los efectos sinérgicos de los microorganismos, desvío de productos orgánicos de los vertederos, reduce las emisiones de gases de efecto invernadero y ofrece mejoras económicas del sistema. También proporcionaría la dilución de compuestos tóxicos como metales pesados, productos farmacéuticos y patógenos en los lodos. A pesar de estos beneficios, la adopción de la co-digestión es limitada porque puede introducir complejidad operativa y tiene algunos de los mismos desafíos que la mono-digestión, incluida la inhibición y la espumación por digestión (Cook *et al.*, 2017).

Algunas variables, como las características del co-sustrato, las inhibiciones provocadas por el co-sustrato y la carga orgánica, pueden influir de manera importante en el sistema de co-digestión. Cuando se selecciona el co-sustrato, se deben considerar los costos de transporte desde el punto de generación a la planta de co-digestión como primer criterio de selección. Además, dado el objetivo de favorecer la sinergia y optimizar la producción de metano, también es esencial seleccionar un sustrato adecuado y la proporción de mezcla. Para reducir estos riesgos y permitir la adopción de la co-digestión, es necesario mejorar la comprensión del vínculo entre las mezclas de sustratos sobre el rendimiento y la estabilidad del co-digestor (Mata-Álvarez *et al.*, 2014; Siddique y Wahid, 2018). En la Figura 3.3 se muestra el diagrama de flujo del proceso de co-digestión anaerobia en el que se puede apreciar la presencia de dos sustratos orgánicos (A y B) al inicio del proceso, los pasos subsecuentes corresponden a los del proceso de digestión anaerobia mencionados previamente.

3.2.1 Composición química de los sustratos

Conocer las diferentes composiciones químicas de los sustratos es indispensable en un estudio de co-digestión anaerobia. Los sustratos contienen un amplio espectro de materia orgánica simple y compleja la cual puede ser usada en el proceso de digestión anaerobia. Dependiendo de las fuentes (agricultura, abono animal, residuos municipales, alimentarios e industriales), pueden predominar compuestos orgánicos específicos, aunque la mayoría de las veces la composición exacta del sustrato es difícil de conocer. Los análisis químicos de los sustratos proveen información útil para desarrollar el enfoque tecnológico para su tratamiento y utilización. La clasificación de los sustratos de acuerdo con su composición bioquímica puede ser de utilidad para evaluar su bioaccesibilidad, biodegradabilidad y biodisponibilidad (Hagos *et al.*, 2017).

3.2.1.1 Materiales orgánicos ricos en hidratos de carbono

Los carbohidratos están presentes en todos los sustratos en diferentes proporciones. Los residuos de alimentos contienen azúcares simples y disacáridos, los cuales son fácilmente descompuestos por las comunidades metanogénicas con la formación de AGV que pueden inhibir el proceso. Para el funcionamiento equilibrado de los reactores anaerobios, se recomienda mezclar la materia prima que contiene altas cantidades de carbohidratos simples con residuos con un contenido más bajo de componentes orgánicos fácilmente degradables. Todos los materiales derivados de plantas son sustratos ricos en carbohidratos. El proceso de co-digestión anaerobia puede mejorar la digestibilidad de la celulosa y las hemicelulosas, y los efectos amortiguadores del amoníaco y los

AGV. A pesar de que las biomásas lignocelulósicas son recursos abundantes, aún son un reto debido a su baja producción de biogás y su inestabilidad potencial (Durán *et al.*, 2014; Hagos *et al.*, 2017).

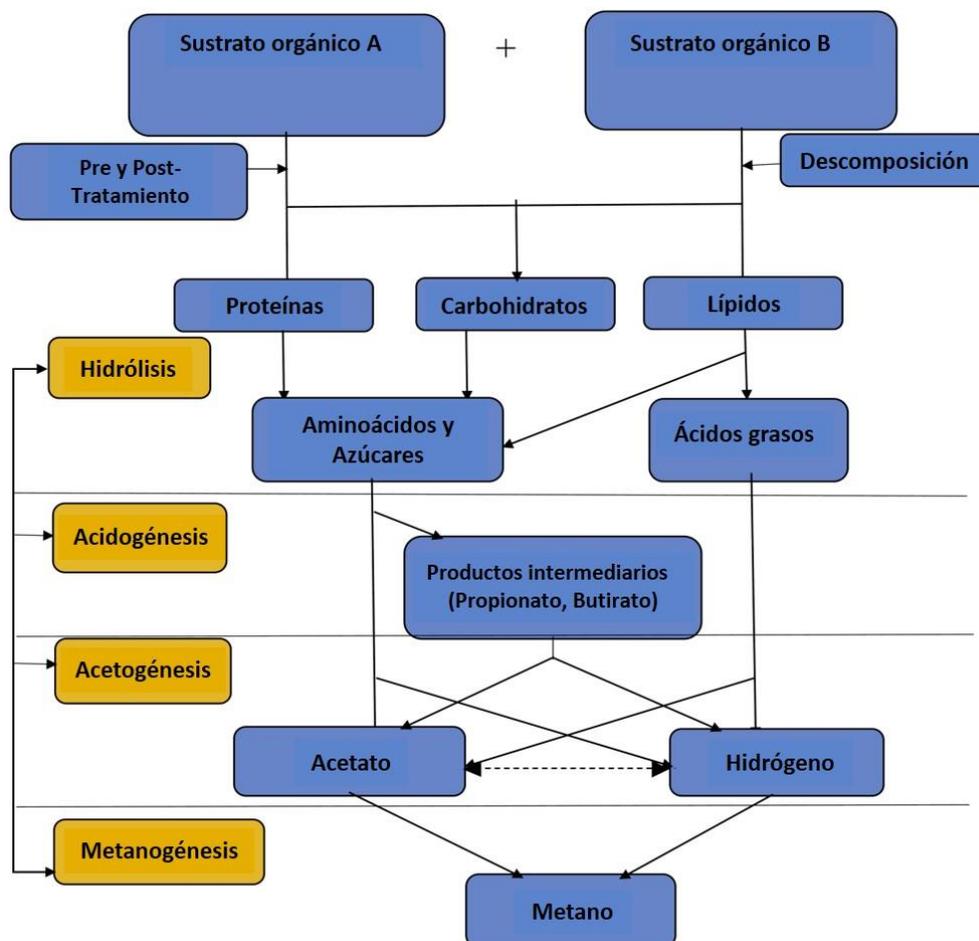


Figura 3.3. Diagrama de flujo de la co-digestión anaerobia. (Modificado de Siddique y Wahid, 2018)

3.2.1.2 Materiales orgánicos ricos en proteínas

Las proteínas también se encuentran en todos los sustratos orgánicos. Los residuos de mataderos, el estiércol de cerdos y pollos y los residuos de la industria del etanol son ejemplos de residuos orgánicos con alto contenido de proteínas. Las aguas residuales domésticas y los desperdicios de alimentos también contienen proteínas, pero en cantidades más bajas. Los sustratos ricos en proteínas son ricos en energía y producen una cantidad relativamente alta de metano en el biogás. El amoníaco y el amonio están en equilibrio entre sí para mantener la estabilidad del proceso, que depende en gran medida del pH y temperatura. La degradación microbiana de las proteínas da como resultado la liberación de iones de amonio que son inhibidores fuertes de los microorganismos metanogénicos. En altas concentraciones, el amoníaco puede inhibir los microorganismos. Cuando la concentración de amoníaco comienza a aumentar, conduce a la inestabilidad del proceso y a la falla del sistema. Los co-sustratos adecuados y el ajuste de la relación

carbono/nitrógeno (C/N) a su valor óptimo o enriquecimiento de cultivos en el sistema pueden minimizar este problema (Gerardi, 2003; Hagos *et al.*, 2017; Siddique y Wahid, 2018).

3.2.1.3 Materiales orgánicos ricos en grasas

Los materiales orgánicos con alto contenido de grasa son utilizados para grandes producciones de biogás porque son fácilmente degradables. Sin embargo, con altas concentraciones, los lípidos causan diferentes tipos de problemas en los digestores anaerobios, incluido el bloqueo, la adsorción de la biomasa (que causa problemas de transferencia de masa) e inhibición microbiana. Por lo tanto, en presencia de ácidos grasos de cadena larga (AGCL), el sistema puede funcionar mal. La degradación de los triglicéridos produce AGCL (más de 12 átomos de carbono) y glicerol. El glicerol se convierte rápidamente en biogás, mientras que la descomposición de AGCL es un proceso más complejo. Algunos AGCL en altas concentraciones pueden inhibir la actividad de los microorganismos anaerobios. Los AGCL también tienen propiedades detergentes que pueden causar espuma, especialmente a temperaturas elevadas y su acumulación provoca la inhibición del sistema. La mezcla de materiales ricos en carbohidratos con los materiales ricos en grasa (degradables lentamente y degradables rápidamente) es ventajosa en el equilibrio nutricional, el enriquecimiento de microorganismos, la reducción de la acumulación de inhibidores, el aumento de la estabilidad, la alta eficiencia de la producción de biogás y el rendimiento de metano (Hagos *et al.*, 2017; Siddique y Wahid, 2018).

3.2.2 Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores para la supervivencia de los microorganismos durante el proceso de co-digestión anaerobia, su elección y control son críticos. Al respecto, se distinguen los procesos de digestión psicrófilo (25 °C), mesófilo (alrededor de 35 °C) y termófilo (alrededor de 55 °C). Los microorganismos crecen mejor en el mesófilo y termófilo. En general, un aumento de la temperatura tiene un efecto positivo en la tasa metabólica de los microorganismos y acelera los procesos de digestión, pero el proceso termófilo es más difícil de controlar y necesita más energía para mantener la temperatura constante del reactor. Las variaciones de temperatura pueden afectar el crecimiento microbiano y la producción de biogás se reducirá de manera significativa por lo que una producción continua y estable de metano puede ser alcanzada entre 32 y 35 °C. En general, el proceso mesófilo a menudo involucra una mayor diversidad de microorganismos y es más estable en comparación con el proceso termófilo, ya que hay menos variedades de microorganismos disponibles y activas en intervalos termofílicos. Los microorganismos mesófilos no pueden sobrevivir en los intervalos termofílicos de temperatura, mientras que los microorganismos termofílicos pueden sobrevivir en intervalos mesofílicos de temperatura, pero su tasa de crecimiento es lenta. La temperatura es el parámetro importante para que los microorganismos crezcan en función de los requisitos óptimos y para mejorar la producción de biogás (Hagos *et al.*, 2017; Matheri *et al.*, 2017). Como ejemplo, en la Tabla 3.1 se muestran las temperaturas óptimas de crecimiento para algunos microorganismos metanogénicos.

Tabla 3.1. Temperaturas de crecimiento óptimo para algunos microorganismos metanogénicos (Ward et al., 2008)

Intervalo de temperatura	Género	Temperatura óptima (°C)
Mesofílico	<i>Methanobacterium</i>	37–45
	<i>Methanobrevibacter</i>	37–40
	<i>Methanosphaera</i>	35–40
	<i>Methanlobus</i>	35–40
	<i>Methanococcus</i>	35–40
	<i>Methanosarcina</i>	30–40
	<i>Methanocorpusculum</i>	30–40
	<i>Methanoculleus</i>	35–40
	<i>Methanogenium</i>	20–40
	<i>Methanoplanus</i>	30–40
	<i>Methanospirillum</i>	35–40
	<i>Methanococcoides</i>	30–35
	<i>Methanlobus</i>	35–40
	<i>Methanohalophilus</i>	35–45
	Termofílico	<i>Methanohalobium</i>
<i>Methanosarcina</i>		50–55

3.2.3 pH

El pH tiene una influencia importante en el sistema de digestión anaerobia, ya que afecta la solubilización de la materia orgánica. En el proceso de producción de biogás, existen múltiples organismos que requieren un crecimiento de pH óptimo diferente, pero la mayoría prefieren un pH neutro. El intervalo más favorable para obtener la producción máxima de biogás en la digestión anaerobia es de 6.8 a 7.2. En el proceso, los microorganismos metanogénicos son muy sensibles a las variaciones de pH y prefieren un pH de alrededor de 7.0. Los microorganismos de la acidogénesis son relativamente menos sensibles y son tolerables en el intervalo de 4.0 a 8.5. Sin embargo, el pH óptimo para la hidrólisis y la acidogénesis está entre 5.5 y 6.5. El valor de pH óptimo es una de las razones principales para separar algunos digestores en dos fases como fase acidogénica y fase de metanogénesis. El valor del pH también es un factor importante porque influye en la proporción de formas ionizadas y no ionizadas (el exceso de sulfuro de hidrógeno, los ácidos grasos y el amoníaco son tóxicos en sus formas no ionizadas). En general, el valor de pH indica un ambiente saludable para los microorganismos del digestor. La co-digestión puede permitir un valor de pH estable al evitar la condición de acidificación extrema. El valor de pH en la co-digestión es más estable y más fácil de mantener en el intervalo óptimo en comparación con la digestión de un solo sustrato (Hagos et al., 2017; Siddique y Wahid, 2018).

3.2.4 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula también afecta el proceso de co-digestión anaerobia de producción de biogás. Las partículas más grandes pueden causar obstrucciones y dificultar el proceso de digestión.

En contraste, el tamaño de partícula más pequeño mejora el área de superficie específica, lo que ayuda a que la hidrólisis se efectúe más rápidamente. Al reducir el tamaño de partícula mediante tratamiento mecánico, el proceso de degradación se acelera en los primeros días debido a que algunas veces se incrementa la solubilidad y la disponibilidad del material orgánico. Mientras más pequeñas son las partículas, mayor es el área superficial en la cual las bacterias pueden aprovechar el sustrato (Durán *et al.*, 2014).

3.2.5 Relación carbono/nitrógeno

Durante la co-digestión la adición de co-sustratos ayuda a mantener la relación carbono nitrógeno (C/N) en los digestores. Esta relación refleja los niveles de nutrientes de un sustrato de digestión y, por lo tanto, los sistemas de digestión son sensibles a la relación C/N. Los sustratos con una relación óptima proveen nutrientes suficientes para que los microorganismos maximicen la producción de biogás. Los valores más bajos de C/N conducen a concentraciones más altas de amoníaco e impiden el crecimiento microbiano. Cuando la relación C/N es mayor que el valor óptimo en el proceso de fermentación, se producen grandes cantidades de AGV. Por lo tanto, mantener una relación C/N adecuada es importante en el proceso de co-digestión. Los residuos orgánicos utilizados en la producción de biogás son generalmente ricos en materiales resistentes como la lignocelulosa. Por ello, se requieren tratamientos previos especiales para utilizar dichos residuos en tiempos de retención cortos con organismos anaerobios. El proceso de digestión anaerobia es más estable cuando la relación C/N varía de 20 a 30. (Mao *et al.*, 2015; Matheri *et al.*, 2017). Las proporciones de C/N por encima de 30 conducirían a la inestabilidad del proceso debido a la deficiencia de nutrientes y resultaría en una eliminación deficiente del sustrato, así como la reducción de la generación de metano (Iacovidou *et al.*, 2012; Mehariya *et al.*, 2018).

3.2.6 Carga orgánica

La carga orgánica (CO) se considera como la cantidad de sólidos orgánicos secos cargados por unidad de tiempo, por unidad de volumen de un proceso de digestión. Es un parámetro clave para la actividad óptima de los microorganismos. Una CO más baja conduce a la ineficiencia de la digestión anaerobia. Una CO más alta mejora diferentes especies microbianas, requiere menos energía para el calentamiento y reduce el tamaño y la inversión para la construcción del digestor. Sin embargo, un incremento excesivo de CO puede conducir a la acumulación de AGV y etanol, a una transferencia de calor deficiente y a una distribución desigual durante la agitación. El rendimiento del reactor también depende de la CO, la cual regula la producción de biogás durante la co-digestión anaerobia y el rendimiento del metano aumenta significativamente con el aumento del porcentaje de CO hasta un cierto límite, pero el equilibrio y la productividad del proceso de digestión también puede ser perturbado (Mao *et al.*, 2015; Mehariya *et al.*, 2018; Siddique y Wahid, 2018).

3.2.7 Tiempo de retención de sólidos

El tiempo de retención de sólidos (TRS) es el tiempo promedio que los microorganismos (sólidos) permanecen en el digestor anaerobio. Debido a que el tiempo de generación (tiempo requerido para que una población de bacterias se duplique) de los microorganismos metanogénicos es relativamente largo en comparación con las bacterias aerobias y las bacterias anaerobias facultativas, el TRS típico para los digestores anaerobios es mayor de 12 días. No se recomiendan tiempos de retención menores de 10 días ya que se produce un lavado significativo de microorganismos metanogénicos. Los valores de TRS altos ofrecen ventajas ya que maximizan la capacidad de transformación de la materia orgánica, reducen el volumen requerido del digestor y proporcionan una capacidad de amortiguación para la protección contra los efectos de cargas de choque y compuestos tóxicos en aguas residuales y lodos; también ayudan a permitir la aclimatación biológica a compuestos tóxicos. Esto se puede lograr a través de dos medidas: aumentar el volumen del digestor o la concentración de microorganismos (sólidos) (Gerardi, 2003).

Entre los co-sustratos empleados con FORSU, los lodos de tratamiento de agua residual son los más utilizados (62%), seguido por los residuos animales, principalmente estiércol (16%), residuos de alimentos y agroindustriales (15%) y otros como algas, residuos de jardín, residuos agrícolas y aguas residuales (7%). Además de un buen co-sustrato, se requiere la optimización de la relación de mezcla para una mejor eficiencia del proceso en términos de operación estable y rendimiento. En digestión anaerobia húmeda (<15% de sólidos totales), la mayor producción de biogás y la reducción de sólidos volátiles (SV) se logran con una proporción de mezcla FORSU-lodos de 80/20 con base en sólidos totales (ST) (Tyagi *et al.*, 2018).

La co-digestión de FORSU con lodos de PTAR representa una solución valiosa para la eliminación de residuos orgánicos y una opción para generar energía por una fuente renovable (Esposito *et al.*, 2011 b). Los digestores anaerobios en plantas de tratamiento de aguas residuales a menudo están sobredimensionados (hasta en un 30%) y esto ofrece una buena oportunidad para la co-digestión de lodos con FORSU (Appels *et al.*, 2001; Iacovidou *et al.*, 2012).

3.3 MODELACIÓN DEL PROCESO DE CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA

Las plantas de digestión anaerobia pueden co-digerir una variedad de sustratos para aumentar la producción de biogás. Dado que la cantidad de energía que se puede obtener por los residuos orgánicos depende de la eficiencia del proceso de co-digestión, la optimización operativa de este proceso es estratégicamente relevante. Sin embargo, la selección inadecuada de co-sustratos y su composición además de las condiciones de operación, pueden conducir a la inestabilidad del proceso y la reducción significativa de la producción de metano. Para este propósito, los experimentos a escala piloto ofrecen un alto nivel de éxito, pero requieren mucho tiempo para iniciarse y alcanzar condiciones estables. Además, la digestión anaerobia es un proceso complejo y la evaluación experimental de los efectos de todas las variables involucradas en su eficiencia requiere mucho tiempo lo que la vuelve inviable. Por lo tanto, es necesario un modelo integral de co-digestión para respaldar las decisiones de diseño y operación a gran escala, así como para ayudar en la escala de laboratorio e investigación piloto (Esposito *et al.*, 2011 a; Xie *et al.*, 2016).

Para predecir el comportamiento y ayudar en el diseño y gestión operativa de plantas industriales, se han desarrollado varios modelos estáticos y dinámicos en las últimas décadas. Los primeros modelos propuestos eran modelos cinéticos simples y consistían en un número limitado de ecuaciones. Luego, se desarrollaron modelos adicionales más sofisticados para satisfacer la necesidad de modelar aspectos más complejos de los procesos bioquímicos de la degradación anaerobia (Boubaker y Ridha, 2008; Esposito *et al.*, 2011 b).

En los últimos años ha habido un creciente interés en el modelado de co-digestión anaerobia que ha sido impulsado por la seguridad energética, la recuperación de recursos y la protección ambiental. Sin embargo, los datos de los digestores anaerobios a gran escala son escasos y la mayoría de las investigaciones son a escala de laboratorio por lo que sus resultados no pueden extrapolarse fácilmente (Xie *et al.*, 2016). Por lo anterior, la modelación de la co-digestión se requiere para predecir, de manera clara y confiable, el efecto de mezclar dos o más residuos en un digestor y disminuir los impactos potencialmente negativos de la mezcla basados en decisiones aleatorias o heurísticas. Además, el desarrollo del modelado puede reducir el tiempo y dinero asociado con los experimentos de laboratorio y mejorar la selección de co-sustratos y los índices de dosificación (Mata-Álvarez *et al.*, 2014).

3.3.1 Primeros modelos

El uso de modelos matemáticos capaces de predecir el rendimiento del proceso es muy útil y su desarrollo fue motivado por la necesidad de un funcionamiento eficiente de los sistemas anaerobios. Los modelos sobre la digestión anaerobia se han desarrollado durante casi 40 años. Se han propuesto varios modelos de estado estacionario y dinámico que describen la degradación anaerobia de la materia orgánica, así como algunos que utilizan la cinética del crecimiento de microorganismos para predecir el comportamiento del sistema, mientras que otros dependen puramente de las reacciones químicas que tienen lugar. Estos presentan diferentes niveles de complejidad y se basan en distintas suposiciones y simplificaciones del proceso (Esposito *et al.*, 2011 b; Kythreotou *et al.*, 2014).

De acuerdo con la información recopilada por Dewil *et al.* (2011) sobre los modelos de digestión anaerobia, los primeros se remontan a finales de los años sesenta y principios de los setenta con los propuestos por Andrews (1969) y Andrews y Graef (1971) quienes consideran la metanogénesis como el paso limitante de la velocidad e incluyen la inhibición por acumulación de sustrato descrita por la cinética de Haldane. Gosset y Belser (1982) así como Pavlostathis y Gosset (1986) consideran la etapa de hidrólisis como limitante de la velocidad para la digestión de los lodos activados. Posteriormente se desarrollaron modelos que consideran el proceso como una cadena de etapas de reacción realizadas por distintas poblaciones microbianas. Rozzi *et al.* (1985) dividen el sistema en una fase gaseosa, una fase líquida y un sistema biológico; Costello *et al.* (1991) y Perrier y Dochain (1992) incluyen la degradación de la glucosa. Los primeros modelos consideraban que el sustrato era homogéneo o sintético; por lo tanto, también se desarrollaron otros para sustratos específicos como estiércol líquido (Hill, 1982; Angelidaki *et al.*, 1993), o lodos de aguas residuales (Siegrist *et al.*, 1993). En 1999 Angelidaki *et al.* propusieron un modelo de aplicación general en el que el sustrato se expresa en términos de carbohidratos, proteínas, lípidos y productos de degradación intermedia.

Se ha realizado investigación para comprender la tecnología de co-digestión anaerobia y establecer el efecto de mezclar dos o más residuos individuales en un digestor. En consecuencia, ha surgido la necesidad de un modelado preciso con capacidad para reproducir el comportamiento empírico en una computadora, de manera clara y cuantificable, donde las ecuaciones matemáticas pueden simular los procesos físicos, químicos y biológicos (Zaher *et al.*, 2009).

Mata-Alvarez *et al.* (2011), dan la siguiente reseña sobre los trabajos pioneros de co-digestión anaerobia: Los primeros documentos sobre el modelado de la co-digestión aparecieron entre 1996 y 1999. El primer estudio de modelado de co-digestión se realizó por Boziniš *et al.* (1996), utilizando un modelo de operación basado en un modelo cinético tipo Monod sin inhibición y dependiente de la composición del residuo (lípidos, proteínas y carbohidratos). Otro modelo fue desarrollado por Gavala *et al.* (1996) para la co-digestión de residuos de molinos de aceite, lodos de producción porcina y aguas residuales lácteas, para este, los residuos se definieron por una composición simplificada: carbohidratos (solubles e insolubles), proteínas (solubles e insolubles) y ácidos grasos volátiles. Kiely *et al.* (1997) modelaron los resultados de la co-digestión de FORSU y lodos primarios usando un modelo de dos pasos (hidrólisis/acidogénesis y metanogénesis) el cual introdujo la inhibición del amoníaco, lo que afectó la tasa de crecimiento específica de la biomasa metanogénica y la inhibición del ácido acético en la tasa de producción de metano. Un modelo más reciente y sofisticado, el Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1) se desarrolló en 2002 por el grupo de tareas de modelado matemático de la IWA. Adicionalmente, dos poderosas herramientas de simulación para la co-digestión de combinaciones de desperdicios múltiples y basado en ADM1 han sido reportados por Galí *et al.* (2009) para residuos agrícolas, y Zaher *et al.* (2009) para numerosos residuos sólidos. Ambos modelos fueron desarrollados en MATLAB/SIMULINK, donde la información práctica se toma desde archivos de Excel, aunque los esquemas Simulink son ligeramente diferentes.

Recientemente se han realizado trabajos sobre modelación del proceso de co-digestión anaerobia con el uso de modificaciones al ADM1 para representar de manera más eficiente el proceso de acuerdo a los sustratos con los que se trabaja, así como para evaluar su aplicación a gran escala a través del uso de software especializado; entre estos se encuentren los siguientes: Esposito *et al.* 2011 (a y b) desarrollan modelo basado en ADM1 para simular el proceso de desintegración de FORSU, en el que se confirman resultados sólidos para evaluar la eficiencia del tratamiento y predecir la producción de metano en digestores a gran escala, posteriormente proponen un modelo para simular los procesos bioquímicos en un reactor de co-digestión de lodos de PTAR y FORSU, con resultados idóneos para evaluar el efecto combinado de los parámetros del proceso en el rendimiento del digestor. En 2014 Astals *et al.*, evaluaron las interacciones entre carbohidratos, proteínas y lípidos durante la co-digestión anaerobia de celulosa, caseína y aceite de olivo con el uso del software AQUASIM 2.1. encontrando efectos sinérgicos en la mejora de la cinética del proceso sin un cambio significativo en la biodegradabilidad, los cuales se relacionan con la mitigación de compuestos inhibidores y en 2015 Astals *et al.*, también evaluaron la co-digestión anaerobia de estiércol de cerdo y el alga *Scenedesmus sp.* en el mismo software utilizando los resultados experimentales para desarrollar un concepto acerca de un procesamiento integrado de biorrefinería de estiércol de cerdo y algas cultivadas, evaluando la producción de metano y la recuperación de coproductos. Rathnasiri (2016), simuló con ADM1 en AQUASIM 2.1 la operación de plantas de digestión anaerobia a que tratan residuos de alimentos para investigar el comportamiento del proceso mediante el reciclaje de lodos y variación de la carga, concluyendo

que ADM1 se puede aplicar para modelar y simular plantas de digestión anaerobia a escala piloto. Finalmente, Zhao *et al.* 2019, utilizan ADM1 modificado en AQUASIM 2.0 para simular la digestión anaerobia de residuos de alimentos y proponer parámetros cinéticos que se puedan aplicar a gran escala; sus resultados predicen correctamente la producción de metano y proponen su uso como datos básicos para simulaciones en reactores a gran escala.

3.3.2 Modelación matemática

Debido a la complejidad del proceso de digestión anaerobia, se ha creado una variedad de modelos que cambian según el propósito para el que fueron diseñados. Por la limitación de muchos de ellos para presentar la naturaleza dinámica de la digestión, se han desarrollado modelos complejos para incluir la cinética del crecimiento de microorganismos, otros están diseñados para un sustrato específico o un pequeño número de sustratos y, por lo tanto, no son aplicables a otros tipos de sustrato. Sin embargo, la mayoría de los modelos disponibles permiten el cálculo de la tasa de producción de biogás y metano. Algunos modelos son muy especializados y apuntan exclusivamente a la evaluación de un efecto, por ejemplo, la influencia de la mezcla en la producción de biogás (Kythreotou *et al.*, 2014).

De acuerdo con Xie *et al.* (2016), los modelos matemáticos disponibles para digestión anaerobia y co-digestión se pueden dividir en cinco categorías: modelos cinéticos básicos, ADM1, modelos estadísticos, modelos de dinámica de fluidos computacional (CFD) y otros enfoques de algoritmos.

3.3.2.1 Modelos cinéticos básicos

Los modelos cinéticos de digestión anaerobia se basan en las tasas de crecimiento microbiano y de consumo de sustrato las cuales dependen de una concentración de sustrato limitante del crecimiento. Se asume que los nutrientes son suficientes en los sustratos, y también se pueden incluir expresiones para la inhibición. Estas ecuaciones representan el marco fundamental para simular los procesos de digestión anaerobia (Yu *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2016).

Los modelos cinéticos actualmente disponibles pueden simplificar en exceso la dinámica de los pasos de limitación de velocidad. En otras palabras, el paso de limitación de velocidad puede verse influido por las condiciones operativas, por lo que es poco probable que sea constante. En estos modelos la inhibición de los productos intermedios no puede servir como indicador de la estabilidad del digestor ya que se hace difícil estimar cuando se considera un solo tipo de microorganismo (Yu *et al.*, 2013). Además, los modelos cinéticos básicos (comúnmente utilizados para estudios de lotes a escala de laboratorio) no pueden usarse para proporcionar conocimiento práctico directo para la implementación de co-digestión a gran escala. Estas dificultades impiden una mayor aplicación práctica, lo que llevó al desarrollo del modelo mecanístico más complejo ADM1 (Xie *et al.*, 2016).

3.3.2.2 ADM1

La diversidad y variedad en los modelos desarrollados ha requerido una acción convergente para consolidar los diversos enfoques encontrados en los diferentes modelos existentes (Dewil *et al.*,

2011). En 2002, el Grupo de trabajo de la IWA para el modelado matemático de los procesos de digestión anaerobia desarrolló un modelo matemático integral más sofisticado llamado Modelo de Digestión Anaerobia No.1 (ADM1). Este modelo se basó en el conocimiento sobre modelado y simulación de sistemas de digestión anaerobia surgidos durante los años anteriores y tiene el objetivo de construir un modelo matemático completo basado íntimamente en el modelo fenomenológico para simular reactores anaerobios (Derbal *et al.*, 2009; Esposito *et al.*, 2011; Mata-Alvarez *et al.*, 2011).

El modelo presenta varias aplicaciones prácticas e industriales entre las que se encuentran el diseño, operación, optimización y control de procesos de plantas a gran escala, además de ser una base para el desarrollo y validación de otros modelos y ayudar en la transferencia de tecnología de la investigación a la industria. Aunque se han diseñado muchos modelos anaerobios diferentes a lo largo de los años, su uso por parte de ingenieros, proveedores de tecnología de procesos y operadores ha sido muy limitado probablemente por la variedad de modelos disponibles y su naturaleza muy específica por lo que éste pretende lograr una amplia utilización y apoyar en la aplicación de la tecnología anaerobia como una opción de tratamiento de residuos sostenible y una alternativa viable a otros procesos de generación de energía (Batstone *et al.*, 2002).

La característica más importante del modelo es la consideración de los cinco pasos bioquímicos y fisicoquímicos principales del proceso de digestión anaerobia, así como ocho grupos de bacterias y arqueas:

Paso 1. Desintegración del sustrato (complejos sólidos) en carbohidratos, lípidos, proteínas y material inerte (soluble y particulado);

Paso 2. Hidrólisis de los productos de desintegración por enzimas para producir azúcares, aminoácidos y AGCL, sucesivamente por tres especies de bacterias hidrolíticas;

Paso 3. Acidogénesis con la producción de AGV, hidrógeno y dióxido de carbono por dos especies bacterianas acidógenas;

Paso 4. Acetogénesis en la que AGCL y AGV se oxidan de forma anaerobia en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno por bacterias acetógenas; y

Paso 5. Metanogénesis (producción de metano a través acetato o a través de la reducción del dióxido de carbono por el hidrógeno molecular) por arqueas metanógenas acetoclásticas e hidrogenofílicas (Boubaker y Ridha, 2008; Derbal *et al.*, 2009; Dewil *et al.*, 2011).

El modelo asume una mezcla perfecta de las reacciones que ocurren en la digestión anaerobia. Para definir los tipos de sustratos en el modelo, se debe definir por su composición orgánica e inorgánica completa. Los componentes orgánicos tomados en cuenta por este modelo son: partículas complejas, carbohidratos, proteínas, lípidos, azúcares, aminoácidos, AGCL, AGV (acetato, propionato, butirato y valerato) y sustratos inertes (suspendidos y solubles). Los componentes inorgánicos considerados son: nitrógeno de amonio, bicarbonato, aniones (fosfato, sulfato, nitrato) y cationes (calcio, potasio, magnesio) (Boubaker y Ridha, 2008).

Los componentes se expresan en términos de DQO ($\text{g O}_2/\text{g}$ de lodo). Todos los pasos extracelulares bioquímicos se consideran de primer orden, mientras que las reacciones bioquímicas intracelulares

utilizan cinéticas de tipo Monod para la captación de sustrato acompañadas con el crecimiento de biomasa (Dewil *et al.*, 2011).

La muerte de la biomasa está representada por una cinética de primer orden considerada como un material particulado compuesto. Incluye la inhibición de la actividad biológica por pH, hidrógeno y amoníaco libre (Dewil *et al.*, 2011).

Está estructurado con 32 variables de concentración de estado dinámico e involucra 19 procesos de tasa bioquímica. El conjunto de ecuaciones diferenciales es el siguiente:

- 10 para modelar la evolución de las concentraciones de materia soluble en fase líquida y 2 para modelar los niveles de carbono y nitrógeno inorgánicos en fase líquida.
- 12 para representar el comportamiento dinámico de las partículas y las concentraciones de biomasa en fase líquida.
- 2 para modelar los niveles de cationes y aniones en fase líquida y
- 6 adicionales para las reacciones ácido-base para determinar el pH del efluente y calcular las formas ionizadas de AGV, nitrógeno amoniacal libre y concentraciones de dióxido de carbono (Figura 3.4) (Boubaker y Ridha, 2008; Dewil *et al.*, 2011).

El ADM1 fue diseñado para ser fácil y extensible y ha sido probado y utilizado en diferentes sustratos. Los trabajos que abordan la co-digestión utilizando el ADM1 consideran dos premisas: 1) el componente para material complejo no se puede usar como fracción de entrada, por lo que la caracterización del sustrato debe ser en términos de carbohidratos, proteínas, lípidos, así como inertes particulados y solubles para obtener mejores resultados de producción de biogás; 2) la etapa de desintegración/hidrólisis generalmente se considera la etapa limitante de la velocidad durante la degradación de la materia orgánica particulada (Mata-Alvarez *et al.*, 2011).

Las implementaciones de ADM1 están disponibles en Matlab y Simulink, pero también en software específico de simulación relacionada con el agua, como WEST y AQUASIM (Dewil *et al.*, 2011).

3.3.2.3 Modelos estadísticos

Los modelos estadísticos enfatizan la interrelación entre los parámetros clave (por ejemplo, relación sustrato/co-sustrato, C/N, CO y temperatura) y las salidas (por ejemplo, rendimiento de metano y reducción de sólidos volátiles totales). Hay dos enfoques estadísticos de uso más frecuente en co-digestión anaerobia: el diseño de mezcla simplex-centroide y el diseño compuesto central (DCC). El primero contiene diferentes combinaciones de mezcla de sustrato como variables, mientras que el último puede involucrar varios factores, como las relaciones de sustrato/co-sustrato y las de C/N. Ambos son métodos adecuados para optimizar la producción de metano a partir de co-digestión anaerobia utilizando una variedad de sustratos (Wang *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2016).

Estos modelos pueden informar el diseño de las condiciones iniciales y los parámetros para lograr una salida óptima para la operación a gran escala del sistema de co-digestión. La limitación predictiva de esta metodología varía de un estudio a otro por a las sensibilidades de las múltiples

varianzas reportadas en cada caso de estudio. El grado de similitud de la cinética de reacción, las sensibilidades y la inhibición entre los digestores a escala de laboratorio determina la precisión para predecir las mediciones a gran escala. Por lo tanto, se puede reconocer que existen algunas limitaciones en la aplicación de modelos estadísticos para predecir una relación altamente compleja en co-digestión (McLeod *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2016).

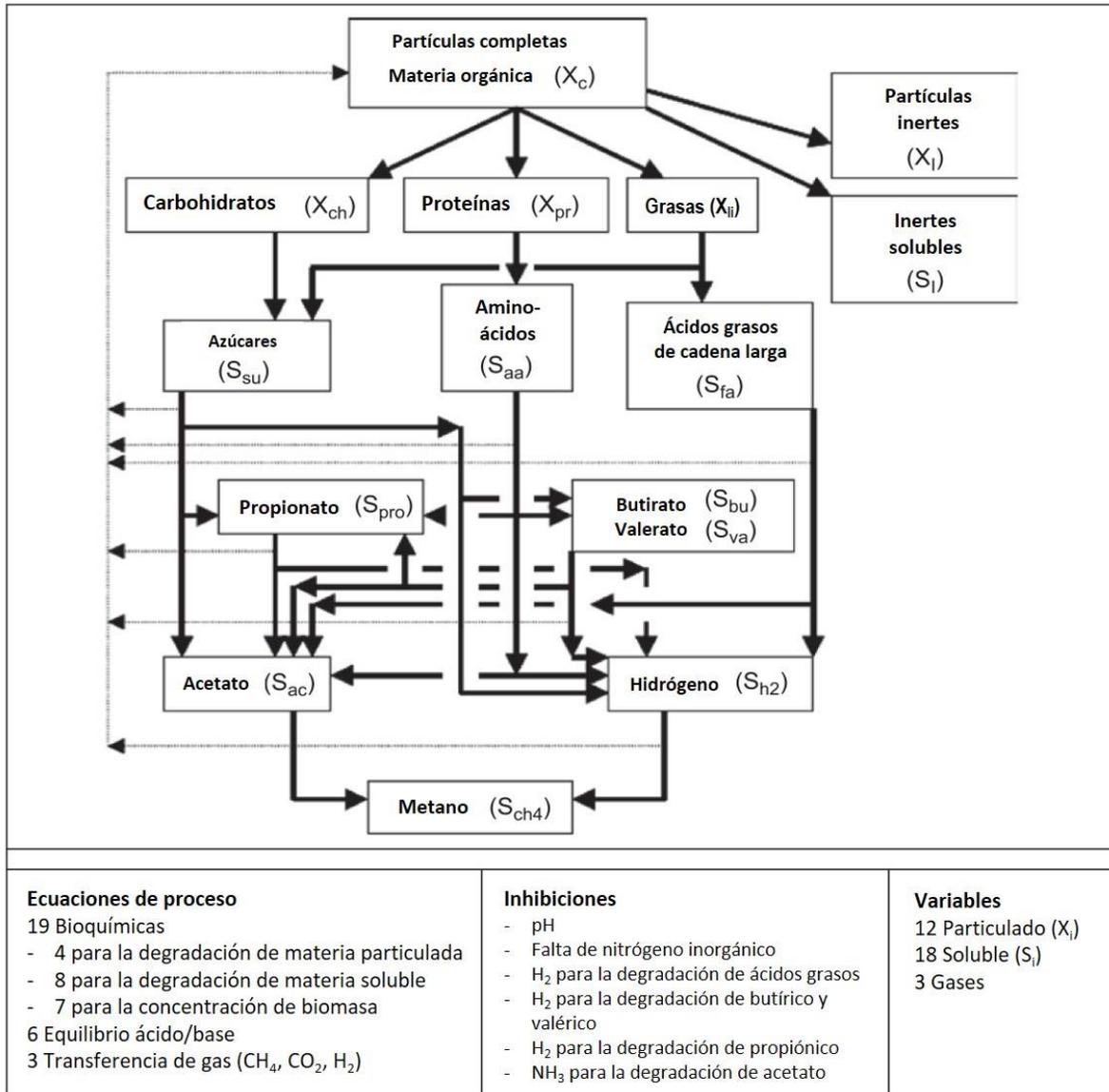


Figura 3.4. Procesos bioquímicos del modelo ADM1, número de ecuaciones, variables y otros parámetros del modelo (Mata-Alvarez *et al.*, 2011)

3.3.2.4 Modelos CFD

Los modelos CFD (del inglés Computational Fluid Dynamics) ofrecen un enfoque versátil para estudiar el flujo y campos de velocidad, turbulencia, trayectorias de partículas, tasas de energía, disipación, transporte de componentes disueltos y para determinar volúmenes de alta intensidad de mezcla y zonas estancadas, basados en la geometría del digestor, ubicaciones de alimento y condiciones de operación (Yu *et al.*, 2013). Estos modelos se pueden implementar para diseñar, evaluar y optimizar el proceso de co-digestión anaerobia (Lindmark *et al.*, 2014). Aunque se han utilizado ampliamente para abordar el problema del diseño hidráulico en el sistema de co-digestión anaerobia, la relación entre la mezcla y el rendimiento de metano no se ha aclarado por completo. Rara vez se han acoplado con modelos biológicos debido principalmente a la complejidad de la simulación numérica y la estabilidad del modelo cuando se usan las ecuaciones de velocidad biológica (Xie *et al.*, 2016).

3.3.2.5 Otros enfoques de algoritmos

De acuerdo con Xie *et al.* 2016, debido a la complejidad de los procesos de co-digestión anaerobia, se ha desarrollado el uso de algunos enfoques de algoritmos, el llamado Redes neuronales artificiales no necesita la información sobre las interrelaciones entre las variables clave (caja negra), sin embargo, se requiere la especificación de la arquitectura de red y datos de entrada consistentes para su implementación. Este puede reducir significativamente el tiempo de desarrollo del proceso para la co-digestión. El enfoque llamado Optimización de colonia de hormigas (OCH) se ha aplicado para mejorar la descarga de residuos orgánicos de diferentes fuentes en tiempo real, el algoritmo maximiza la generación de biogás a través de co-digestión, siendo útil para respaldar la toma de decisiones y mejorar la sostenibilidad de los residuos orgánicos. En el adoptado por Fang *et al.* (2009), se utilizan los mínimos cuadrados no lineales ponderados y el algoritmo genético de aceleración para estimar los parámetros cinéticos del almacenamiento de lodos activados. Estos enfoques pueden ser ventajosos, ya que solo requieren un conocimiento mínimo de los mecanismos de reacción y las mediciones experimentales de varios parámetros durante la co-digestión anaerobia. Los inconvenientes son la falta de flexibilidad para el diseño del reactor y la ampliación, así como el requisito de relaciones de entrada/salida complejas y diversas para entrenar el método para el escenario real.

De acuerdo con lo anterior, en la Tabla 3.2, se presentan las ventajas y limitaciones de los tipos de modelos mencionados. Posteriormente, en la Tabla 3.3, se muestran las características y aspectos generales de algunos modelos actuales de co-digestión anaerobia.

Además de los mencionados, Kythreotou *et al.* (2014) han considerado también la producción teórica de biogás y calculadoras simples. Los primeros permiten determinar la producción potencial de biogás y su composición por medio de la digestión anaerobia de un tipo particular de residuo a partir de la composición química de la materia prima a digerir. Existen formas sencillas de calcular la producción de biogás a partir de modelos desarrollados que se basan en datos de elementos o componentes básicos de materia orgánica y dan como resultado únicamente estimaciones de la producción de metano y dióxido de carbono. Estos modelos son independientes del tiempo, por lo que no se puede estimar el tiempo de retención necesario de los residuos en el digestor. Las

calculadoras simples proporcionan la información necesaria, sin necesidad de involucrarse ampliamente en la digestión anaerobia. En la mayoría de los casos, los productos finales son la cantidad de energía y biogás que se puede producir a partir de la digestión de un determinado flujo de residuos; en varios casos es común un análisis financiero, mientras que también hay algunas que calculan la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y estiman los impactos ambientales. Las calculadoras simples no demandan una gran cantidad de datos especializados y son accesibles para agricultores y otras partes interesadas con un conocimiento científico limitado sobre el tema de la digestión anaerobia.

Tabla 3.2. Ventajas y limitaciones de cinco categorías de modelos (Xie *et al.*, 2016)

Categorías de modelos	Ventajas	Limitaciones
Modelos cinéticos básicos	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de implementar • Identifican la constante de velocidad de hidrólisis 	<ul style="list-style-type: none"> • Simplifican en exceso la dinámica de los pasos que limitan la velocidad • No se puede proporcionar conocimiento práctico directo para la implementación a gran escala
ADM1	<ul style="list-style-type: none"> • Los modelos más ampliamente aplicados y reconocidos en el área de investigación • Modelo mecanicista que permite ampliaciones y modificaciones para aumentar su capacidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere práctica y experiencia • La caracterización del sustrato es laboriosa • La conversión y distribución de S, P y N están subdesarrolladas
Modelos estadísticos	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis cualitativo para ayudar al diseño de condiciones iniciales y parámetros para una salida óptima de co-digestión anaerobia 	<ul style="list-style-type: none"> • Las variaciones en la cinética de reacción, las sensibilidades y la inhibición determinan la precisión de las predicciones a gran escala
Modelos CFD	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis de resultados visuales efectivos e intuitivos • Revela los efectos de la mezcla en los procesos de co-digestión anaerobia • Proporciona un diseño hidráulico óptimo para el sistema de co-digestión anaerobia 	<ul style="list-style-type: none"> • Simulación numérica compleja • Inestabilidad del modelo cuando el proceso físico se acopla con el proceso biológico
Otros enfoques de algoritmos	<ul style="list-style-type: none"> • Requerimientos mínimos para el conocimiento en los mecanismos de reacción y mediciones de parámetros experimentales durante la co-digestión anaerobia 	<ul style="list-style-type: none"> • Las carencias de flexibilidad para el diseño del reactor y su ampliación • Requiere relaciones de entrada-salida complejas y diversas para entrenar el método para un escenario real

Tabla 3.3. Modelos actuales de co-digestión (Xie *et al.*, 2016 modificado)

Modelos	Características	Aspectos / Resultados	Requisitos/ Observaciones	Aplicaciones	Ventajas	Inconvenientes
Modelo transformador GISCOD en Matlab-Simulink Zaher <i>et al.</i> (2009).	<ul style="list-style-type: none"> - Composición de residuos como entrada - Desacopla la hidrólisis de la biomasa en descomposición para ADM1 - Optimización de procesos 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimar tasas de hidrólisis precisas para cada residuo y fracción de partículas - Determina la relación óptima entre flujos de residuos y TRH cambiando las CO - Simula una cantidad de materias primas y caudales utilizando dos volúmenes de digestores 	<ul style="list-style-type: none"> - Caracterización de co-sustratos - Una función S C-MEX como una capacidad de modelado adicional 	<ul style="list-style-type: none"> - Herramienta de simulación del proceso de digestión anaerobia aplicable a cualquier combinación de flujo de residuos usando la plataforma de simulación Matlab-Simulink 	<ul style="list-style-type: none"> - Interconecta ADM1 con cualquier combinación de residuos co-digeridos - Las entradas de los componentes de cada residuo se evalúan dinámicamente - Los parámetros de hidrólisis se consideran por separado para cada residuo y se desacoplan de la hidrólisis de la biomasa en descomposición 	<ul style="list-style-type: none"> - Se requieren entradas detalladas para ADM1 - Se deben estimar tasas de hidrólisis precisas para cada residuo y fracción de partículas para una simulación confiable de la producción de biogás en proporciones variables de residuos co-digeridos - Requiere gran número de parámetros y estados necesarios cuando se alimentan múltiples sustratos complejos
Un modelo de planta completa en el simulador de modelo de proceso SUMO de Dynamita SARL. Aichinger <i>et al.</i> (2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Simular procesos anaerobios bajo altas concentraciones de sólidos o altas temperaturas 	<ul style="list-style-type: none"> - Identificar características del co-sustrato de un modelo calibrado - Interpretar efectos sinérgicos en co-digestión anaerobia como incremento de la constante de la velocidad de hidrólisis - Mayor contenido biodegradable de co-sustratos resulta en una producción de gas mayor 	<ul style="list-style-type: none"> - La constante de velocidad de hidrólisis es crítica para efectos sinérgicos - Los elementos traza y los nutrientes o un cambio en la diversidad microbiana conducen a una actividad hidrolítica variada 	<ul style="list-style-type: none"> - Herramienta de simulación para el rendimiento de digestores 	<ul style="list-style-type: none"> - Calibración del modelo para la simulación de la formación de biomasa en las etapas de tratamiento - Identificación de las características de alimentación del proceso de hidrólisis térmica del lodo - Incluye la solubilización de la DQO particulada y pasteurización de la biomasa 	<ul style="list-style-type: none"> - El incremento en co-digestión no puede ser descrito por la tasa de hidrólisis establecida - Se desconoce el origen de la actividad hidrolítica en la sinergia del proceso - El modelo comercial para la producción neta de energía de los co-sustratos se basa en la valorización de la energía verde, debido a la brecha entre la compra y el precio de venta de la electricidad
Modelo basado en Benchmark Simulation Model No. 2 (BSM2) y ADM1. Arnell <i>et al.</i> (2016)	<ul style="list-style-type: none"> - Una simulación de toda la planta - Modelo de co-digestión anaerobia implementado en BSM2 - Caracterización de co-sustrato para ADM1 	<ul style="list-style-type: none"> - Confirmar los efectos positivos de la co-digestión en la producción de metano y el costo de operación - Revelar la importancia del límite de carga de proteínas y la prevención de la inhibición de NH₃ en el digestor 	<ul style="list-style-type: none"> - Identificar dos modos principales de falla: inhibición de NH₃ y AGCL a través del análisis de componentes principales 	<ul style="list-style-type: none"> - Comparación del rendimiento de diferentes estrategias de control en un marco unificado 	<ul style="list-style-type: none"> - Representa un modelo de planta completa que incluye la digestión de lodos con ADM1 - Utiliza la misma formulación de alimento para digestión anaerobia que el modelo GISCOD 	<ul style="list-style-type: none"> - La implementación estándar actual de ADM1 en BSM2 no permite la adición de co-sustratos o parámetros de hidrólisis dinámica - Faltan algunas limitaciones importantes en la digestión anaerobia relacionada con la práctica común de co-digestión en las PTAR, como la inhibición de AGCL - La calibración de los parámetros representa un desafío para el modelado de co-digestión por la variación en composición de los co-sustratos
Modelo modificado basado en ADM1. Boubaker y Ridha (2008)	<ul style="list-style-type: none"> - Una función no competitiva para representar la inhibición metanogénica - La expresión de inhibición para la captación de acetato 	<ul style="list-style-type: none"> - Se obtienen resultados similares a los observados en los experimentos, incluida una condición de sobrecarga - Predecir la falla del digestor con un TRH más corto 	<ul style="list-style-type: none"> - Observar algunas inconsistencias entre los resultados de la simulación y los resultados experimentales 	<ul style="list-style-type: none"> - Diseño de plantas industriales a gran escala para el proceso de co-digestión 	<ul style="list-style-type: none"> - Cambio en el factor de inhibición aplicado a la tasa de consumo de acetato del modelo original ADM1 - Se agrega una función no competitiva para tener en cuenta la inhibición de los pasos metanogénicos por la alta concentración total de AGV, que el modelo ADM1 original no predice muy bien 	<ul style="list-style-type: none"> - Si no se agrega el término de inhibición, el modelo ADM1 original no podría predecir una falla del reactor con un TRH corto - Se observan discrepancias entre las simulaciones y las mediciones previas debidas a la correlación de parámetros sensibles, (constantes de hidrólisis con concentración de alimentación y TRH), y algunas debilidades potenciales del modelo ADM1

<p>Modelo modificado basado en ADM1. Zhou <i>et al.</i> (2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollar un sistema de control de retroalimentación de entrada-salida para mantener las condiciones de operación deseables 	<ul style="list-style-type: none"> - Investigar dos factores operativos importantes, TRS y CO, durante la co-digestión anaerobia de: <ol style="list-style-type: none"> (1) residuos biológicos y ensilaje de maíz, (2) estiércol y ensilaje de maíz, y (3) residuos orgánicos y estiércol - Identificar la proporción óptima de co-sustrato/sustrato 	<ul style="list-style-type: none"> - Estiércol/lodos de aguas residuales contribuye a la estabilidad del proceso - Los residuos biológicos son preferibles para ser codigeridos con lodos de plantas de tratamiento o estiércol 	<ul style="list-style-type: none"> - Comparación de las características de diferentes sustratos mediante procesos de digestión anaerobia bajo cambios de condición operacional - Evaluación de los rendimientos del proceso y desarrollo de un sistema de control para los procesos 	<ul style="list-style-type: none"> - Implementación de un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas con 29 variables de estado dinámico (sustratos e intermediarios de reacción y productos gaseosos) y 7 variables algebraicas. A diferencia del original con 26 y 8 ecuaciones respectivamente - Las ecuaciones tienen una parte no lineal, que describe las transformaciones químicas en el sistema y se expresa a través de mecanismos cinéticos, y una parte lineal que describe el comportamiento hidráulico del reactor 	<ul style="list-style-type: none"> - Fluctuaciones en los resultados de producción de biogás en mono sustratos debidas a los intervalos de carga pueden generar dificultades en la administración del funcionamiento de las operaciones del sistema - Se requieren datos reales para una mejor evaluación del modelo ya que los resultados expuestos son relativamente limitados debido a que los parámetros de entrada fueron extraídos de la literatura
<p>Modelo modificado basado en ADM1. Esposito <i>et al.</i> (2011)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dos sustratos de diferentes cinéticas de biodegradación - Simular el proceso de desintegración de FORSU 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectos de la distribución del tamaño de partículas y las condiciones de operación en la eliminación de DQO y la producción de metano - Predecir el fallo del proceso con el efecto combinado de la distribución del tamaño de partícula y las CO 	<ul style="list-style-type: none"> - Tamaño de partícula grande = CO más alta para alcanzar la falla del digestor - Se produce una desintegración más lenta y, por lo tanto, una acidificación más lenta para partículas de gran tamaño 	<ul style="list-style-type: none"> - Predecir el potencial de producción de metano y simular el efecto de inhibición del pH debido a la producción de ácidos grasos de cadena larga 	<ul style="list-style-type: none"> - Considera dos sustratos de entrada separados - Incluye separación de cada producto del proceso de desintegración (carbohidratos, proteínas y lípidos) en dos fracciones, fácilmente biodegradable y lentamente biodegradable - Introduce una constante de mayor velocidad de hidrólisis para la fracción fácilmente biodegradable y una constante de menor velocidad de hidrólisis para la lentamente biodegradable 	<ul style="list-style-type: none"> - Se requiere la calibración del modelo matemático propuesto para predecir el rendimiento de un digestor a gran escala alimentado con una FORSU específica - El modelo se formula a partir de algunas suposiciones (reactor CSTR; todas las especies químicas son completamente solubles; las reacciones son instantáneas e isotérmicas; el logro del equilibrio es inmediato; no se producen reacciones como la formación de iones complejos o la precipitación en el reactor)

3.3.3 Modelación de la co-digestión anaerobia de lodos de tratamiento de agua residual con residuos orgánicos

Dado que la cantidad de energía que se puede obtener con los residuos orgánicos depende de la eficiencia del proceso de co-digestión, su optimización operativa es estratégicamente relevante. Para este propósito, los experimentos a escala piloto ofrecen un alto nivel de éxito, pero requieren mucho tiempo para iniciarse y alcanzar condiciones de estado estable. Además, la digestión anaerobia es un proceso complejo y la evaluación experimental de los efectos de todas las variables involucradas requiere mucho tiempo y es casi imposible (Esposito *et al.*, 2011).

La co-digestión difiere significativamente de la mono-digestión en la intensidad del proceso, así como en la composición del sustrato (por ejemplo, variación temporal, contenido de nutrientes, y biodegradabilidad). A manera de ejemplo, las entradas y salidas necesarias para describir el proceso de mono-digestión y co-digestión de lodos de tratamiento de agua residual y residuos orgánicos se muestran en la Figura 3.5. En general, para ajustar las inhibiciones inducidas por co-sustratos y para

predecir el rendimiento del sistema de co-digestión, se requieren las caracterizaciones de éstos, sus cargas orgánicas y diversos términos de inhibición como entradas clave. Como tal, se espera que la modelación del proceso produzca una amplia gama de productos, por ejemplo, los valores máximos recomendados de CO, las relaciones óptimas de sustrato principal/co-sustrato, la calidad del biogás y parámetros relacionados con su estabilidad (Xie *et al.*, 2016).

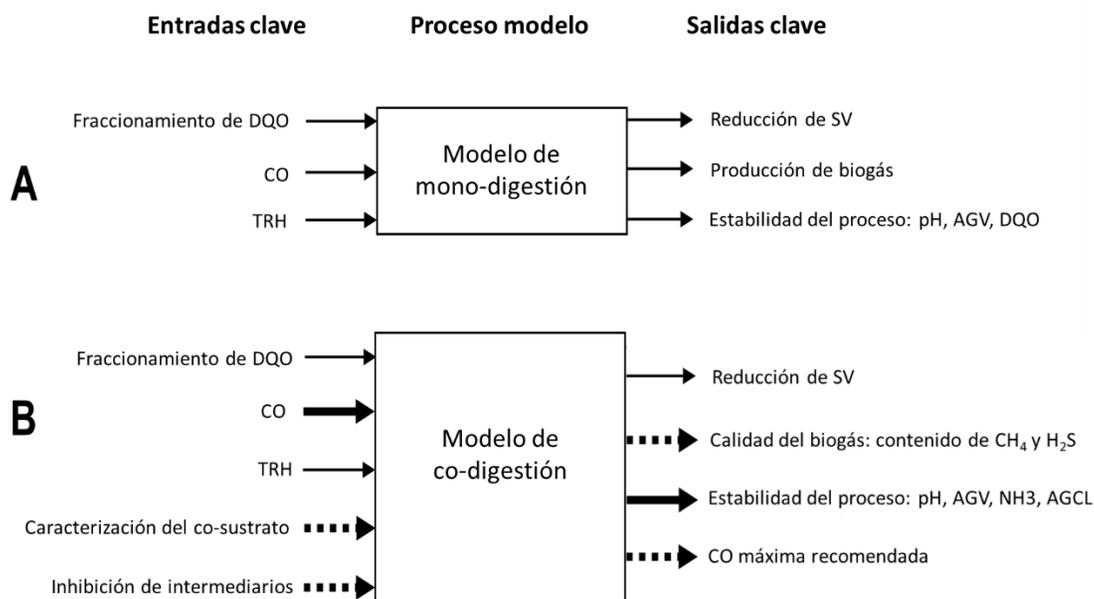


Figura 3.5. Comparación de modelos matemáticos entre la mono-digestión de lodos de tratamiento de agua residual (A) y co-digestión de lodos de tratamiento de agua residual y residuos orgánicos (B). Nota: Las flechas engrosadas indican la necesidad de un mayor desarrollo de la capacidad de modelado existente, mientras que las flechas discontinuas indican la necesidad de nuevas capacidades de modelado (Xie *et al.*, 2016)

Como la mono-digestión de lodos de tratamiento de agua residual es usualmente operada a CO bajas (típicamente menores de 1.0 kg SVT/m³/d), los requerimientos son frecuentemente simplificados para incluir sólo la fracción orgánica (por ejemplo, el fraccionamiento de DQO y la CO) y la carga hidráulica (por ejemplo, TRH) como entradas clave, mientras las salidas clave son reducción de SVT y producción de biogás. Como resultado, la necesidad de evaluar la estabilidad del proceso es limitada, aunque varios indicadores (por ejemplo, pH y alcalinidad) y productos intermedios (por ejemplo, AGV) han sido usados con éxito para modelar la mono-digestión. La co-digestión es inherentemente más compleja que la mono-digestión; varios factores críticos incluyendo las propiedades y composición del co-sustrato, sus inhibiciones inducidas y CO pueden afectar significativamente el proceso. Al agregar co-sustratos ricos en azufre, se puede esperar un contenido de H₂S desfavorable en el biogás, lo que puede influir negativamente en su posterior utilización. El alto nivel de H₂S se debe a los procesos de reducción de sulfato que superan a la metanogénesis de las fuentes de energía y carbono en condiciones anaerobias. Además, el proceso de co-digestión generalmente opera a una CO mucho más alta y, por lo tanto, es más susceptible a la inestabilidad del proceso en comparación con la mono-digestión (Xie *et al.*, 2016).

La aplicación de un modelo es un paso importante en la evaluación de la viabilidad de las plantas de tratamiento de residuos, ya que es necesario que haya datos sólidos disponibles que demuestren su eficiencia para que se realicen las inversiones necesarias. Los modelos disponibles tienen una amplia gama de aplicaciones y objetivos. Además, se puede apreciar una gran variación en su complejidad, por ejemplo, existen desde simples calculadoras que sólo estiman la producción de biogás en función del número de animales en un centro de producción, hasta modelos detallados que simulan cada etapa de la digestión anaerobia, con extensas bases de datos de información que se requiere aplicar. Sin embargo, debido a las interferencias entre los procesos fisicoquímicos y biológicos, los casos en los que se aplican modelos altamente detallados a diferentes sustratos y condiciones son limitados (Kythreotou *et al.*, 2014).

3.4 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS ANALIZADOS

La Tabla 3.4 muestra la evaluación que se realizó de acuerdo con la revisión bibliográfica de los tipos de modelos matemáticos disponibles para el proceso de mono-digestión y co-digestión anaerobia de acuerdo con Kythreotou *et al.* (2014) y Xie *et al.* (2016) en los que se describen las características generales, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Para ello se consideraron algunos criterios que tienen la finalidad de resumir la viabilidad de cada uno de estos y con ello permitir la selección de los que mejor se ajusten a los propósitos del presente trabajo. Con respecto al criterio del número de publicaciones de los modelos se tomó en cuenta la información disponible en la base de datos Scopus de Elsevier en la que se ingresaron como criterios de búsqueda el tipo de modelo aplicado al proceso de digestión anaerobia y los datos reportados corresponden al periodo de los años 2010 a 2019. Los criterios restantes hacen referencia a la idoneidad de los sustratos con respecto a su aplicación en el modelo, la facilidad para la obtención de las variables de cálculo, así como de la programación y/o realización de cálculos, su flexibilidad y la posibilidad de aplicación en procesos a gran escala. De ellos se consideraron las opciones positiva o negativa de acuerdo a cada criterio, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de positivos.

Como resultado se puede observar que los modelos cinéticos básicos y ADM1 presentan la mayor cantidad de registros en la base de datos Scopus. Sin embargo, en la evaluación, los modelos de producción teórica de biogás y ADM1 son los que más se apegan a los criterios seleccionados respectivamente, lo cual indica que tienen la mayor factibilidad para su aplicación, motivo por el que se considera el uso del modelo ADM1 a través del software AQUASIM 2.0 en el desarrollo del presente trabajo.

Tabla 3.4. Evaluación de los modelos propuestos por Kythreotou *et al.* (2014) y Xie *et al.* (2016) con respecto a su utilidad en el presente trabajo

CRITERIO	TIPO DE MODELO											
	CINÉTICOS BÁSICOS		ADM1		ESTADÍSTICOS		CFD		ENFOQUES DE ALGORITMOS		PRODUCCIÓN TEÓRICA	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
No. de publicaciones de acuerdo con Scopus (2010-2019)	525		223		123		56		33		27	
Sustratos idóneos	X		X		X			X	X		X	
Facilidad de obtención de variables de cálculo	X		X		X			X	X		X	
Facilidad de programación y/o cálculos	X			X		X		X		X	X	
Flexibilidad		X	X			X	X			X	X	
Aplicación a gran escala		X	X		X		X			X	X	
Total	3	2	4	1	3	2	2	3	2	3	5	0

3.5 COMUNIDAD MICROBIANA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

La complejidad de la actividad microbiana se considera una de las razones principales de falta de conocimientos básicos sobre los sistemas de digestión. La cooperación entre los miembros clave de la comunidad es necesaria para el desempeño óptimo de la digestión anaerobia y una mayor comprensión de esto puede proporcionar información útil tanto para el diseño como para la gestión de las instalaciones de este proceso. Se han propuesto varios métodos para especificar el tamaño de los digestores y para optimizar su rendimiento y los resultados han mostrado que la co-digestión ofrece una solución más estable, energética y ambientalmente eficiente; sin embargo, los enfoques de diseño más extendidos para los digestores anaerobios ignoran completamente el aspecto relacionado con las poblaciones microbianas y su relación con los otros parámetros operativos y con los rendimientos del proceso. Por este motivo, en los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre la ecología de la digestión anaerobia (Di Maria y Barratta, 2015).

La degradación anaerobia de la materia orgánica requiere al menos cuatro consorcios microbianos específicos fisiológicamente diferentes: microbios primarios de fermentación que hidrolizan compuestos orgánicos complejos, generando principalmente alcoholes, ácidos grasos de cadena corta, ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena larga; microbios de fermentación secundaria que oxidan estos productos a acetato, H₂ y CO₂. El H₂ y el CO₂ se convierten en metano mediante metanógenos hidrogenotróficos, mientras que el acetato se mineraliza en CH₄ y CO₂ mediante

metanógenos acetoclásticos. Otras rutas metanogénicas son posibles, por ejemplo, basadas en el uso de otros ácidos grasos, como el formiato, pero son insignificantes en comparación con los anteriores. De acuerdo con la clasificación taxonómica (Tabla 3.5), los grupos de microorganismos primarios y secundarios pertenecen al dominio *Bacteria*, mientras que los microorganismos metanogénicos pertenecen al dominio *Archaea* (Di Maria, 2017).

Tabla 3.5. Taxonomía de la mayoría de las poblaciones microbianas detectadas durante la co-digestión anaerobia (Modificado de Di Maria, 2017)

Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>
	Bacteroidetes	Alphaproteobacteria	Actinomycetales	Anaerobrancaceae	<i>Ammoniflex</i>
	Firmucutes	Bacilli	Alteromonadales	Bacillaceae	<i>Anaerobranca</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Bacillales	Bacteroidaceae	<i>Bacillus</i>
	Spirochaetes	Clostridia	Burkholderiales	Clostridiaceae	<i>Caldicellulosiruptor</i>
	Synegetetes	Deltaproteobacteria	Chromatiales	Desulfovibrionaceae	<i>Clostridium</i>
	Tenericutes	Flavobacteria	Clostridiales	Dethiosulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>
	Thermotogae	Gammaproteobacteria	Desulfovibrionales	Ectothiorhodospiraceae	<i>Desulfurispora</i>
		Methanomicrobia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Dethiosulfovibrio</i>
		Mollicutes	Myxococcales	Flexibacteraceae	<i>Emticicia</i>
		Sphingobacteriia	Natranaerobiales	Heliobacteriaceae	<i>Eubacterium</i>
		Synergistria	Oceanospirillales	Idiomarinaceae	<i>Heliorestis</i>
		Thermotogae	Pseudomonadales	Paenibacillaceae	<i>Moorella</i>
			Sphingobacteriales	Peptococcaceae	<i>Pedobacter</i>
			Sphingomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pelotomaculum</i>
			Spirochaetales	Sphingomonadaceae	<i>Peptococcus</i>
			Synergistales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Petrotoga</i>
			Syntrophobacteriales	Thermotogaceae	<i>Propionispora</i>
			Thermoanaerobacteriales	Thermovenabulum	<i>Pseudidiomarina</i>
			Thermotogales	Veillonellaceae	<i>Pseudomonas</i>
				<i>Selenomonas</i>	
				<i>Syntrophomonas</i>	
				<i>Thermoanaerobacter</i>	
				<i>Thermovenabulum</i>	
				<i>Treponema</i>	
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanobacterium</i>
		Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>
			Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanoculleus</i>
					<i>Methanogenium</i>
					<i>Methanosaeta</i>
					<i>Methanospirillum</i>
					<i>Methanothermobacter</i>
				<i>Methanosarcina</i>	

Los filos más importantes involucrados en los procesos de co-digestión anaerobia son los *Firmicutes* (principalmente *Clostridiales*), *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. Las arqueas metanogénicas se pueden clasificar en función de los dos principales sustratos utilizados para la generación de metano: metanógenos acetoclásticos (*Methanosaeta*) y metanógenos hidrogenotróficos (*Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* y *Methanococcales*) (Tyagi *et al.*, 2018).

Durante la metanogénesis las arqueas metanogénicas producen metano a partir de los sustratos generados durante los pasos anteriores de la cadena trófica (acetato e hidrógeno), pero, en una cantidad mucho menor, también se genera metano a partir de formiato, metanol, metilamina y

sulfuro de dimetilo. Las especies microbianas acetoclásticas son limitadas, pero, en general, producen el 70% de todo el metano generado durante la digestión anaerobia. El 30% restante suele ser producido por arqueas hidrogenotróficas heterótrofas. Estrictamente, los metanógenos acetoclásticos son el género *Methanosaeta* capaz de operar con concentraciones de amonio y acetato menores a 3000 mg/L. *Methanosarcina sp.* son capaces de utilizar vías metanogénicas tanto acetoclásticas como hidrogenotróficas, y por lo tanto son más tolerantes a los inhibidores específicos de la vía acetoclástica. *Methanosarcina* opera de manera estable a concentraciones de amonio y acetato de hasta 7,000 y 15,000 mg/L, respectivamente (Di Maria, 2017). En las Tablas 3.6 y 3.7 se muestran las principales rutas para producción de metano de los principales microorganismos que llevan a cabo el proceso y los límites de inhibición de algunos parámetros para dos de los principales géneros involucrados en la digestión anaerobia respectivamente.

Tabla 3.6. Vía metanogénica de la mayoría de los metanógenos difusos (Di Maria, 2017)

Asignación taxonómica	Ruta metanogénica
<i>Candidatus Methanoregula</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanobacterium</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanobrevibacter</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanocorpusculum</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanoculleus</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanofollis</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanogenium</i> (g)	H ₂ /CO ₂
Methanomicrobiales (o)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanosaeta</i> (g)	Acetato
<i>Methanosarcina</i> (g)	Acetato, H ₂ /CO ₂
<i>Methanospirillum</i> (g)	H ₂ /CO ₂
<i>Methanothermobacter</i> (g)	H ₂ /CO ₂

Acetato, Acetoclástico; H₂/CO₂, hidrogenotrófico; g, género; o, orden.

Tabla 3.7. Límites de inhibición de *Methanosaeta* y *Methanosarcina* para algunos de los principales parámetros de la digestión anaerobia (Modificado de Di Maria, 2017)

Parámetro	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanosarcina</i>
NH ₄ ⁺ (mg /L)	<3,000	<7,000
Intervalo de pH	6.5–8.5	5–8
Temperatura (°C)	7–65	1–70
Acetato (mg/L)	<3,000	<15,000

Las vías bioquímicas involucradas en el proceso de digestión anaerobia se basan en funciones microbianas complejas y diversas. Por lo tanto, es importante comprender el efecto de la composición y función de la comunidad microbiana con respecto a los parámetros operativos requeridos para operar un digestor en condiciones óptimas y maximizar la recuperación de energía (Fitamo *et al.*, 2017).

Tyagi *et al.*, (2018) menciona que las condiciones operativas y la composición del sustrato (como la mezcla, temperatura, CO, concentración de amoníaco y AGV), afectan significativamente la composición de la comunidad microbiana. Por ejemplo, un balance adecuado de nutrientes conduce a una comunidad microbiana más robusta y versátil, que puede soportar mejor las

tensiones operativas, en el caso de la temperatura, variaciones de 38 a 55 °C pueden llevar a una disminución en filotipos de *Bacteroidetes* y una proliferación en *Clostridiales* no clasificados.

De acuerdo con Fitamo *et al.* (2017) las variaciones de la comunidad microbiana pueden influir en el proceso de digestión anaerobia y, por lo tanto, inhibir o mejorar el proceso. Por ejemplo, el bioaumentado de *Methanoculleus bourgensis* MS2T (metanógeno hidrogenotrófico) en un digestor anaerobio puede desempeñar un papel importante en la superación de la inhibición del amoníaco. También reporta que se han observado cambios en las vías metanogénicas y en la composición de la comunidad metanogénica cuando el cultivo microbiano está expuesto a concentraciones crecientes de acetato y amoníaco, mientras que bacterias específicas como la *Microthrix filamentosa* o *Nocardia* han demostrado estar asociadas con la formación de espuma en reactores de biogás.

La caracterización de la estructura de la comunidad microbiana y la comprensión de su comportamiento es esencial para mejorar el rendimiento de los procesos de digestión. Sin embargo, la diversidad de microorganismos involucrados y sus respuestas a los cambios en las prácticas de manejo y las condiciones ambientales se pasan por alto debido a la compleja ecología microbiana. En este sentido, el uso de técnicas avanzadas de biología molecular es de importancia para comprender y aclarar las reacciones que tienen lugar en los digestores anaerobios y se han desarrollado algunas para apoyar la investigación de la ecología microbiana en estudios sobre el comportamiento y la actividad de los microorganismos en digestores de aguas residuales industriales y sustratos solubles (Lin, 2012).

Aunque el proceso anaerobio depende de microorganismos con diferentes capacidades metabólicas, la influencia de la estructura de la comunidad microbiana en la función del digestor y en su estabilidad ha sido poco investigada. En los últimos años, los estudios se han centrado principalmente en la dinámica de la comunidad utilizando enfoques moleculares relacionados con parámetros químicos (Ventorino *et al.*, 2018).

3.6 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Algunas de las comunidades microbianas de la digestión anaerobia pueden contener variedades interdependientes de microbios, muchas de las cuales no pueden cultivarse en condiciones estándar de laboratorio. Dentro de estas, muchas funciones se llevan a cabo mediante esfuerzos cooperativos. La complejidad de esta actividad se considera una de las razones principales de la falta de conocimientos básicos sobre los sistemas de digestión. De hecho, debido a la ocurrencia de vías bioquímicas cooperativas, estudiar un taxón en cultivo puro revela una visión incompleta de la bioquímica que se produce entre los socios en el entorno de la comunidad, y como la mayoría de los microorganismos involucrados no se pueden cultivar *in vitro* la comunidad sólo se puede caracterizar con precisión debido al desarrollo de técnicas moleculares independientes del cultivo. La información sobre la composición de la comunidad microbiana proporciona información para el desarrollo y la optimización de los sistemas de digestión anaerobia (Appels *et al.*, 2011).

La identificación de microorganismos consiste en determinar cuáles de los grupos taxonómicos que están presentes en un sistema mediante pruebas preseleccionadas y apropiadas para el problema que se está estudiando (Sandle, 2016).

Una identificación efectiva requiere de métodos reconocidos para determinar las características fenotípicas y genotípicas de un grupo taxonómico determinado. El análisis de los datos obtenidos también puede ayudar a identificar organismos estrechamente relacionados, que pueden usarse para proporcionar información complementaria del microorganismo bajo evaluación (Bernatchez *et al.*, 2018).

Métodos fenotípicos

Son los más difundidos debido a sus costos. Sin embargo, debe reconocerse que las expresiones del fenotipo microbiano (tamaño, forma de las células, esporulación, composición celular, antigenicidad, actividad bioquímica y sensibilidad a los agentes antimicrobianos) dependen con frecuencia de los medios y las condiciones de crecimiento que se han utilizado. Con frecuencia incorporan reacciones a productos químicos o marcadores bioquímicos. Estos utilizan determinaciones subjetivas y permiten identificar especies a nivel de género y en algunos casos de especie basados en un número pequeño de observaciones y pruebas. La dependencia de las reacciones bioquímicas y los patrones de utilización del carbono introduce desventajas en el logro de una identificación consistente (repetible y reproducible). Aunque estas pruebas son precisas para las bacterias más comunes, pueden fallar en algunas circunstancias (Lau, 2015; Sandle, 2016).

Secuenciación de genes

Las técnicas genotípicas estudian el genoma microbiano y no dependen del medio de aislamiento ni de las características de crecimiento. En bacterias, hay tres genes que conforman la funcionalidad del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), estos son: 5S, 16S y 23S ARNr. De estos, el gen 16S ARNr se usa más comúnmente para identificar la especie. Los métodos genotípicos utilizan dos alternativas: hibridación o secuenciación (más comúnmente del gen que codifica el ARNr 16S). En la hibridación se utiliza la homología de ADN-ADN (o qué tan bien se unen o hibridan dos hebras de ADN de diferentes bacterias) para determinar la relación de dos microorganismos. En la secuenciación, la razón de los métodos que examinan la región 16S ARNr del genoma es porque se encuentra presente en casi todas las bacterias, a menudo como una familia multigénica u operones; además, está altamente conservado, lo que quiere decir que su función a lo largo del tiempo no ha cambiado y también es lo suficientemente grande para fines informáticos (alrededor de 1500 bases) (Sandle, 2016). La secuenciación del gen 16S rRNA es fundamental para la identificación precisa y rápida de bacterias con fines de investigación y diagnóstico. Se aplica más comúnmente para aislamientos bacterianos de identidades inciertas, desde muestras ambientales, veterinarias hasta clínicas. Sin embargo, su utilidad se destaca por la capacidad de identificar bacterias con perfiles fenotípicos inusuales y bacterias raras o de crecimiento lento (Lau, 2015).

Métodos basados en proteómica

El número creciente de genomas secuenciados de microorganismos ha permitido la identificación de biomarcadores que pueden aplicarse como medidas indirectas de la variación de la secuencia

del genoma, así como en el desarrollo de técnicas para la caracterización microbiana. Los enfoques basados en proteínas son ejemplo de medidas indirectas de los datos de la secuencia del genoma y representan alternativas interesantes a estos métodos (Karlsson *et al.*, 2015).

La proteómica es la caracterización del proteoma, incluyendo expresión, estructura, funciones, interacciones y modificaciones de las proteínas en cualquier etapa (Aslam *et al.*, 2017). Es posible gracias a la integración coordinada de la secuenciación del genoma, separación de proteínas (bioquímica de proteínas en general), espectrometría de masas y bioinformática (Brewis, 2010).

El proteoma es el total de proteínas correspondientes expresadas por el genoma, que refleja la presencia y actividad de todas las proteínas en una célula, tejido y organismo (Zhang *et al.*, 2019 b). La elucidación de un proteoma puede variar, dependiendo del estado de la célula, el organismo o el sistema biológico y en respuesta a los cambios en el entorno y la exposición a tipos y grados de estrés. Como las secuencias de genes varían entre los diferentes microorganismos, también lo hacen las secuencias de aminoácidos de sus proteínas correspondientes. Por lo tanto, los análisis de las proteínas de un microorganismo pueden verse como análisis indirectos de las partes codificantes de su genoma. Hipotéticamente, siempre que las diferencias en las moléculas blanco/receptoras sean detectables, se puede utilizar proteómica para analizar las características microbianas, con aplicaciones para la caracterización, clasificación e identificación microbiana. Los avances en técnicas como la Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI) y la Ionización por Electro-Spray (ESI), abren posibilidades en el uso de espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos. (Karlsson *et al.*, 2015).

Espectrometría de masa de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas se ha convertido en un método bien conocido para la identificación bacteriana (Karlsson *et al.*, 2015; Sloan *et al.*, 2017). MALDI-TOF es una técnica para la identificación rápida de microorganismos a bajo costo que implica la ionización de proteínas en una bacteria utilizando un rayo láser y midiendo el tiempo requerido para que cada una de las proteínas ionizadas se mueva en un campo eléctrico utilizando espectrometría de masas. El perfil resultante de la relación masa-carga de las proteínas ionizadas es específico de la especie bacteriana, por lo que es útil para su identificación (Lau, 2015).

El uso de MALDI-TOF en la identificación de microorganismos se ha convertido en un procedimiento de rutina en laboratorios clínicos para reducir los tiempos de entrega, costos y el trabajo en general (Sloan *et al.*, 2017). Sin embargo, su principal limitación es el contenido de la base de datos. Con una base de datos completa podría ser un método eficiente, fácil y económico para la identificación de microorganismos (Lau, 2015).

4 METODOLOGÍA

Las actividades que se llevaron a cabo para el desarrollo del presente trabajo se resumen en tres etapas principales las cuales se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Etapas de la metodología

ETAPA 1	I. Obtención de muestras de FORSU, lodos de purga de aguas residuales e inóculo
OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS	II. Caracterización de muestras de FORSU y lodos de purga de aguas residuales e inóculo
ETAPA 2	III. Pruebas de laboratorio en equipo AMPTS sobre el proceso de mono-digestión y co-digestión anaerobia de FORSU y lodos de purga de aguas residuales
TRABAJO EXPERIMENTAL Y MODELACIÓN	IV. Pruebas proteómicas para determinación de microorganismos presentes en el proceso de co-digestión anaerobia de FORSU y lodos de purga de aguas residuales V. Modelación de la producción de biogás a partir del proceso de co-digestión de FORSU y lodos de purga de aguas residuales en ADM1 con el software AQUASIM 2.0
ETAPA 3	VI. Evaluación de los resultados obtenidos en las pruebas de co-digestión anaerobia
EVALUACIÓN DE RESULTADOS Y CALIBRACIÓN DEL MODELO	VII. Calibración del modelo de producción de biogás a partir del proceso de co-digestión de FORSU y lodos de purga de aguas residuales en ADM1

4.1 TOMA DE MUESTRAS DE FORSU, LODO DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO

Las muestras de FORSU fueron obtenidas de la planta piloto de digestión anaerobia de la UNAM ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México de acuerdo a las especificaciones que se establecen en la norma mexicana NMX-AA-015-1985. Las muestras constaron de 3 kg. Los materiales inertes gruesos indeseables como plásticos, metales, rocas y otros fueron removidos manualmente. Posteriormente se procedió a su conservación en congelación a una temperatura de -20°C hasta su uso (Holliger *et al.*, 2016).

La muestra de lodos de purga fue obtenida de la planta de tratamiento de agua residual ubicada en la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM. Esta fue tomada directamente de la tubería a través del grifo de purga, con el equipo y materiales generales especificados en la NOM-004-SEMARNAT-2002. La muestra de 10 L sin aire fue preservada en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta el momento de realizar las pruebas (Holliger *et al.*, 2016).

El inóculo debe tomarse de un digestor anaerobio activo que digiera materia orgánica compleja y se encuentre en estado estable en el momento del muestreo para proporcionar una comunidad microbiana altamente diversa capaz de digerir una gran variedad de moléculas orgánicas (Angelidaki *et al.*, 2009; Holliger *et al.*, 2016); por lo que se consideró para su obtención el lodo

granular de un reactor UASB del sistema de tratamiento de aguas residuales de la cervecera Grupo Modelo ubicada en Ciudad de México. La muestra de 20 L fue conservada en refrigeración a 4°C hasta su uso.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE FORSU, LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO

Para la caracterización de la FORSU la descongelación de las muestras se realizó a 4 °C seguido de del aumento de la temperatura a las condiciones ambientales antes de su uso. El tamaño de partícula fue menor a 0.5 cm para lo cual la muestra fue homogeneizada con ayuda de un extrusor manual y posteriormente con una licuadora hasta obtener una pasta uniforme. Durante el proceso, se tuvo cuidado de no calentar las muestras y provocar la pérdida de compuestos orgánicos volátiles. En el caso de los lodos de purga de aguas residuales debido a su consistencia se utilizaron en las condiciones en las que fueron obtenidas las muestras; se evitó la congelación-descongelación ya que puede alterar significativamente el Potencial Bioquímico de Metano (PBM). El inóculo no se diluyó ni lavó para evitar la pérdida de factores de crecimiento solubles como macro y micronutrientes, oligoelementos y vitaminas, así como las enzimas extracelulares necesarias para un buen rendimiento de la digestión (Holliger *et al.*, 2016).

Los parámetros a caracterizar fueron: Humedad, Sólidos totales (ST), Sólidos volátiles (SVT), Sólidos fijos (SFT), Demanda química de oxígeno (DQO), Nitrógeno total (NT), Nitrógeno amoniacal (N-NH₄), Fósforo total (PT), pH, Alcalinidad total, Índice alfa (α), Ácidos grasos volátiles (AGV), Proteínas y Carbohidratos, de acuerdo a los métodos analíticos referidos en la sección 4.1 con base en los trabajos de Derbal *et al.* (2009), Alibardi y Cossu (2015), Campuzano y González (2016) y Peña y Durán (2018).

4.3 CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES

Con la finalidad de obtener información a nivel laboratorio sobre el proceso de producción de biogás en condiciones mesofílicas de la mono-digestión y co-digestión anaerobia de FORSU y lodos de purga de agua residual, se llevaron a cabo pruebas para evaluar la relación óptima para el proceso y así estimar el incremento o disminución de la productividad a partir de cada sustrato de forma individual en un reactor discontinuo, de acuerdo al protocolo propuesto por Angelidaki *et al.* (2009) y por Holliger *et al.* (2016).

Las evaluaciones de la digestión y co-digestión anaerobia se hicieron en el Sistema Automático de Prueba de Potencial de Metano (AMPTS II por sus siglas en inglés) de Bioprocess Control (Suecia), que consiste en un baño a temperatura constante para 15 matraces de 500 mL, con los motores de agitación correspondientes y un componente de medición de biogás acoplado a una computadora para el monitoreo continuo de la producción de biogás.

Las pruebas fueron realizadas por duplicado, a pH 7. Los reactores fueron previamente inertizados con N₂ por aproximadamente 1 minuto para alcanzar las condiciones anaerobias (Matheri *et al.*, 2017). Los recipientes de prueba se incubaron en un entorno de temperatura controlada (35°C para microorganismos mesófilos) con variaciones máximas de ± 2 °C. (Holliger *et al.*, 2016).

Además de la muestra se contó con un blanco que fue preparado utilizando sólo el inóculo como fuente de carbono para evaluar la producción de biogás generado por la biomasa (Alibardi y Cossu, 2015). Se llevó a cabo también una prueba control con la adición de una solución de glucosa para obtener información sobre la respuesta del inóculo hacia un sustrato estándar y compararla con su valor nominal conocido (Angelidaki *et al.*, 2009; Holliger *et al.*, 2016).

Con respecto a la relación inóculo sustrato (I/S), se recomienda que la porción de SV del inóculo sea mayor que la del sustrato para minimizar los problemas de acidificación o inhibición. Por lo tanto, las relaciones inóculo sustrato basadas en SV deben estar entre dos y cuatro para la mayoría de las aplicaciones. Para sustratos fácilmente degradables, donde la rápida acumulación de intermediarios de fermentación, como los AGV, podría conducir a la inhibición de la digestión anaerobia, se debe aplicar una relación I/S mayor o igual a cuatro (Holliger *et al.*, 2016). En este trabajo se utilizó la relación 2/1.

Si bien existen varios reportes sobre la co-digestión FORSU y lodos no se ha establecido un valor recomendado sobre la proporción de la mezcla, por lo tanto, se debe experimentar con un amplio intervalo de proporciones utilizando porcentajes en peso para obtener las mezclas deseadas (Nielfa *et al.*, 2015). En las Tablas 4.2 - 4.4 se muestran las diferentes relaciones de sustrato para digestión anaerobia y co-digestión, así como la descripción de la preparación de los recipientes de prueba y controles que se han considerado para este trabajo.

Tabla 4.2. Relaciones FORSU/Lodo de purga para digestión anaerobia y co-digestión

Prueba	Proceso	Relación FORSU/Lodos de purga (% peso)
1	F	100/0
2	L	0/100
3	F-L 1	80/20
4	F-L 2	60/40
5	F-L 3	40/60
6	F-L 4	20/80
7	Blanco (control negativo)	0/0
8	Control positivo	0/0

F: FORSU; L: Lodo de purga

Tabla 4.3. Preparación de los recipientes de prueba

Prueba	FORSU (g)	Lodos de purga (g)	Inóculo (g)	Agua destilada (mL)
1	6.024	0.000	107	206
2	4.819	30.030	107	177
3	3.614	60.060	107	148
4	2.410	90.090	107	119
5	1.205	120.120	107	90
6	0.000	150.150	107	62

Tabla 4.4. Preparación de los controles

Control	Solución de Glucosa (mL)	Inóculo (g)	Agua destilada (mL)
7	---	107	212
8	36	107	176

Para evitar deficiencias de nutrientes, se pueden agregar oligoelementos y vitaminas de acuerdo a las soluciones de la Tabla 4.5 propuestas por Angelidaki *et al.* (2009).

Tabla 4.5. Descripción del medio básico anaerobio

SOLUCIÓN	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L en agua destilada)
A	NH ₄ Cl	100
	NaCl	10
	MgCl ₂ 6H ₂ O	10
	CaCl ₂ 2H ₂ O	5
B	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	200

A todos los recipientes se les adicionaron 40 mL del medio de nutrientes descrito y el volumen útil considerado para las pruebas fue de 360 mL. La preparación se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Angelidaki *et al.* (2009), y la duración fue hasta alcanzar la estabilidad en la producción de metano, lo cual se refiere a no detectar variaciones diarias superiores al 1% de un dato a otro durante tres días consecutivos (Holliger *et al.*, 2016).

4.4 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES

La determinación de los microorganismos presentes en los reactores al inicio y al término de los procesos de digestión y co-digestión anaerobia se llevó a cabo a través de técnicas proteómicas en las instalaciones y con apoyo del personal del Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, con la finalidad de analizar los proteomas de los organismos procarióticos y eucarióticos.

Estas técnicas representan alternativas a los métodos establecidos para la caracterización microbiana y se pueden aplicar para su clasificación e identificación (Karlsson *et al.*, 2015). Con base en el trabajo de Zhang *et al.* (2019 b) las actividades realizadas son las siguientes:

- Obtención de la muestra para análisis
- Purificación de proteínas por fenol básico
- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 1D)

- Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para determinar los espectros de los iones de los péptidos de las proteínas de los microorganismos presentes en la muestra
- Comparación de los resultados obtenidos con una base de datos especializada en proteínas para la identificación de los grupos taxonómicos correspondientes (UniProt).

UniProt es una colección de bases de datos que permite navegar por la gran cantidad de secuencias e información funcional disponible para proteínas. La base de conocimiento UniProt (UniProtKB por sus siglas en inglés) es el recurso central que combina UniProtKB/Swiss-Prot (con más de 550 000 secuencias creadas por un equipo experto en biocuración) y UniProtKB/TrEMBL (con 60 millones de secuencias derivadas en gran medida de la secuenciación de ADN de alto rendimiento) (The UniProt Consortium, 2017).

Las pruebas analizadas y la etapa en que se realizó la toma de muestra se presentan la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Selección de pruebas para análisis proteómicos y etapa de muestreo

Prueba	Proceso	Inicio del proceso	Final del proceso
1	F	•	•
2	L	•	•
3	F-L 1		•
4	F-L 2		•
5	F-L 3		•
6	F-L 4		•
7	Blanco (control negativo)	•	•

4.5 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CO-DIGESTIÓN ANAEROBIA

Con los resultados obtenidos de los procesos a través del uso del equipo AMPTS se procedió al análisis de la información para la evaluación de los gráficos comparativos generados en este. A partir de esta información fue posible identificar la relación de sustratos más adecuada, que presenta la mayor producción de biogás durante el proceso de co-digestión anaerobia (Nielfa *et al.*, 2015).

4.6 MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE LA CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES

La modelación del proceso de co-digestión se realizó a través del software AQUASIM 2.0 (Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology. EAWAG), que es un programa informático para la identificación y simulación de sistemas acuáticos. En este, se puede llevar a cabo la implementación de ADM1 para la modelación del sistema de digestión anaerobia. Para su aplicación, el suministro de los parámetros, nomenclatura, unidades y estructura debe ser consistente con los del modelo (Dewil *et al.*, 2011).

Es necesario para el uso del software contar con la información referente a las etapas del proceso de co-digestión anaerobia la cual fue obtenida a partir de investigación bibliográfica, así como de los resultados de las etapas previas de este trabajo. Entre los datos necesarios se encuentran, la caracterización de los sustratos, productos y grupos bacterianos, bioquímicas de la conversión del sustrato y la cinética del crecimiento y descomposición microbiana.

4.7 CALIBRACIÓN DEL MODELO DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN ADM1

La calibración se llevó a cabo mediante la comparación de las mediciones experimentales de producción de biogás con resultados iniciales del modelo y se realizó el ajuste de los parámetros previamente identificados en la literatura hasta que los resultados del modelo ajustaron de manera cercana con las observaciones experimentales (Espósito *et al.*, 2011 a).

Además, fue necesario realizar la caracterización detallada de los sustratos de acuerdo con las fracciones de sus componentes obtenidas experimentalmente, la determinación de la concentración de DQO del influente correspondiente al sustrato a degradar y la determinación de las fracciones en porcentaje de DQO correspondientes a la materia biodegradable (carbohidratos lípidos y proteínas) e inerte (material particulado soluble e inerte) del sustrato a degradar.

Para la aplicación del modelo se utilizó un archivo generado en AQUASIM 2.0, diseñado para la aplicación de ADM1 en el proceso de digestión anaerobia, en este las variables, procesos, compartimentos y enlaces correspondientes contaron con los datos propuestos para el modelo original aplicado a un reactor batch.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la caracterización de la FORSU y lodos de purga de planta de tratamiento de agua residual, previo al proceso de co-digestión anaerobia y al finalizar éste, los métodos analíticos utilizados se presentan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Métodos analíticos

DETERMINACIÓN	PRINCIPIO	MÉTODO
Humedad	Gravimetría, obtenida por diferencia entre la masa inicial y los sólidos totales	APHA, 2540-B
Sólidos Totales	Gravimetría, sólidos secados a una temperatura de 103 a 105°C	APHA, 2540-B
Sólidos volátiles y fijos	Gravimetría, sólidos previamente secados a 105°C e incinerados a 550°C	APHA, 2540-E
Demanda química de oxígeno	Fotometría, digestión ácida a 150°C en reflujo cerrado durante 2 horas, lectura a 600 nm	APHA, 5220-D
Nitrógeno total	Titulación, digestión ácida con catalizador de selenio, posterior neutralización, destilación y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N	APHA, 4500-NH3 C, 4500-NH3 E
Nitrógeno amoniacal	Destilación y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02 N	APHA, 4500-NH3 C, 4500-NH3 E

Fósforo total	Digestión ácida, ácido sulfúrico y ácido nítrico. Método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico a 470 nm	APHA, 4500-P B 4, APHA, 4500-P C
pH	Medición con potenciómetro	-----
Alcalinidad parcial (AP) e intermedia (AI)	Titulación con ácido sulfúrico 0.1 N de pH de la muestra hasta pH de 5.75 para AP y de 5.75 a 4.3 para AI	Pérez y Torres, 2008
Índice alfa	Relación de alcalinidades	Pérez y Torres, 2008
Ácidos grasos volátiles	Titulación en retroceso de pH 4 a 7 con NaOH 0.1 N de la muestra acidificada a pH 3.3 centrifugada y el sobrenadante puesto en ebullición	DiLallo y Albertson, 1961
Carbohidratos	Espectrofotometría a 480 nm. Reacción colorimétrica en presencia de fenol y H ₂ SO ₄	Dubois <i>et al.</i> , 1956

4.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS

La información obtenida, en la etapa experimental fue sometida a un análisis estadístico a través del método ANOVA de un factor a través del software Minitab, para determinar si las medias de las producciones de CH₄ a partir de las mezclas de co-digestión presentan diferencias significativas con respecto a las producciones de CH₄ de los sustratos por individual, así como con los resultados obtenidos por medio del modelo ADM1 en AQUASIM 2.0.

5 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las etapas que se han mencionado en la metodología se presentan a continuación, así como su interpretación de acuerdo con la información generada en la fase experimental y la literatura referente al tema de investigación.

5.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE FORSU, LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO

En el apartado 4.1 de la metodología se indican los sitios de recolección de FORSU, lodo de purga e inóculo, condiciones de preparación y almacenamiento, así como las normas operativas de referencia para su obtención. En las Figuras 5.1-5.3 se muestran los sustratos e inóculo utilizados.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS DE FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES E INÓCULO

La caracterización de los sustratos e inóculo se realizó como se indica en el apartado 4.2 de la metodología de acuerdo con los métodos analíticos referidos en la Tabla 4.7. Los resultados obtenidos de la caracterización de los sustratos e inóculo se muestran en la Tabla 5.1.



Figura 5.1. FORSU de la planta piloto de digestión anaerobia de la UNAM (Cuautitlán Izcalli, Estado de México)



Figura 5.2. Lodo de purga de agua residual (planta de tratamiento Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM)



Figura 5.3. Lodo granular del reactor UASB (Grupo Modelo, CDMX)

Tabla 5.1 Caracterización de sustratos e inóculo

Parámetro	Símbolo	Unidades	FORSU	Lodo de purga	Inóculo (Lodo Anaerobio Granular)
Humedad	---	%	79.28 ± 0.26	99.11 ± 0.06	93.23 ± 1.75
Sólidos totales	ST	g/kg	207.21 ± 2.58	8.94 ± 0.58	67.74 ± 17.48
Sólidos volátiles	SV	g/kg	188.35 ± 2.57	6.67 ± 0.48	18.62 ± 1.87
Sólidos fijos	SF	g/kg	18.86 ± 0.01	2.26 ± 0.10	49.12 ± 16.26
Relación SV/ST	SV/ST	%	90.90 ± 0.11	74.67 ± 0.54	29.24 ± 9.09
Demanda Química de Oxígeno	DQO	g/kg	305 ± 0.33	213 ± 2.52	120 ± 1.04
Fósforo total	PT	g/kg	0.11 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.20 ± 0.11
pH	---	---	5.18 ± 0.01	8.58 ± 0.06	7.96 ± 0.06
Alcalinidad total	---	gCaCO ₃ /kg	3.10 ± 0.14	3.90 ± 0.71	3.60 ± 3.25
Índice alfa	α	---	0.34 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.01
Ácidos grasos volátiles	AGV	mg CH ₃ COOH/kg	2.19 ± 0.10	0.24 ± 0.05	0.37 ± 0.05
Nitrógeno total	NT	g/kg	1.06 ± 0.08	0.24 ± 0.01	0.65 ± 0.03
Nitrógeno amoniacal	N-NH ₄	g/kg	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02
Proteínas	---	g/kg	6.60 ± 0.48	1.53 ± 0.05	4.06 ± 0.00
Carbohidratos	---	g/kg	3.90 ± 0.80	0.24 ± 0.24	0.18 ± 0.16

Los valores resultantes de la caracterización de la FORSU son consistentes con los reportados en estudios previos con respecto al mismo sustrato obtenido a partir de una muestra de residuos orgánicos de la Ciudad de México para los parámetros de humedad, ST, SV, SF, DQO (Campuzano,

2015), humedad, pH, AGV, NT y N_{-NH_4} (Peña y Durán, 2018), también para el caso de una muestra de FORSU reportada por Prabhu y Mutnuri (2016) en la que pH, la relación SV/ST, DQO, NT y humedad presentan valores muy similares, así como para muestras de FORSU de diversos países reportadas por Campuzano y González-Martínez (2016) en el caso de los ST, SV, la relación SV/ST y PT. El valor obtenido para proteínas es similar al reportado por Seswoya *et al.* (2019) de 6.35 g/kg.

Con respecto al lodo de purga los resultados de ST, SV y pH son comparables con los reportados por Liu, *et al.* (2019), N_{-NH_4} con Dai, *et al.* (2013) y Silvestre, *et al.* (2015) y proteínas con Peng, *et al.* (2019); la relación SV/ST se encuentra dentro del intervalo reportado por Grosser, *et al.* (2017) de 71-78 %. El valor obtenido de DQO (213 g/kg) es cercano al reportado por Prabhu y Mutnuri (2016) de 188 g/kg. Por otra parte, con relación al PT (0.31 g/kg) y NT (0.24 g/kg) los valores obtenidos son similares a los reportados por Da Ros *et al.* (2014) de 0.22 g/kg y 0.40 g/kg respectivamente.

En el lodo granular el valor correspondiente a la humedad y ST es similar a los reportados por Yong, *et al.* (2015). SV y PT son consistentes con lo reportado por Lee, *et al.* (2019), así como NT y pH que también coinciden con los reportados por (Peña y Durán, 2018).

Los resultados de la caracterización de sustratos son la base para el desarrollo de las etapas subsecuentes del proyecto, especialmente para las pruebas de PBM, así como en la etapa de modelación para la estimación de las fracciones de material biodegradable.

5.3 PRUEBAS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO A FORSU Y LODOS DE PURGA DE AGUAS RESIDUALES POR INDIVIDUAL Y EN CO-DIGESTIÓN

Las evaluaciones sobre la producción de metano a partir de la digestión y co-digestión anaerobia de los sustratos objeto de este trabajo, se realizaron en el Sistema de PBM AMPTS II. Las pruebas se hicieron por duplicado, a pH 7, y temperatura controlada (35 ± 2 °C).

Las diferentes relaciones de sustrato para digestión anaerobia y co-digestión, así como la descripción de la preparación de los recipientes de prueba y controles (positivo y negativo) que se utilizaron se muestran en las Tablas 4.2-4.4.

La duración de las pruebas se consideró hasta alcanzar la estabilidad en la producción de metano de acuerdo con Holliger *et al.* (2016), lo cual ocurrió hasta el día 19 después de iniciado el proceso. Los resultados de la prueba de PBM se muestran en la Figura 5.4.

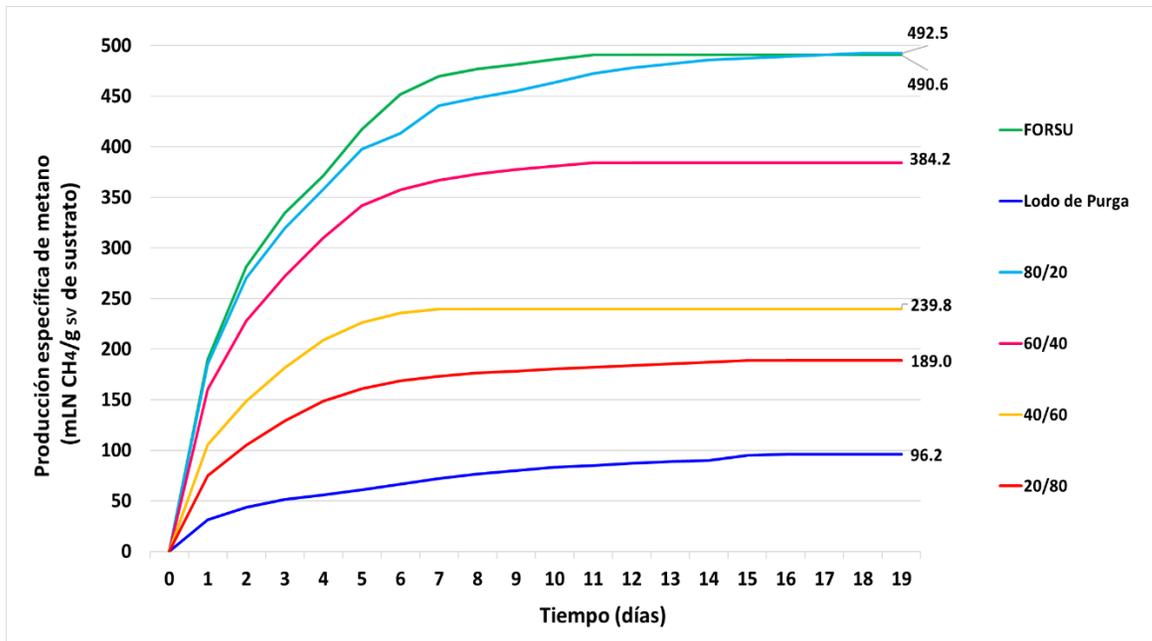


Figura 5.4. Potencial Bioquímico de Metano del proceso de co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga

Las pruebas tuvieron una duración distinta entre sí. El tiempo de duración de la prueba fue de 19 días debido a que la mezcla de co-digestión 80/20 continuó mostrando producción de metano mayor al 1% hasta ese punto del ensayo. Es necesario indicar que a los resultados obtenidos se les restó el valor de la producción de metano alcanzada por el control negativo (8.8 mLN CH₄/gSV), la cual se asume como la correspondiente al inóculo añadido para iniciar el proceso de digestión anaerobia por lo que no correspondería al total de la producción esperada por los sustratos. Aunado a lo anterior, se realizó el cálculo teórico de producción de biogás para estimar si las producciones experimentales se encontraban dentro de los parámetros esperados al día en que finalizó cada prueba y de este modo asegurar que los resultados se encontraran dentro del intervalo esperado. En la Tabla 5.2 se muestran los valores obtenidos en el PBM, así como los valores teóricos estimados de producción de biogás, excepto el del control positivo que fue obtenido del trabajo de Raposo *et al.* (2012) en el que realiza una integración de datos sobre el rendimiento de metano de diferentes sustratos orgánicos sólidos en reactores batch. Las estimaciones de biogás se realizaron tomando como base el procedimiento descrito en el trabajo de López-Hernández *et al.* (2017) en el que se describe la forma de cuantificar el porcentaje de eliminación de material volátil en digestores anaerobios mesofílicos, así como de la energía que se espera obtener a partir de este proceso aplicado en el caso de lodos, el cual fue adaptado para hacer el cálculo de los sustratos utilizados en este trabajo.

Tabla 5.2 Producción experimental y teórica de metano del proceso de co-digestión anaerobia

PRUEBA	PRODUCCIÓN PBM (mLN CH ₄ /g SV)	PRODUCCIÓN TEÓRICA (mLN CH ₄ /g SV)	% TEÓRICO ALCANZADO
Control positivo (Glucosa)	315.1	351.0*	89.8
FORSU	481.8	510.8	94.3
Lodo de Purga	87.4	450.8	19.4
80/20	483.7	498.9	96.95
60/40	375.4	487.0	77.1
40/60	231.0	483.4	47.8
20/80	180.2	474.2	38.0
Control negativo	8.8	45.6	19.3

* Valor reportado por Raposo *et al.* (2012)

De acuerdo con los valores mostrados se puede apreciar que los resultados del PBM se encuentran dentro de los valores teóricos calculados para estos sustratos, así como para los controles positivo y negativo. En algunos de los casos la producción experimental es muy cercana al valor teórico (FORSU, co-digestión 80/20, y control positivo), sin embargo, es notoria la baja producción de metano en el lodo de purga por individual, así como la reducción de la producción a medida que el contenido de lodo de purga aumenta en cada una de las mezclas de co-digestión.

Con base en la información obtenida se calcularon los posibles efectos sinérgicos que podrían producirse durante el proceso de biodegradación en las mezclas de co-digestión y con ello evaluar la influencia de cada sustrato, para lo cual se utilizó el método propuesto por Nielfa, *et al.* (2015) en el que se aplica la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{\text{Producción experimental}}{\text{Producción teórica}}$$

El resultado de α indica (Nielfa *et al.*, 2015):

- $\alpha > 1$; La mezcla tiene un efecto sinérgico en la producción final
- $\alpha = 1$; Los sustratos funcionan independientemente de la mezcla
- $\alpha < 1$; La mezcla tiene un efecto competitivo en la producción final

Los cálculos resultantes muestran que de las mezclas de co-digestión probadas en ninguna se presenta un efecto sinérgico; en la mezcla de co-digestión 80/20 se observa independencia de la FORSU con respecto al lodo de purga y en las mezclas de co-digestión restantes es notorio un efecto competitivo entre los sustratos probados con valores de 0.8, 0.5 y 0.4 para las mezclas 60/40, 40/60 y 20/80 respectivamente.

Zhang *et al.* (2019 a). Indica que la relación de FORSU y lodo es crucial para el establecimiento de una coordinación sinérgica entre las diversas poblaciones microbianas, así como entre los

microorganismos y sus respectivos sustratos. Sin embargo, debido a que las proporciones de carbohidratos, proteínas y lípidos en la FORSU pueden variar y a que el origen del lodo puede afectar la producción de CH₄, se obtienen diferencias en los resultados por lo cual las comparaciones directas entre trabajos previos no se pueden llevar a cabo.

Con relación a los resultados obtenidos en las pruebas de PBM, se han reportado resultados similares por otros autores como es el caso de Gu, *et al.* (2020), cuyo trabajo indica que no se presentaron efectos sinérgicos positivos en las mezclas de co-digestión probadas y únicamente se presentó un efecto aditivo entre los sustratos, mostrando un aumento en la producción de CH₄ a medida que aumentaba la fracción de FORSU en el reactor, lo que indica un mayor grado de degradación que el lodo para producir CH₄. De este modo, la prueba con 100% FORSU fue casi completamente degradada a CH₄ y fue mayor que la prueba con 100% lodo. Por su parte Dai, *et al.* (2013) no observaron ningún mecanismo sinérgico obvio en la co-digestión de lodos de tratamiento de agua residual y residuos orgánicos de alimentos, por el contrario, notaron que con el aumento de la fracción de alimentación de residuos orgánicos a los reactores se presentaba una mayor reducción de SV y producción de metano, posiblemente por la mayor proporción de sustrato fácilmente degradable para los microorganismos. Su producción de CH₄ a partir del lodo fue relativamente más bajo que otros informes y la producción a partir de residuos orgánicos fue comparable con otros estudios. Koch *et al.* (2015) indicaron que, sus pruebas en batch no pueden proporcionar información sobre efectos sinérgicos negativos o positivos en la producción de CH₄, pero sus resultados muestran que los residuos orgánicos como sustrato individual tuvieron una producción específica más alta, las pruebas para lodo se encontraron en el nivel más bajo de producción y las mezclas de co-digestión se encuentran entre estos resultados. Liu, *et al.* (2016 a), compararon la co-digestión de residuos orgánicos con lodos con baja y alta concentración de sólidos, encontrando un efecto sinérgico en el proceso de lodos con alto contenido de sólidos y demostrando que no hubo efecto sinérgico durante el proceso de lodos con bajo contenido de sólidos. En el último caso, cuando se agregaron los residuos orgánicos de alimentos al lodo, la producción de biogás aumentó proporcionalmente con la adición de estos.

Como se puede apreciar en las referencias mostradas, la FORSU es un sustrato altamente degradable para la digestión anaerobia, mientras que el lodo de aguas residuales es refractario a la hidrólisis y muestra una menor biodegradabilidad (Dai *et al.*, 2013).

De acuerdo con Koch *et al.* (2015) y Liu *et al.* (2016 a), la diferencia en la producción de gas probablemente se deba al alto grado de material fácilmente degradable contenido en los sustratos. Esto puede deberse a que la FORSU es típicamente rica en carbohidratos, proteínas y lípidos fácilmente biodegradables, mientras que los lodos de tratamiento de agua residual se componen principalmente de proteínas y contienen compuestos más complejos como las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) producidas por el metabolismo microbiano, las células y la materia orgánica que no se degradan en condiciones aerobias y permanecen en la matriz de lodo. (Mottet *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2020). Las proteínas del lodo pueden considerarse como un compuesto pobremente biodegradable debido a que necesitan la ruptura de la estructura del flóculo y de las membranas celulares a fin de que estén disponibles para la biomasa anaerobia lo que reduce su degradación (Mottet *et al.*, 2010).

Las SPE son principalmente secreciones de alto peso molecular de los microorganismos y los productos de la lisis celular y la hidrólisis de macromoléculas, así como materia orgánica de las

aguas residuales que también puede adsorberse en esta matriz. Los carbohidratos y las proteínas suelen ser los componentes principales y las sustancias húmicas también pueden ser un componente clave. Además, se han encontrado lípidos, ácidos nucleicos, ácidos urónicos y algunos componentes inorgánicos. Las fracciones de los componentes dependen de los métodos de extracción, los orígenes del lodo, el cultivo, la fase de crecimiento, parámetros del proceso, el tipo de biorreactor y el método de extracción (Sheng *et al.*, 2010). En general, las SPE representan el 50-90% del carbono orgánico total en los lodos orgánicos y se hidrolizan para ser utilizadas por algunos microorganismos como fuentes de carbono y energía para sus actividades metabólicas. Sin embargo, ciertas partes de las SPE no pueden ser degradadas en su totalidad (Sheng *et al.*, 2010, Wei *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

En la Figura 5.5 se muestra la producción diaria de metano de cada uno de los sustratos por individual, así como de las co-digestiones. En esta se puede apreciar una producción intensa durante los primeros tres días. Este pico de producción es considerablemente menor para el lodo de purga y menos pronunciado para las mezclas de co-digestión con respecto a la FORSU. Después de este pico, la producción de CH₄ en la FORSU disminuyó bruscamente y posteriormente se produjo un pico más amplio durante los días 6 y 8, pero más pequeño que el primero el cual excedió la producción de todas las mezclas de co-digestión, así como al lodo en el que este comportamiento no se aprecia sino hasta el día 8, aunque en una proporción menor. Estos resultados coinciden con los reportados por Koch *et al.* (2015) y Gu *et al.* (2020).

De acuerdo con Koch *et al.* (2015), la generación de los picos en la producción de CH₄, se debe, a las diferentes composiciones entre FORSU y lodo de purga ya que este se caracteriza por presentar una cantidad baja de compuestos degradables, mientras que la FORSU posee un alto grado de material fácilmente degradable. Por lo tanto, se espera que se produzca biogás a partir de los compuestos orgánicos solubles inmediatamente después del inicio de la prueba. Durante la hidrólisis y acidogénesis, se puede producir la acumulación de intermedios metabólicos, como los AGV debido a la tasa de crecimiento más alta de los microorganismos acidogénicos en comparación con las arqueas metanogénicas que consumen estos ácidos, lo que probablemente resulta en una disminución en la producción de gas hasta que se recupera la actividad de estos microorganismos. El segundo pico más amplio se produce debido a la degradación de los ácidos acumulados y la producción y consumo simultáneos de AGV hasta que quedan principalmente materiales poco degradables.

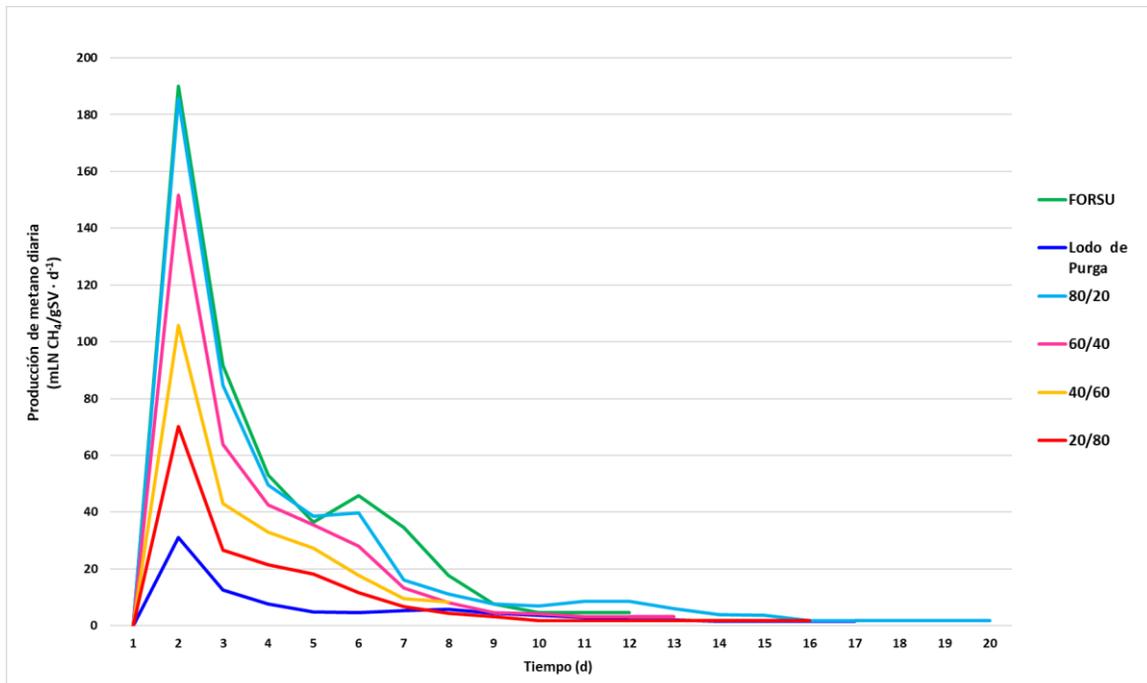


Figura 5.5. Producción de metano diaria a partir del proceso de co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga

Con los resultados obtenidos se puede notar que los desempeños dinámicos del proceso de co-digestión son determinados por las relaciones de mezcla de ambos sustratos, teniendo en cuenta que la estabilidad del sistema se ve influenciada significativamente por los elementos inhibitorios existentes o el desequilibrio de nutrientes (Dai *et al.*, 2013).

A partir de los resultados de las pruebas de PBM se realizaron pruebas de ANOVA de un factor a través del software Minitab para determinar si las medias de las producciones de CH_4 a partir de las mezclas de co-digestión presentan diferencias significativas con respecto a las producciones de CH_4 de los sustratos por individual. Los resultados de las pruebas de ANOVA indican que, con respecto a la producción de CH_4 que es la variable de estudio considerada, en el caso de la FORSU y el lodo de purga comparados ambos sustratos por individual existe una diferencia significativa entre estos; para la FORSU comparada con las mezclas de co-digestión, las pruebas indican que no existe diferencia entre el sustrato por individual y la co-digestión 80/20, sin embargo, las demás mezclas de co-digestión (60/40, 40/60 y 20/80) todas presentan una diferencia significativa; en la comparación del lodo de purga todas las mezclas de co-digestión difieren con respecto al sustrato por individual.

El análisis de estos resultados respalda lo observado previamente al indicar que la co-digestión 80/20 es la única que presenta una producción de CH_4 comparable con el sustrato que tuvo la mayor producción por individual (FORSU), y que los demás resultados obtenidos en este proceso no reflejan un efecto sinérgico entre las mezclas seleccionadas para el proceso de co-digestión. En el ANEXO 1 se presenta el procedimiento para la realización de las pruebas de ANOVA.

5.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE LA DE CO-DIGESTIÓN DE FORSU Y LODO DE PURGA DE AGUA RESIDUAL

Con la finalidad de conocer los microorganismos que participan en el proceso experimental de mono y co-digestión de FORSU y lodo de purga y tratar de establecer una relación con los datos obtenidos a partir de la bibliografía sobre las comunidades microbianas consideradas por el modelo ADM1 se llevó a cabo la identificación a través de técnicas proteómicas, de acuerdo al procedimiento descrito en el ANEXO 2.

Como parte del proceso, mediante la comparación de las proteínas extraídas previamente a partir de cada uno de los sustratos, del inóculo, así como de las mezclas de co-digestión anaerobia se obtuvo información con la base de datos UniProt.

Para la comparación con la base de datos es necesario partir de la búsqueda bibliográfica para la selección de opciones de microorganismos reportados como presentes en las muestras a analizar lo que permite hacer una búsqueda especializada y reducir el periodo para la obtención de los resultados. De acuerdo con lo anterior se consideraron para la búsqueda en los sustratos e inóculo las siguientes especies: en el caso de la FORSU, *Clostridium aceticum*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus mesentericus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Methanosarcina barkeri* y *Syntrophomonas wolfei* (Liaquat *et al.*, 2017; Di Maria, 2017) ; para el lodo de purga, *Acidobacterium capsulatum*, *Arcobacter sulfidicus*, *Dechloromonas agitata*, *Flavobacteriaceae bacterium*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Rhodoferax fermentans*, *Sterolibacterium denitrificans*, *Zoogloea ramigera* (Gonzalez *et al.*, 2016; De Leon, 2018; Karlikanovaite-Balikci *et al.*, 2019); y para el lodo granular anaerobio utilizado como inóculo, *Acetobacterium woodii*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanobacterium beijingense*, *Methanobacterium formicum*, *Methanoregula boonei*, *Methanoregula formicica*, *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta harundinacea*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanotherix soehngenii*, *Methanotherix thermoacetophila*, *Syntrophobacter wolinii* (Supaphol *et al.*, 2011; Kim y Whitman, 2014; Di Maria, 2017; Ventorino *et al.*, 2018).

Una vez realizada la búsqueda con las opciones seleccionadas, se llevó a cabo una búsqueda general que incluyó a todas las especies consideradas para cada sustrato, así como para el inóculo, y con ello tener una mayor amplitud para cada uno de estos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.3.

En total se identificaron 16 especies de microorganismos diferentes presentes en los sustratos. El inóculo utilizado para este trabajo, comparado con los sustratos, presenta una mayor diversidad de especies entre las que se encuentran bacterias y arqueas metanogénicas mutuamente beneficiosas las cuales forman una estructura eficiente y estable. Con respecto a estos resultados, se consideró necesario ampliar la búsqueda de información bibliográfica a nivel de especie ya que en la mayor parte de la información que se analizó para la primera etapa de la determinación de los microorganismos presentes en los sustratos, los datos reflejan clasificaciones realizadas hasta el nivel de género o en algunos casos hasta niveles taxonómicos superiores.

De acuerdo con lo anterior para el análisis al final del proceso se realizó una búsqueda más amplia de las especies presentes en las mezclas de co-digestión probadas experimentalmente, tomando como base el origen de los sustratos, los microorganismos previamente identificados y las posibles asociaciones con otros reportados en la literatura para tener un panorama más amplio de los microorganismos que se encontraban participando en estas pruebas.

Tabla 5.3. Microorganismos identificados en los sustratos e inóculo previo al proceso de co-digestión anaerobia

FORSU	LODO DE PURGA	LODO ANAEROBIO GRANULAR (INÓCULO)
---	---	<i>Acidobacterium capsulatum</i>
---	---	<i>Bacillus pumilus</i>
---	<i>Chloroflexi*</i>	---
---	---	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	---	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Escherichia coli</i>	---	---
---	---	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
---	---	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>
---	---	<i>Methanobacterium formicicum</i>
---	---	<i>Methanoregula boonei</i>
---	---	<i>Methanoregula formicica</i>
---	---	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
<i>Methanosarcina barkeri</i>	---	---
---	---	<i>Methanospirillum hungatei</i>
---	<i>Methanothrix soehngeni**</i>	<i>Methanothrix soehngeni**</i>
---	---	<i>Methanothrix thermoacetophila**</i>
---	<i>Planctomycetes*</i>	---

* Organismos pertenecientes al Phylum indicado sin identificación precisa de la especie en la base de datos

** Organismos recientemente reclasificados taxonómicamente

Las especies que se consideraron para la búsqueda, sumadas a las que se encontraron en el primer análisis (Tabla 5.3) son las siguientes: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes* (Liaquat et al., 2017), *Clostridium pasteurianum* (Moscoviz et al., 2017), *Desulfobacca acetoxidans* (Göker et al., 2011), *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio simplex* (Sousa et al., 2017), *Desulfotomaculum acetoxidans* (Spring et al., 2009), *Geobacter metallireducens* (Zhang et al., 2018), *Geobacillus thermoglucosidasius* (Brumm et al., 2015), *Leptothrix discophora* (Corstjens y Muyzer, 1993), *Methanobrevibacter arboriphilus* (Poehlein et al., 2017), *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter thaueri*, *Methanobrevibacter smithii* (Muñoz-Tamayo et al., 2019), *Methanoculleus bourgensis* (Maus et al., 2016), *Methanolinea tarda*, *Methanosphaerula palustris* (Yashiro et al., 2011), *Methanomethylophilus alvus*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanomassiliicoccus luminyensis* (Borrel et al., 2012), *Methanosarcina acetivorans* (Horne y Lessner 2013), *Methanosarcina flavescens*, *Methanosarcina vacuolata* (Fischer et al., 2019), *Microthrix parvicella*, *Nostocoida limicola*, *Sphaerotilus natans*, *Zoogloea ramigera* (Gray 2005), *Pelotomaculum propionicum*, *Pelotomaculum schinkii* (Imachi et al., 2007), *Propionispora hippei*, *Propionispora vibrioides* (Abou-Zeid et al., 2004), *Rhodococcus opacus* (Chatterjee et al., 2020), *Syntrophomonas curvata* (Zhang 2004), *Syntrophomonas wolfei* (Sieber et al., 2010). Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Microorganismos identificados al final de los procesos de mono-digestión y co-digestión anaerobia

Digestión FORSU	Digestión Lodo de Purga	Co-digestión 80/20	Co-digestión 60/40	Co-digestión 40/60	Co-digestión 20/80
---	---	---	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	---
---	---	<i>Bacillus coagulans</i>	---	---	---
---	---	---	<i>Clostridium perfringens</i>	---	---
---	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	---	---	---
---	---	---	---	<i>Methanobacterium formicicum</i>	---
---	<i>Methanoregula boonei</i>	---	<i>Methanoregula boonei</i>	<i>Methanoregula boonei</i>	---
<i>Methanoregula formicica</i>	<i>Methanoregula formicica</i>	<i>Methanoregula formicica</i>	---	---	---
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	---	---	---	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
<i>Methanosarcina barkeri</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>	---	---	<i>Methanosarcina barkeri</i>	---
<i>Methanosarcina flavescens</i>	---	---	---	---	---
<i>Methanosphaerula palustris</i>	<i>Methanosphaerula palustris</i>	<i>Methanosphaerula palustris</i>	<i>Methanosphaerula palustris</i>	<i>Methanosphaerula palustris</i>	---
<i>Methanotherix soehngenii**</i>	<i>Methanotherix soehngenii**</i>	<i>Methanotherix soehngenii**</i>	<i>Methanotherix soehngenii**</i>	<i>Methanotherix soehngenii**</i>	<i>Methanotherix soehngenii**</i>
<i>Methanotherix thermoacetophila**</i>	---	---	---	---	---
<i>Zoogloea ramigera</i>	<i>Zoogloea ramigera</i>	---	---	---	---

** Organismos recientemente reclasificados taxonómicamente

Se identificaron en total 14 especies de microorganismos presentes al final de las pruebas realizadas, en su mayoría arqueas metanogénicas, con mayor presencia en las digestiones de los sustratos por individual, así como en la co-digestión 40/60, y con una menor proporción en las co-digestiones restantes, especialmente en la 20/80 en la que sólo se identificaron 2 especies.

Entre los microorganismos identificados, se encuentran especies de diferentes géneros con características específicas y actividades metabólicas diversas de acuerdo a su origen, que van desde organismos indicadores de contaminación fecal presentes en los residuos sólidos urbanos y aguas residuales, hasta organismos con actividades particulares en el proceso de digestión anaerobia.

En general, los microorganismos del proceso de digestión anaerobia de estos sistemas se pueden agrupar de acuerdo con la etapa del proceso en la que participan: hidrolíticos, acidógenos, acetógenos sintróficos y metanógenos. En relación con lo anterior, entre los microorganismos identificados en este trabajo se encuentran algunos de los géneros que se describen a continuación en relación con cada una de las etapas.

En la hidrólisis participan enzimas extracelulares del grupo de las hidrolasas (amilasas, proteasas, lipasas) producidas por cepas de bacterias hidrolizantes. Durante la digestión de residuos sólidos, solo el 50% de los compuestos orgánicos sufren biodegradación. La parte restante de los compuestos permanece en su estado primario debido a la falta de enzimas que participan en su degradación. La velocidad de este proceso depende de parámetros como: tamaño de partícula, pH, producción de enzimas, difusión y adsorción de enzimas en las partículas de residuos sometidos al

proceso de digestión y es realizada principalmente por bacterias de los géneros: *Enterobacterium* y *Streptococcus* (Ziemiński y Frąc, 2012).

Los organismos de esta etapa identificados en este trabajo corresponden al género *Acidobacterium*. La ubicuidad y abundancia en suelos del género *Acidobacterium*, así como su capacidad para resistir ambientes contaminados y extremos sugieren que cumplen funciones variadas importantes en el medio ambiente. Potencialmente tienen la capacidad de usar una amplia variedad de fuentes de carbono que incluye sustratos complejos, y depende de transportadores de azúcar de baja especificidad y alta afinidad. Estos rasgos genómicos son consistentes con una amplia capacidad metabólica y la capacidad de frenar el crecimiento en entornos con nutrientes limitados (caracterizado por el uso de sustratos a bajas concentraciones, enzimas catalíticas con altas afinidades de sustrato y tasas de renovación celular lenta), de este modo las células individuales pueden permanecer metabólicamente activas o sobrevivir en el suelo durante largos períodos (Ward *et al.*, 2009).

Durante la acidogénesis las bacterias de la fase ácida (anaerobios facultativos) propician condiciones favorables para el desarrollo de anaerobios obligados de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* o *Flavobacterium* (Zieminski y Frac, 2012). Entre estos, las especies de *Clostridium* son consideradas como los degradadores comunes (Liaquat *et al.*, 2017). Como parte de los microorganismos identificados en este trabajo se encuentran algunas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

Varias cepas de *Bacillus* con fuertes actividades proteolíticas han mostrado supervivencia robusta en reactores anaerobios alimentados con proteínas en los que han mejorado la productividad del biogás (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2017; Ziganshina *et al.*, 2018).

Los miembros del género *Clostridium* son responsables del consumo de aminoácidos y producción de acetato, amoníaco y butirato (Liaquat *et al.*, 2017). Metabolizan carbohidratos, alcoholes, aminoácidos, purinas, esteroides u otros compuestos orgánicos y algunas especies fijan nitrógeno atmosférico. Para la mayoría, el crecimiento es más rápido a pH 6.5 – 7 y a temperaturas entre 30 y 37 °C (Lawson y Rainey, 2016). *C. perfringens* es una bacteria anaerobia formadora de esporas que se encuentra comúnmente en el suelo, aguas residuales y el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Es un organismo comensal que tiene un repertorio biosintético limitado y depende de la absorción de nutrientes del medio ambiente para sus fuentes de carbono, nitrógeno y energía. En consecuencia, produce proteínas que pueden insertarse en las membranas de las células eucariotas y formar poros que liberan contenido celular y enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteasas, nucleasas e hidrolasas que pueden descomponer macromoléculas complejas en compuestos que se consumen fácilmente y metabolizan o incorporan en macromoléculas dentro de la célula bacteriana. Muchas de estas proteínas son toxinas y juegan un papel importante en enfermedades (Adams *et al.*, 2018).

Es importante mencionar que, en la digestión anaerobia de residuos de lodos activados, a diferencia de los sustratos simples, en la etapa de hidrólisis y acidificación, estos residuos contienen macromoléculas orgánicas de alta resistencia como proteínas y polisacáridos cuya descomposición es lenta y, por lo tanto, se obtiene como resultado una baja tasa de fermentación (Ai *et al.*, 2018).

Como resultado del metabolismo de los acetógenos sintróficos se libera hidrógeno, que exhibe efectos tóxicos sobre los microorganismos que llevan a cabo este proceso. Por lo tanto, es necesaria

una simbiosis con organismos autótrofos de metano que usan hidrógeno. Como ejemplo de los acetógenos sintróficos se encuentran los géneros: *Syntrophobacter* y *Syntrophomonas*. En lo que respecta a la degradación del acetato para producir metano a través de la vía acetoclástica, son responsables los metanógenos específicos del orden *Methanosarcinales* (Ziemiński y Frąç, 2012; Manyi-Loh *et al.*, 2013).

Aunque los organismos de género *Geobacter* no están incluidos en los géneros sintróficos mencionados en la etapa acetogénica, tiene relevancia el proceso de metanogénesis sintrófica no convencional a través de la transferencia directa de electrones entre especies (DIET por sus siglas en inglés de “direct interspecies electron transfer”) en la que los electrones fluyen de las bacterias exoelectrogénicas a los metanógenos electrotróficos a través de componentes celulares como el citocromo C en el que se involucran miembros de la familia *Geobacteraceae* (Zhang *et al.*, 2018). Las especies de *Geobacter* son bacterias Gram-negativas dentro de la clase *Deltaproteobacteria*. *Geobacter* alberga bacterias mesófilicas disimilatorias reductoras de hierro capaces de oxidar completamente el acetato y otros sustratos orgánicos de carbono múltiple a dióxido de carbono. Tienen un metabolismo principalmente fermentativo y pueden crecer en asociación sintrófica con metanógenos. Son a menudo los miembros dominantes de sedimentos subterráneos en condiciones de reducción de metales (Shelobolina *et al.*, 2008). Su característica fisiológica distintiva es la capacidad para acoplar la oxidación de compuestos orgánicos a la reducción de Fe (III), lo que les permite llenar nichos clave en la cadena alimentaria microbiana anaerobia de ambientes como sedimentos acuáticos, humedales, arrozales y ambientes subsuperficiales en los que la reducción de Fe (III) es un proceso terminal de aceptación de electrones. *G. sulfurreducens* puede crecer a bajas concentraciones de oxígeno y usar diversos aceptores de electrones para apoyar el crecimiento anaerobio. Los aceptores de electrones solubles que pueden reducirse intracelularmente incluyen nitrato, fumarato y compuestos clorados (Lovley *et al.*, 2011).

Los géneros de las arqueas metanogénicas identificadas en este trabajo corresponden a *Methanobacterium*, *Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* y *Methanosphaerula*.

El género *Methanobacterium* contiene algunos de los primeros metanógenos hidrogenotróficos conocidos y se han descrito 24 especies. Los miembros de éste género han sido aislados de ambientes mesófilicos, neutros y de agua dulce como los que se encuentran en los digestores anaerobios (Mori y Harayama, 2011), así como de diversas fuentes marinas y terrestres. Todas las especies son capaces de crecer mediante la reducción de CO₂ con H₂, pero presentan un amplio intervalo y variación en las características fenotípicas y genómicas, incluido el catabolismo de sustratos. (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2014). *M. formicicum* es una especie representativa de arqueas metanogénicas encontradas en el intestino de rumiantes y humanos. Puede utilizar CO₂ con H₂ y subproductos fermentados de las bacterias del rumen, para la producción de CH₄. Puede fermentar acetato, carbohidratos, aminoácidos, etanol, metanol, propionato, butirato y lactato. Contiene todos los genes necesarios para el proceso metanogénico, con excepción de la [Fe]-hidrogenasa deshidrogenasa. Tanto la producción de CH₄ como el consumo de formiato son funciones lineales de su tasa de crecimiento (Chellapandi *et al.*, 2018). También ha sido detectada ampliamente en reactores anaerobios, así como en células de electrólisis microbiana utilizadas para la producción de CH₄ (Zhang, *et al.*, 2019 c).

El género *Methanoregula* se clasifica en la familia *Methanoregulaceae* del orden *Methanomicrobiales*. Son metanógenos anaerobios estrictos que utilizan H₂/CO₂. El género consta

de dos especies, *M. boonei*, un acidófilo moderado aislado de una turbera y *M. formicica*, un neutrófilo que utiliza formiato aislado de un biorreactor anaerobio. Estudios de las secuencias del gen 16S rRNA en sedimentos acuáticos y biorreactores han encontrado numerosas secuencias de relación intermedia que indican que hay otras especies de *Methanoregula* aún por cultivar (Zinder y Bräuer, 2016). *M. boonei* demuestra evidencia fisiológica de adaptación a ambientes pobres en nutrientes de baja fuerza iónica. Es un hidrogenotrófico obligado (no puede utilizar formiato, acetato, metanol, etanol, isopropanol, butanol o trimetilamina). Las condiciones óptimas de crecimiento están cerca de 35-37 °C y pH 5.1, con crecimiento en valores de pH tan bajos como 3.8 (Bräuer *et al.*, 2015; Zinder y Bräuer, 2016). *M. formicica* es una especie mesófila metanógena consumidora de H₂/CO₂ y formiato para su crecimiento y producción de CH₄. Fue aislada del lodo granular metanogénico en un reactor UASB en Japón (Yamamoto *et al.*, 2014). El aislamiento se realizó en un cultivo de enriquecimiento degradador de propionato anaerobio que se obtuvo originalmente del lodo granular en un reactor utilizado para tratar un efluente de una cervecería (Yashiro *et al.*, 2011; Zinder y Bräuer, 2016).

Las especies del género *Methanosaeta* pertenecen al orden *Methanosarcinales*, están ampliamente distribuidos en ambientes naturales y sus células filamentosas contribuyen significativamente a la granulación de lodo y al buen desempeño de los reactores anaerobios (Zhou *et al.*, 2015). Estos se pueden distinguir de otros géneros por su uso exclusivo de acetato como sustrato para producir CH₄. *M. harundinacea* se aisló de un reactor anaerobio UASB para el tratamiento de aguas residuales de fabricación de cerveza en Beijing, China. Las células se encuentran solas o en pares. Utiliza acetato exclusivamente para el crecimiento y la producción de CH₄ (Ma *et al.*, 2006). Muestra una transición morfológica regulada de filamentos cortos a largos, canalizando más acetato hacia la producción de CH₄ en filamentos largos, mientras que en filamentos cortos se canaliza más hacia la síntesis de biomasa (Zhou *et al.*, 2015).

Los miembros del género *Methanosarcina* llevan a cabo su metabolismo energético mediante la formación de CH₄ a partir de acetato, metanol, monometilamina, dimetilamina, trimetilamina, H₂/CO₂ y CO (Boone y Mah, 2015). Son de importancia ecológica porque son más versátiles metabólicamente que otras arqueas metanogénicas. Se pueden encontrar en entornos anaerobios diferentes, como sedimentos marinos y de agua dulce, suelos y tractos digestivos de animales de sangre caliente (Kern *et al.*, 2016). *M. barkeri* es una especie anaerobia estricta, aislada de lodo de agua dulce y marina, rumen de animales ungulados, lagunas de residuos animales y lodos de digestores anaerobios de PTAR (Boone y Mah, 2015). Puede usar H₂/CO₂; metanol monometilamina, dimetilamina y trimetilamina; acetato o CO como sustratos. El crecimiento y la formación de CH₄ son más rápidos en medio con H₂/CO₂ o metanol que con acetato. El grupo metilo de metanol o acetato se reduce a CH₄ sin oxidación intermedia a CO₂. No fermenta los carbohidratos, aminoácidos, formiato, etanol, propionato y butirato. Puede usar el amoníaco o N₂ como fuente de nitrógeno, y el sulfuro como fuente de azufre (Boone y Mah, 2015 y Lovley, 2018). *M. flavescens* es un metanógeno estrictamente anaerobio aislado de una muestra de lodo de biogás obtenida de una planta de biogás comercial a gran escala en Alemania. Se desarrolla autotróficamente con H₂/CO₂, y adicionalmente podría utilizar acetato, metanol, mono, di y trimetilamina como fuentes de carbono y energía; sin embargo, no presentan crecimiento o metanogénesis en el formiato (Kern *et al.*, 2016).

El género *Methanosphaerula* es miembro de la familia *Methanoregulaceae* en el orden *Methanomicrobiales*. Consiste en una sola especie, *M. palustris* que es un metanógeno

hidrogenotrófico, aislado de un pantano minerotrófico de pH neutro (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2015). Producen CH₄ a partir de H₂/CO₂ o formiato, pero no a partir de etanol, metanol, 2-propanol, 2-butanol, acetato, propionato o butirato (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2009).

El género *Methanospirillum* comprende metanógenos hidrogenotróficos que usan H₂/CO₂ como sustrato primario para producir CH₄. Algunas especies también usan formiato o alcoholes secundarios más CO₂. Las especies del género están ampliamente distribuidas en ambientes anóxicos, como digestores anaerobios, barro y suelos de humedales (Zhou y Dong, 2019). *M. hungatei* fue aislada de lodo de aguas residuales. El crecimiento y metabolismo son estrictamente anaerobios, donde el H₂/CO₂ y/o el formiato sirven como sustrato metanogénico. Requieren acetato como principal suministro de carbono celular (Gunsalus *et al.*, 2016; Zhou y Dong, 2019). No tiene otros requisitos nutricionales orgánicos, aunque la adición de ácidos casamino u otros productos de hidrólisis de plantas o animales aceleran su crecimiento. La degradación de los ácidos grasos y aromáticos es termodinámicamente favorable sólo cuando los metanógenos hidrogenotróficos mantienen niveles muy bajos de hidrógeno y/o formiato en sintrofia. Los miembros del género *Methanospirillum* a menudo se detectan en ecosistemas donde la sintrofia es esencial y *M. hungatei* es el socio modelo en cocultivos con *Syntrophobacter wolinii* degradador de propionato, *Syntrophomonas wolfei* degradador de butirato, *Syntrophus buswellii* y *Syntrophus aciditrophicus* degradadores de benzoato (Gunsalus *et al.*, 2016)

Los organismos de la especie *Methanosaeta concilii* han sido aislados de digestores anaerobios mesófilos de residuos domésticos, lodo granular, reactores anaerobios de lecho fijo, otros tipos de sistemas anaerobios y de enriquecimientos de acetato inoculados con cultivos de digestores de residuos anaerobios. El acetato es el único sustrato que soporta el crecimiento y la metanogénesis; el formiato, acetato y CO₂ pueden servir como fuentes de carbono para el crecimiento. En presencia de acetato, las cepas mesofílicas pueden dividir el formiato en H₂ y CO₂, pero esto no se convierte en metano. Utilizan el amonio como única fuente de nitrógeno (Patel, 2015). *M. concilii* es dominante en la mayoría de los sistemas de digestión cuando el estrés es bajo o ausente, pero son vulnerables a la inhibición química. Por lo tanto, se considera un microorganismo clave para lograr un funcionamiento estable de los procesos de digestión anaerobia de alto rendimiento, es decir, alta producción de CH₄ y reducción orgánica (Lee y Hwang, 2019). *M. thermophila* utiliza acetato como único sustrato para el crecimiento y la producción de CH₄; H₂/CO₂, formiato, metanol, metilaminas y metanol no son compatibles con el crecimiento o la producción de CH₄. Durante la activación de los biorreactores anaerobios, las especies de *Methanosaeta* están muy extendidas debido a la alta concentración de acetato. Sin embargo, a medida que los biorreactores se estabilizan y alcanzan su máximo rendimiento, la concentración de acetato disminuye, al igual que la población de *Methanosaeta* (Patel, 2015).

Los metanótrofos son un grupo diverso de microorganismos que pueden utilizar CH₄ como única fuente de carbono y energía. La actividad metanotrófica puede verse influenciada por diversos factores ambientales, como la temperatura, el contenido de agua, las concentraciones de oxígeno (O₂) y CH₄, el contenido de nitrógeno. El amonio (NH₄⁺) y el nitrato (NO₃⁻) no solo son las fuentes de nitrógeno para el crecimiento metanotrófico, sino que también pueden inhibir la oxidación de CH₄ de los metanotróficos en altas concentraciones. Los efectos del nitrógeno sobre la oxidación de CH₄ como factor inhibidor o estimulante dependen de la diversidad, estructura y actividad de la comunidad metanotrófica, así como del tipo y la cantidad de compuestos de nitrógeno aplicados, el tiempo de exposición y la concentración de CH₄ (He *et al.*, 2017). Acumulan fuertemente

inclusiones de poli- β -hidroxibutirato. Son obligadamente metanotróficos, utilizando solo CH_4 y metanol como únicas fuentes de carbono y energía. Fijan formaldehído para el carbono celular a través de la vía de la serina y nitrógeno atmosférico por medio de una nitrogenasa sensible al oxígeno (Bowman, 2015). *Methylosinus sporium* es un metanótrofo obligado, que oxida el metano a metanol utilizando la enzima metano monooxigenasa (Ali *et al.*, 2006).

De acuerdo con el tipo de análisis realizado para la identificación, es importante mencionar el hecho de que la cantidad de microorganismos encontrados en comparación con el total que se pretendía identificar (seleccionado a partir de la búsqueda bibliográfica) sea menor, no implica que éstos no se encuentran presentes en la muestra ya que es posible que las cantidades de proteína extraídas a partir de las poblaciones presentes sea insuficiente para ser detectada por el equipo, motivo por el cual no se reportan. Sin embargo, las especies identificadas, de acuerdo con la cantidad de proteínas que se detectaron en las muestras presentan una confiabilidad que se encuentra en una escala dividida en tres niveles con los siguientes valores: $\leq 85\%$, $\sim 85\%$ y $\geq 96\%$, por lo que existe la certeza de que los microorganismos reportados se encuentren en las muestras.

Es importante hacer notar que, el proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo por un grupo diverso de microorganismos (Manyi-Loh *et al.*, 2013). Al respecto, en el caso de las diferencias observadas sobre las especies identificadas en cada uno de los sustratos e inóculo por individual, así como en cada una de las pruebas de co-digestión realizadas es probable que, de acuerdo con Mata-Alvarez *et al.*, (2014) estas puedan atender a factores como la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso (siendo esta una de las principales influencias en los consorcios bacterianos en el proceso de digestión anaerobia), así como la composición de la materia a degradar. En este sentido, la diversificación del sustrato (co-digestión) y el equilibrio de nutrientes puede conducir a una comunidad microbiana más versátil que puede soportar diferentes condiciones operativas o perturbaciones.

Walter *et al.* (2019) mencionan que la introducción de co-sustratos tiende a aumentar la diversidad microbiana, sin embargo, también reportan casos de plantas de co-digestión a gran escala, en las que algunos reactores mostraron una menor diversidad bacteriana en comparación con los que contenían lodo de una PTAR como único sustrato y en relación con lo anterior sugieren que la diversidad de microorganismos no es un indicador crítico para una comunidad microbiana anaerobia funcionalmente exitosa.

En el caso de los reactores utilizados en las pruebas de PBM se observaron resultados que coinciden con lo descrito anteriormente, ya que es posible notar variaciones entre la diversidad de especies que se presentan en cada caso, mostrando un mayor número en los sustratos por individual con 8 y 7 especies para FORSU y lodo de purga respectivamente, en el caso de las pruebas de co-digestión en la 80/20 y 60/40 se identificaron 5 especies, en la 40/60 7 y en la 20/80 2. Con estos resultados se puede deducir también que las variaciones en el número de especies, así como en el tipo de organismos presentes en cada proceso evaluado pueden deberse a la composición del sustrato presente en cada una. En la mayoría de las pruebas se observa predominancia de organismos metanogénicos, así como organismos con actividad hidrolítica principalmente, haciéndose presentes las mismas especies o grupos muy similares de estas en las pruebas.

Li *et al.* (2015) mencionan que como los residuos biológicos son un sustrato complejo, existe la necesidad de un espectro más amplio de bacterias fermentadoras. Además, se tiene conocimiento que muchos grupos bacterianos son capaces de degradar una amplia gama de macromoléculas y

pueden reaccionar rápidamente a los cambios del sustrato. Estos generalistas pueden realizar funciones similares a las de organismos taxonómicamente distintos y esta redundancia funcional asegura que incluso con condiciones ambientales cambiantes, el ecosistema seguirá siendo activo, porque sus nichos funcionales están ocupados (porque las especies funcionalmente similares, pero taxonómicamente distintas pueden reemplazarse fácilmente entre sí para mantener el rendimiento del proceso ante las perturbaciones ambientales). Por lo tanto, independientemente de la competencia por los recursos y el espacio entre especies, el funcionamiento del ecosistema no depende directamente de la estructura general de la comunidad en términos de diversidad (Walter *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2019 d).

De acuerdo con Liu *et al.* (2016 c), una gran diversidad de microorganismos en los lodos de PTAR domésticas puede atribuirse a la complejidad del lodo de alimentación que contiene un amplio espectro de sustancias. Sin embargo, en el caso de este trabajo no se presentó tal situación, lo que podría sugerir el efecto contrario para el lodo utilizado. Con respecto a la comunidad de arqueas Liu *et al.* (2016 c) indican que esta se compone por grupos menos filogenéticamente diversos probablemente porque solo existen grupos metanogénicos limitados filogenéticamente en el mundo y estas siempre representan solo una pequeña proporción de la microflora en los digestores anaerobios. Lo anterior es consistente con las arqueas metanogénicas identificadas en este trabajo ya que en las pruebas analizadas la presencia de algunos géneros (*Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* y *Methanosphaerula*) es consistente en la mayoría de estas.

Entre los metanógenos acetoclásticos *Methanosarcina* y *Methanosaeta* se han estudiado ampliamente y se sabe que difícilmente pueden dominar simultáneamente en un digestor específico en general. *Methanosaeta* es un especialista que usa solo acetato, pero tiene tasas de crecimiento más lentas que *Methanosarcina* (Liu *et al.*, 2016 c). Por lo tanto, *Methanosaeta* siempre sobrevive en los sistemas con menor concentración de ácido acético amoníaco y AGV, mientras que *Methanosarcina* domina más comúnmente los sistemas con AGV o amoníaco moderadas o más altos probablemente debido a su morfología (Mata-Alvarez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016 c).

Los miembros del orden *Methanosarcinales* (*Methanosarcina* y *Methanosaeta*) producen más biogás en condiciones de menor concentración de propionato, mientras que los del orden *Methanomicrobiales* (*Methanoesphaerula*), lo hacen cuando existe una mayor concentración de propionato. Lo que puede significar que la mayor parte del CH₄ derivado de la degradación del propionato se genera por la comunidad hidrogenotrófica de *Methanomicrobiales* (Li *et al.*, 2015).

La descripción anterior sobre el aprovechamiento de los sustratos por parte de las arqueas metanogénicas nos presenta un panorama general de lo ocurrido en las pruebas llevadas a cabo, lo que dio lugar a la presencia específica de cada uno de estos microorganismos o a su mayor abundancia en cada caso en particular. Esto deja claro que los cambios en la composición del sustrato a degradar pueden modificar el medio y, por lo tanto, conducir a cambios en la composición de la comunidad metanogénica especialmente ya que esta es más susceptible a las variaciones en las condiciones ambientales y operativas (Manyi-Loh *et al.*, 2013; Mata-Alvarez *et al.*, 2014). Sin embargo, se necesita más conocimiento sobre cómo la población microbiana se ve afectada por la adición de un co-sustrato, en términos de cinética, estabilidad y rendimiento (Mata-Alvarez *et al.*, 2014).

Es importante mencionar también que las especies de microorganismos que se obtienen de diversos ambientes asociados con diferentes factores físicos y químicos tienden a variar a pesar de

que pueden realizar el proceso de digestión anaerobia a través de las mismas etapas, y esto puede influir en el rendimiento del biogás obtenido con diferentes sustratos. Por lo tanto, un cultivo microbiano mixto mejora la tasa de producción de biogás en comparación con una sola cepa bacteriana debido a las diversas capacidades metabólicas, y como las interacciones de los grupos de microorganismos son complicadas, el desempeño del proceso biológico depende del equilibrio de estas relaciones (Manyi-Loh *et al.*, 2013; Liaquat *et al.*, 2017).

Al respecto, Feng *et al.*, (2019) reconocen ampliamente que un micro ecosistema es vital para mantener el proceso de digestión anaerobia estable y eficiente, y que los parámetros químicos que cambian constantemente influyen en el metabolismo microbiano. Por lo tanto, las diferentes capacidades de adaptación al ambiente de cada microorganismo contribuyen a la estructura y función únicas de la comunidad.

Los resultados de identificación de microorganismos de este trabajo no permiten establecer una relación directa con los valores referentes a las poblaciones de microorganismos consumidores de los sustratos de las etapas de la digestión anaerobia que se utilizan para la modelación del proceso en ADM1 reportados en la literatura, esto se debe a que a partir del análisis que se realizó no se puede obtener el total de las especies presentes en los sustratos e inóculo utilizados para este trabajo. Sin embargo, a partir de ésta técnica, de manera general se pueden identificar claramente grupos con actividades particulares, predominando los organismos metanogénicos con la mayor cantidad de especies identificadas tanto al inicio del proceso como al final, encontrándose 11 de un total de 24 (incluida en este *G. sulfurreducens*); también los organismos participantes activos de los procesos de hidrólisis y acidogénesis con 5 especies. Destacan, además, los característicos del tratamiento de las aguas residuales que se identificaron en las muestras de lodo de purga y lodo anaerobio con 5 especies. En menor número se presentaron los microorganismos considerados como patógenos presentes en la FORSU al inicio del proceso con un total de 2 especies, las cuales ya no se encontraron al final del proceso de digestión anaerobia como sucedió con algunos de los organismos de los tratamientos de aguas residuales. Además de las mencionadas se encontró también un microorganismo metanótrofo.

Una alternativa a para una identificación de microorganismos de mayor alcance podría considerar la aplicación de pruebas genéticas (por ejemplo, secuenciación del gen 16S de ARNr) que permitan obtener la información necesaria y detallada para definir las unidades taxonómicas operativas con las que se puedan realizar los cálculos de los índices de riqueza y abundancia relativa de las especies presentes en las muestras analizadas y a partir de esto relacionar los datos recopilados sobre la comunidad microbiana con los reportados en la literatura.

Con la intención de asignar valores representativos acerca de la realidad del inóculo utilizado y con apoyo de la información reportada en la literatura y la utilizada por el modelo original ADM1 se realizó el cálculo de las concentraciones de los siete grupos microbianos considerados por el modelo de acuerdo con las proporciones en porcentaje calculadas a partir de este, tomando como base el valor de DQO del lodo granular obtenido experimentalmente. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 5.8.

Con respecto a las diferencias observadas de los microorganismos presentes entre los reactores en lote en los que se llevaron a cabo las pruebas de mono y co-digestión, es importante mencionar que existen diferentes factores que afectan el ambiente en el que los microorganismos se desarrollan dentro de estos, así como a la comunidad microbiana y, por lo tanto, la producción de

biogás. Dai *et al.* (2013) consideran que la concentración de nitrógeno amoniacal libre superior a 600 mg/L puede afectar significativamente la actividad de las arqueas metanogénicas, y conducir a acumulaciones de AGV (superiores a 3000 mg/L) afectando la producción de metano. También indican que, en procesos de digestión anaerobia de residuos de alimentos con alto contenido de sólidos, la concentración elevada de Na⁺ (proveniente de NaCl) se considera un factor importante en la estabilidad del sistema que puede afectar la actividad microbiana interfiriendo con sus procesos metabólicos. Sin embargo, al observar un mayor número de especies de organismos metanogénicos en los resultados de identificación, estos factores no parecen ser los que intervienen en este trabajo.

Otro factor a considerar es la diferencia en la composición de los sustratos como lo sugiere Koch *et al.*, (2015), ya que la FORSU se caracteriza por un alto grado de material fácilmente degradable cuya digestibilidad aumenta la producción de biogás debido a la mayor disponibilidad de alimento disponible, mientras que los lodos se caracterizan por contener compuestos degradables bastante moderados. Al respecto Dai *et al.*, (2013) menciona que estas diferencias en la alimentación de sustratos también pueden incluir la existencia de otras sustancias químicas en los sustratos que potencien efectos de inhibición y afecten el proceso.

Sin embargo, a pesar de que los reactores en lote se consideran una prueba simple, efectiva y de uso común para evaluar el efecto en el rendimiento de digestores con la adición de co-sustratos, debido a su duración y modo de operación limitados cualquier cambio en el sustrato de entrada dará como resultado un cambio transitorio en la composición de la comunidad microbiana en el sistema, que generalmente requiere de tres a cinco TRH para alcanzar un estado estacionario nuevamente (Koch *et al.*, 2015). Por lo tanto, las pruebas en lote no permiten evaluar los cambios en la comunidad microbiana ni los efectos de la deficiencia de nutrientes ya que estos sólo ocurren en la operación de digestión anaerobia a largo plazo (Gu, *et al.*, 2020).

Por lo tanto, con base en los resultados observados, en las pruebas de mono-digestión se puede notar un mayor número de microorganismos con predominio de las arqueas metanogénicas posiblemente debido, a que la prueba se realizó al final del proceso por lo que es posible que no se aprecien en su mayoría los organismos de las primeras etapas, y también debido a la mejor adaptación a las condiciones del proceso por parte del inóculo utilizado. En las co-digestiones se puede considerar que la composición de los sustratos influye de manera importante en la comunidad de microorganismos que llevan a cabo el proceso ya que diferencias en número pueden deberse al bajo contenido de SV añadidos por el lodo de purga a medida que la proporción de estos aumenta en el reactor, lo cual sugiere un bajo contenido de materia orgánica disponible para ser aprovechada, como lo mencionan Liu *et al.* (2016), quedando únicamente los metanogénicos que pueden sobrevivir a tales condiciones considerando el volumen inicial del inóculo utilizado en las pruebas.

Una vez que se han identificado algunas de las especies que conforman la comunidad microbiana presente en las pruebas de mono y co-digestión realizadas es importante tratar de establecer una relación entre estas y los resultados de producción de biogás obtenidos a partir de ellas. Para lo cual es importante considerar de acuerdo con Saha *et al.* (2020) que la estabilidad del proceso de digestión anaerobia y el rendimiento del biogás dependen de la resistencia, resiliencia y redundancia funcional de la comunidad microbiana y las alteraciones predominantes en este corresponden a cambios funcionales en el tipo y composición de los sustratos, cantidad de ST, carga

orgánica, disminución en el pH, acumulación de NH_4^+ , cambios en la temperatura, TRH, tipo de inóculo, y el número de ciclos en el reactor, lo que sugiere que es necesario el tipo correcto de diversidad de población entre las bacterias hidrolíticas, acidogénicas y acetogénicas junto con las arqueas metanogénicas para garantizar la estabilidad y el éxito de la metanización general.

Como se indicó previamente, con los resultados de identificación limitados, el número de especies diferentes presentes en cada prueba y de acuerdo con lo descrito en el apartado 5.3 en referencia a la composición de la FORSU y el lodo de purga, así como y sus velocidades de degradación se puede inferir que a medida que las proporciones de lodo aumentaron en los recipientes de prueba de las co-digestiones, la cantidad de materia orgánica biodegradable disminuyó por lo que los organismos no disponían de materiales para metabolizar y así tener disponibles los sustratos de las etapas subsecuentes por lo que no hay conversión a CH_4 . Esto se pudo ver reflejado en las bajas poblaciones de microorganismos identificados, así como una pobre producción de biogás conforme el lodo aumenta. En el caso de la mono-digestión de lodo de purga el número de organismos identificados es de los más altos, sólo por debajo de la mono digestión de FORSU, y entre las especies presentes, las arqueas metanogénicas predominan, lo que podría indicar que éstas corresponden a las contenidas en el inóculo utilizado sin que estas fueran perturbadas por la adición de FORSU cuya presencia podría causar efectos sobre las condiciones del reactor y viceversa en el caso de FORSU, razón por la cual no se presentan efectos sinérgicos en ninguna de las pruebas.

La presencia de arqueas metanogénicas en todas las pruebas podría deberse de acuerdo con Saha *et al.* (2020) a que en condiciones mesofílicas, las alteraciones de estos organismos en respuesta a alteraciones como la acumulación de AGV o cambios en la temperatura son insignificantes y su diversidad se ve menos afectada. Además, como esta comunidad no es tan abundante como la bacteriana, permanece funcionalmente estable a estos cambios, lo que, sumado a un sistema de amortiguación efectivo, es crucial en la estabilidad de la flora microbiana.

Con respecto a la tolerancia de los miembros del género *Methanosaeta* a la alta concentración de AGCL similar a la de los metanógenos hidrogenotróficos, en comparación con la de los miembros del género *Methanosarcina* se puede mencionar, de acuerdo a Nakasaki *et al.* (2020) que, como ambos son metanógenos acetoclásticos, con frecuencia compiten por el acetato por lo que la alta tolerancia de *Methanosaeta* a los AGCL podría resultar en el dominio del entorno sobre *Methanosarcina*. Lo cual podría explicar lo sucedido en las pruebas realizadas en este trabajo en las que se observa una mayor presencia de organismos de *Methanosaeta* en comparación con los de *Methanosarcina*.

Para finalizar, Venkiteshwaran *et al.* (2015) mencionan que las alteraciones del sustrato como cambios en la concentración y composición, pueden afectar la comunidad metanogénica y su actividad y diferentes sustratos pueden conducir al desarrollo de diferentes comunidades metanogénicas.

5.5 CALIBRACIÓN Y MODELACIÓN EN ADM1 CON EL SOFTWARE AQUASIM 2.0

La representación del proceso de co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga de agua residual a través del modelo ADM1 se desarrolló en el software AQUASIM 2.0.

En AQUASIM un modelo consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias y/o parciales y ecuaciones algebraicas, que describe de manera determinista el comportamiento de un conjunto dado de variables de estado importantes de un sistema. La definición de procesos, compartimentos y enlaces se realiza con la ayuda de variables, las cuales representan objetos que toman un valor numérico posiblemente sensible al contexto. Estas forman el subsistema básico requerido para la formulación de procesos, compartimentos y enlaces. Los procesos deben definirse antes de que puedan activarse en compartimentos. Finalmente, los enlaces se pueden usar para conectar compartimentos definidos (Reichert, 1998). La Figura 5.6 muestra la relación entre los elementos de un modelo en AQUASIM 2.0.

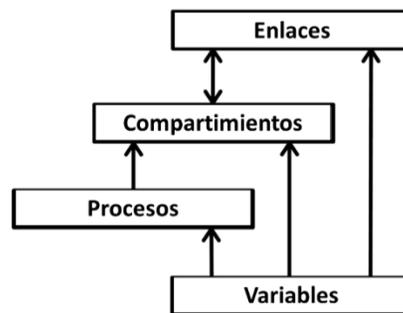


Figura 5.6. Principales elementos de la estructura de un modelo en AQUASIM 2.0 (Reichert, 1998)

Para la aplicación del modelo se utilizó un archivo generado en AQUASIM 2.0, diseñado específicamente para la aplicación de ADM1 en el proceso de digestión anaerobia, en el que las variables, procesos, compartimentos y enlaces correspondientes cuentan con los datos propuestos para el modelo original ADM1 aplicado a un reactor batch.

Los datos experimentales se obtuvieron de las pruebas de mono-digestión y co-digestión anaerobia en condiciones mesofílicas realizadas en el equipo AMPTS II.

De acuerdo con lo anterior el procedimiento para llevar a cabo la representación proceso de co-digestión anaerobia por medio de la modelación se realizó en diferentes etapas:

Desintegración. Como la materia orgánica se considera compleja se requiere la introducción de una etapa de desintegración para describir la presencia de partículas del sustrato. Este paso representa la descomposición física y la transformación de la materia orgánica compleja en partículas orgánicas solubles (Liotta *et al.*, 2014). La estequiometría de desintegración se define por los parámetros f_{XI} (fracción de partículas inertes), f_{SI} (fracción de inertes solubles), f_{pr} (fracción de proteínas), f_{li} (fracción de lípidos), f_{ch} (fracción de carbohidratos), referidos a la variable X_c (material complejo) (Polizzi *et al.*, 2017).

Las actividades que se desarrollaron en esta etapa son: la caracterización detallada de los sustratos de acuerdo con las fracciones previamente mencionadas, la determinación de la concentración de DQO del influente correspondiente al sustrato a degradar y la determinación de las fracciones en porcentaje de DQO correspondientes a la materia biodegradable (carbohidratos lípidos y proteínas) e inerte (material particulado soluble e inerte) del sustrato a degradar, de acuerdo con Rathnasiri (2016).

En relación con la caracterización realizada para los sustratos, las fracciones de composición en porcentaje obtenidas para cada uno de ellos se muestran en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5 Fraccionamiento de la DQO de los sustratos (% de composición)

Fracción	FORSU	Lodo de purga
<i>fch</i>	0.52	0.01
<i>fli</i>	0.09	0.57
<i>fpr</i>	0.16	0.17
<i>fsi</i>	0.10	0.16
<i>fxi</i>	0.13	0.09

Hidrólisis. Esta etapa se refiere a macro compuestos biodegradables, que se degradan en sus correspondientes componentes solubles: *Saa* (concentración de aminoácidos), *Sfa* (concentración de ácidos grasos de cadena larga) y *Ssu* (concentración de monosacáridos), respectivamente (Polizzi *et al.*, 2017).

Los valores de los parámetros de hidrólisis dependerán del tipo de sustrato, ya que los componentes individuales en el sustrato se hidrolizan a diferentes velocidades. Debido a la mayor complejidad estructural, las tasas de hidrólisis para las proteínas pueden ser más bajas que para los carbohidratos o lípidos. (Bułkowska *et al.*, 2015).

Las etapas *acidogénica* y *acetogénica* intermedias modelan la producción de propionato, butirato, valerato y acetato (Polizzi *et al.*, 2017).

De acuerdo con Bułkowska *et al.* (2015), la acidogénesis es un proceso microbiano que incluye la degradación de azúcares solubles, ácidos grasos y aminoácidos en productos más simples, siendo el paso más rápido de la conversión anaerobia de la materia orgánica compleja, sin embargo, los cambios en los parámetros de esta etapa se caracterizan por poca o ninguna sensibilidad en los resultados del modelo; por lo tanto, estos no influyen en la tasa de producción de CH₄. Además, en la acetogénesis los valores para los parámetros cinéticos aún son difíciles de encontrar en la literatura, aunque el propionato y el acetato se han considerado generalmente como los intermediarios más importantes en la digestión anaerobia y como indicadores principales del desequilibrio del proceso.

Para el desarrollo de estas etapas se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar posibles opciones de valores que sirvieran para ajustar la simulación del proceso de co-digestión anaerobia. La información obtenida de la búsqueda se muestra en la Tabla 5.6.

De acuerdo con la literatura consultada los valores propuestos por Esposito *et al.* (2011 b), se utilizaron para llevar a cabo la simulación del proceso ya que corresponden a sustratos similares a los utilizados en este trabajo (FORSU y lodo de PTAR).

Tabla 5.6 Valores de las variables de estado para las etapas de hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis

VARIABLES DE ESTADO	SÍMBOLO	UNIDADES	Batstone <i>et al.</i> , 2002	Rosen y Jeppsson, 2006	Esposito <i>et al.</i> , 2011 b	Uhlenhut <i>et al.</i> , 2018
Concent. de monosacáridos	<i>Ssu</i>	kg DQO/m ³	0.0126	0.0120	0.4639	---
Concent. de aminoácidos	<i>Saa</i>	kg DQO/m ³	0.0056	0.0053	0.1694	---
Concent. de AGCL	<i>Sfa</i>	kg DQO/m ³	0.1098	0.0986	6.531	---
Concent. de valerato total	<i>Sva</i>	kg DQO/m ³	0.0117	0.0116	0.0941	---
Concent. de butirato total	<i>Sbu</i>	kg DQO/m ³	0.0149	0.0133	0.133	0.014
Concent. de propionato total	<i>Spro</i>	kg DQO/m ³	0.0180	0.0158	0.5478	0.0168
Concent. de acetato total	<i>Sac</i>	kg DQO/m ³	0.0492	0.1976	0.0589	0.1785

En el modelo ADM1, se consideran siete grupos microbianos definidos como variables de estado dinámico. Los grupos incluidos son: *Xsu* (consumidores de azúcar), *Xaa* (consumidores de aminoácidos), *Xfa* (consumidores de AGCL), *Xc4* (consumidores de valerato y butirato), *Xpro* (consumidores de propionato), *Xac* (consumidores de acetato), *Xh2* (consumidores de hidrógeno) (Bułkowska *et al.*, 2015; Rathnasiri, 2016).

La etapa final, denominada *metanogénesis*, representa la producción de biogás a partir de acetato e hidrógeno. En esta se consideran dos de los grupos de organismos consumidores: los metanógenos que utilizan hidrógeno y acetato. Los que consumen acetato tienen tasas de crecimiento de 2 a 4 veces más bajas que los que consumen hidrógeno. A pesar de esto, aproximadamente el 70% del CH₄ se produce con el primer grupo de microorganismos (Bułkowska *et al.*, 2015; Rathnasiri, 2016).

Para la consideración en el modelo de los grupos de biomasa se realizó una búsqueda bibliográfica que permitiera identificar valores representativos de las concentraciones de los microorganismos señalados, así como hacer el cálculo de las concentraciones presentes en el inóculo utilizado en función de su valor de DQO de acuerdo con las proporciones en porcentaje que se usan en el modelo original ADM1, como una estimación más aproximada al caso real. La información obtenida de la búsqueda para los grupos participantes en las etapas acidogénica, acetogénica y metanogénica, así como las concentraciones calculadas que se utilizaron se muestra en las Tablas 5.7 y 5.8, respectivamente.

Tabla 5.7 Valores de la literatura para las variables de estado correspondientes a los consumidores de las fases acidogénica, acetogénica y metanogénica

VARIABLES DE ESTADO	SÍMBOLO	UNIDADES	Batstone <i>et al.</i> , 2002	Rosen y Jeppsson, 2006	Esposito <i>et al.</i> , 2011	Uhlenhut <i>et al.</i> , 2018
Consumidores de azúcar	<i>Xsu</i>	kg DQO/m ³	0.3541	0.4202	0.4117	0.855
Consumidores de aminoácidos	<i>Xaa</i>	kg DQO/m ³	0.3568	1.1792	0.3166	0.637
Consumidores de AGCL	<i>Xfa</i>	kg DQO/m ³	0.3907	0.2430	1.48E-05	6.70E-01
Consumidores de valerato y butirato	<i>Xc4</i>	kg DQO/m ³	0.1449	0.4319	0.1277	0.283
Consumidores de propionato	<i>Xpro</i>	kg DQO/m ³	0.0610	0.1373	0.0491	0.13559
Consumidores de acetato	<i>Xac</i>	kg DQO/m ³	0.4704	0.7606	0.2434	0.9
Consumidores de hidrógeno	<i>Xh2</i>	kg DQO/m ³	0.2237	0.3170	0.1084	0.43

Tabla. 5.8 Valores de concentración de biomasa microbiana calculados a partir de las proporciones usadas en ADM1

VARIABLE	UNIDADES	PROPORCIONES EN % ADM1	VALORES CALCULADOS
<i>Xsu</i>	kg DQO/m ³	17.69	0.0589
<i>Xaa</i>	kg DQO/m ³	17.83	0.0594
<i>Xfa</i>	kg DQO/m ³	19.52	0.0650
<i>Xc4</i>	kg DQO/m ³	7.24	0.0241
<i>Xpro</i>	kg DQO/m ³	3.05	0.0101
<i>Xac</i>	kg DQO/m ³	23.50	0.0783
<i>Xh2</i>	kg DQO/m ³	11.18	0.0372

Para llevar a cabo la simulación, se realizaron los ajustes correspondientes al archivo de AQUASIM 2.0 original para que la representación del proceso se apegara a las características en las que fue realizada la fase experimental; para lo cual se establecieron las condiciones iniciales en las que se realizó, como el tipo de reactor (batch) y el volumen del reactor (útil, espacio de cabeza y total). Además, se modificaron algunas variables de estado importantes que representan otra parte de las condiciones y datos obtenidos en la etapa experimental como la temperatura del proceso y el flujo de gas obtenido experimentalmente.

Es importante mencionar que de acuerdo con Bułkowska *et al.*, (2015) para la calibración de ADM1 con diferentes sustratos, la estimación de todos los parámetros requiere un conjunto significativamente amplio de resultados experimentales. Por lo tanto, para evitar estimaciones inapropiadas, se recomienda reducir el número de parámetros. En este sentido, los parámetros que requieren ajuste son principalmente: las constantes de desintegración/velocidades de hidrólisis, las constantes de saturación media (*Ks*) y las tasas máximas específicas de consumo (*km*) y los valores restantes se recomienda usarlos de acuerdo con los propuestos originalmente para ADM1.

Cabe aclarar que la selección de los valores utilizados para la simulación de las etapas del proceso, así como para las concentraciones de biomasa aplicados en este trabajo fueron seleccionados debido al mejor ajuste de los resultados obtenidos en la producción de biogás en contraste con los valores de la bibliografía que se presentan en las tablas comparativas. En la Tabla 5.9 se muestran los valores de los parámetros que resultaron de las modificaciones realizadas, así como los valores de referencia previamente evaluados, los autores referidos reportan los mismos valores para dichos parámetros. Todos los valores de las constantes cinéticas y estequiométricas restantes se mantuvieron como en el modelo ADM1 original.

Los resultados obtenidos en el caso de la FORSU para los parámetros seleccionados muestran coincidencia con algunos trabajos previos realizados para sustratos similares (Galí *et al.*, 2009 y Esposito *et al.*, 2011), sin embargo, a medida que la proporción de FORSU se reduce y aumenta el lodo de purga, los valores de los parámetros cambian. En el caso de la constante de desintegración de partículas complejas los valores resultantes son más bajos que los valores iniciales originales propuestos Batstone *et al.*, (2002), Rosen y Jeppsson, 2006 y Galí *et al.*, 2009 (Tabla 5.9), lo que indica una descomposición más lenta del material complejo (*Xc*) como lo expone Bułkowska *et al.* (2015).

Una vez que se realizaron las modificaciones mencionadas anteriormente, los resultados de la simulación obtenidos para la producción de CH₄ en cada una de las pruebas de mono y co-digestión se muestran en las Figuras 5.7 a 5.12.

Tabla 5.9 Valores modificados y de referencia para las constantes utilizadas en la calibración del modelo en las diferentes proporciones de mezcla

VARIABLE	SÍMBOLO	UNIDADES	Batstone <i>et al.</i> , 2002, Rosen y Jeppsson, 2006, Gali <i>et al.</i> , 2009	FORSU	80/20	60/40	40/60	20/80	Lodo de Purga
Const. de desintegración de partículas complejas	<i>Kdis</i>	d ⁻¹	0.5	0.19	0.19	0.24	0.28	0.12	0.05
Const. de hidrólisis de carbohidratos	<i>Kh_xch</i>	d ⁻¹	10	10	10	7	2	1.5	0.8
Const. de hidrólisis de proteínas	<i>Kh_xpr</i>	d ⁻¹	10	10	10	7	2	1.5	0.8
Const. de hidrólisis lipídica	<i>Kh_xli</i>	d ⁻¹	10	10	10	7	2	1.5	0.8
Tasa máxima específica de consumo de monosacáridos	<i>Km_su</i>	d ⁻¹	30	30	30	27	24	15	4
Tasa máxima específica de consumo de aminoácidos	<i>Km_aa</i>	d ⁻¹	50	50	50	50	45	35	20
Tasa máxima específica de consumo de AGCL	<i>Km_fa</i>	d ⁻¹	6	6	6	6	5	4	2
Tasa máxima específica de consumo de valerato y butirato	<i>Km_c4</i>	d ⁻¹	20	20	20	20	15	10	10
Tasa máxima específica de consumo de propionato	<i>Km_pr</i>	d ⁻¹	13	13	13	13	10	9	3
Tasa máxima específica de consumo de acetato	<i>Km_ac</i>	d ⁻¹	8	8	8	8	6	5	2.5
Tasa de decaimiento de consumidores de aminoácidos	<i>kdec_xaa</i>	d ⁻¹	0.02	0.5	0.5	0.8	0.95	0.8	1.8
Tasa de decaimiento de consumidores de acetato	<i>kdec_xac</i>	d ⁻¹	0.02	0.9	0.9	1	2	0.9	2.8
Tasa de decaimiento de consumidores de butirato y valerato	<i>kdec_xc4</i>	d ⁻¹	0.02	0.5	0.5	0.8	0.95	0.8	1.8
Tasa de decaimiento de consumidores de AGCL	<i>kdec_xfa</i>	d ⁻¹	0.02	0.5	0.5	0.8	0.95	0.8	1.8
Tasa de decaimiento de consumidores de propionato	<i>kdec_xpro</i>	d ⁻¹	0.02	0.5	0.5	0.8	0.95	0.8	1.8
Tasa de decaimiento de consumidores de monosacaridos	<i>kdec_xsu</i>	d ⁻¹	0.02	0.5	0.5	0.8	0.95	0.8	1.8

Como se puede apreciar en la Figura 5.7 la representación del proceso simulada con ADM1 presenta similitud con los valores de producción de CH₄ obtenidos experimentalmente para la mono-digestión de FORSU. Entre los días 5 y 8 los datos experimentales muestran un aumento en la producción en comparación con la simulación para luego estabilizarse hasta el final del proceso; posteriormente el comportamiento de la producción simulada tiende a elevarse (484.1 mLN CH₄/g SV) y muestra una diferencia hacia el final del proceso con el valor experimental (481.8 mLN CH₄/g SV).

El comportamiento de los datos experimentales de FORSU podría deberse a que el biogás producido durante la fase inicial del proceso (entre el día 1 y 4) es el resultado de la degradación de la fracción rápidamente hidrolizable y de los días 4 a 8 corresponde a la producción debida al consumo de los AGV presentes en el sistema, finalmente la etapa donde se estabiliza la gráfica correspondería a la producción debida a los materiales lentamente degradables, como se observa el comportamiento general del proceso mostrado en la Figura 5.7. Dependiendo de la naturaleza del sustrato y de la duración de las fases, en algunos casos se podría considerar que la contribución de la fracción lentamente hidrolizable es insignificante en comparación con la rápida (Polizzi *et al.*, 2017).

Sin embargo, las diferencias observadas entre el modelo y los datos experimentales los días 5 y 9, así como al final del proceso, se pueden deber a que la simulación toma en cuenta la producción de CH₄ a partir del total de la materia orgánica biodegradable considerada en el fraccionamiento inicial. También, entre los aspectos estructurales del ADM1 la producción simulada de gas exhibe una tendencia promedio por lo que no se estaría representando el agotamiento total del sustrato en la etapa experimental (Derbal *et al.*, 2009). Además, de acuerdo con Souza *et al.* (2013) el

modelo parece sobreestimar la producción de CH₄, dependiendo del TRS, observando producciones más altas en la curva simulada durante un período más largo que los datos reales.

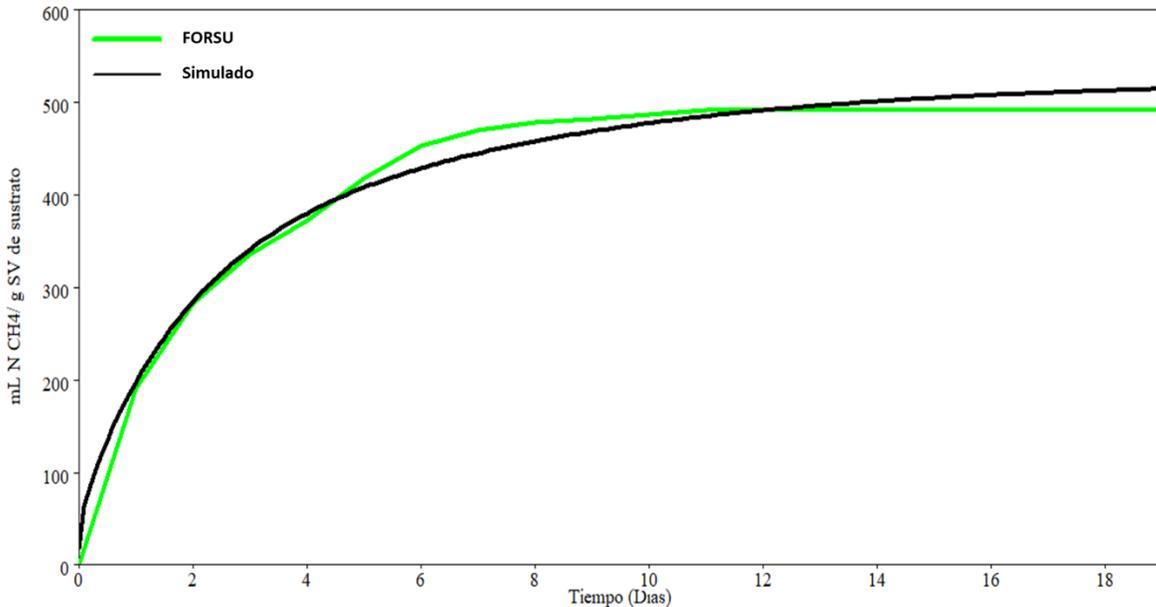


Figura 5.7. Producción de metano calculada a partir de FORSU comparada con la producción de metano experimental

En esta simulación las modificaciones que se realizaron corresponden a la constante de desintegración de partículas complejas (*Kdis*) así como las tasas de decaimiento de consumidores de aminoácidos (*kdec_xaa*), acetato (*kdec_xac*), butirato y valerato (*kdec_xc4*), AGCL (*kdec_xfa*), propionato (*kdec_xpro*) y monosacáridos (*kdec_xsu*). El valor de *Kdis* utilizado para la simulación es menor con respecto al valor reportado en la literatura de 0.5 d⁻¹ que corresponde al original propuesto por el modelo ADM1. En el caso de las tasas de decaimiento de consumidores estas son iguales para todos los casos y mayores con respecto al valor original de 0.02 5 d⁻¹. Con estas modificaciones se logra una representación más apegada del modelo a los datos obtenidos de manera experimental.

Lo anterior para el valor de *kdis* se debe a que el modelo ADM1 original no toma en cuenta el tamaño de las partículas ya que inicialmente se utilizó para modelar la producción de CH₄ a partir de la digestión anaerobia de lodos de tratamiento de agua residual. Por lo tanto, cuanto mayor es el tamaño de partícula, menor es el área específica de masa y, por lo tanto, menor es el área de contacto con microorganismos, lo que significa que la velocidad de descomposición es más lenta y se refleja en la disminución de *kdis* (Zhao *et al.*, 2019). De acuerdo con Esposito *et al.* (2011) un tamaño de partícula más grande de las partículas orgánicas afecta la eficiencia general del proceso, debido a la disminución de la tasa de desintegración, lo que implica una transformación limitada (es decir, solo parcial) en carbohidratos, proteínas y lípidos de estas partículas y, por lo tanto, una menor disponibilidad de sustratos para los procesos biológicos posteriores.

En la estructura original de ADM1, se supone que la biomasa microbiana en descomposición, representada por la constante de decaimiento (*kdec*), se desintegra en carbohidratos, lípidos y

proteínas, que son hidrolizados y utilizados por las poblaciones microbianas como sustrato. De esta manera, parte de la biomasa perdida debido al mantenimiento del sistema puede utilizarse para el crecimiento microbiano. Aunque, en algunos casos este reciclaje de biomasa muerta puede considerarse insignificante (Bonk *et al.*, 2019). Las modificaciones en *kdec* tienen un impacto considerable en los resultados de la simulación, aunque las tasas de descomposición más altas generalmente son más representativas para el modelado de sistemas anaerobios mixtos y de biopelículas (Dereli *et al.*, 2010).

La *kdec* y la tasa máxima específica de consumo (*km*) son matemáticamente dependientes (están correlacionados) (Girault *et al.*, 2011). Por lo tanto, cuando existe una mayor tasa de descomposición efectiva, también debería existir una mayor tasa de absorción (Batstone, 2006). Sin embargo, en el caso de esta simulación las modificaciones en las tasas máximas específicas de consumo no fueron representativas por lo que se utilizaron los valores originales propuestos por el modelo.

Batstone *et al.*, (2004) utilizaron tasas de decaimiento aumentados (de 5 - 0.1 d⁻¹) comparadas con las del modelo original de 0.02 d⁻¹ para reactores UASB mesofílicos, considerando que el valor de 0.1 d⁻¹ es más realista que los valores extremadamente bajos utilizados anteriormente. En el caso de la FORSU el valor utilizado en la simulación fue 0.5 d⁻¹, el cual se encuentra dentro del intervalo mencionado previamente para *kdec_xaa*, *kdec_xc4*, *kdec_xfa*, *kdec_xpro*, *kdec_xsu*. Para *kdec_xac* el valor utilizado fue 0.9 d⁻¹, debido a que el modelo hace una sobreestimación de la biomasa correspondiente a esta población de consumidores por lo que el resultado de la simulación era inconsistente con el valor experimental, sin embargo, aplicando el aumento en la tasa de decaimiento de consumidores de acetato con respecto a las otras poblaciones de biomasa activa en el reactor, la simulación presenta un mejor ajuste.

En la Figura 5.8 la representación del proceso simulada con ADM1 (494 mLN CH₄/g SV) presenta valores de producción de CH₄ cercanos a los obtenidos experimentalmente para el proceso de co-digestión de FORSU y lodo de purga de agua residual (483.7 mLN CH₄/g SV). Este proceso experimental presenta un comportamiento comparable al de la mono-digestión de FORSU, con una producción mayor de CH₄ durante los días 1 a 4 debido, como se mencionó previamente, a la degradación del material rápidamente hidrolizable y posteriormente, entre los días 5 y 8, los datos muestran un aumento en la producción en comparación con la simulación debida al consumo de los AGV presentes en el sistema, para luego estabilizarse hasta el final del proceso.

Para la simulación del proceso de co-digestión 80/20 se realizaron modificaciones a las mismas variables utilizadas para la representación del proceso de mono-digestión de FORSU, y se usaron los mismos valores de dicho proceso debido a que los resultados en la producción de biogás obtenidos en la fase experimental son comparables (483.7 mLN CH₄/g SV y 481.8 mLN CH₄/g SV, respectivamente). Por lo tanto, las variables modificadas corresponden a *Kdis* (0.19 d⁻¹), *kdec_xac*, *kdec_xc4*, *kdec_xfa*, *kdec_xpro*, *kdec_xsu* (con valor de 0.5 d⁻¹ en todos los casos) y *kdec_xaa* (0.9 d⁻¹), produciendo los mismos efectos descritos previamente en la curva simulada, referentes en el caso de *kdis* a la menor velocidad de degradación de las partículas debido a su tamaño, al ajuste realizado para las *kdec* por Batstone *et al.*, (2004) y en el caso de *kdec_xaa* por la sobreestimación de la biomasa de esta población de consumidores reflejada en los resultados del modelo.

En lo referente a la sobreestimación de la producción de CH₄ observada en el caso de la mono-digestión de FORSU, en este proceso no se aprecia dicha diferencia, debido a que la producción de CH₄ aumentó, lo que mejoró el ajuste de los datos experimentales con la simulación realizada.

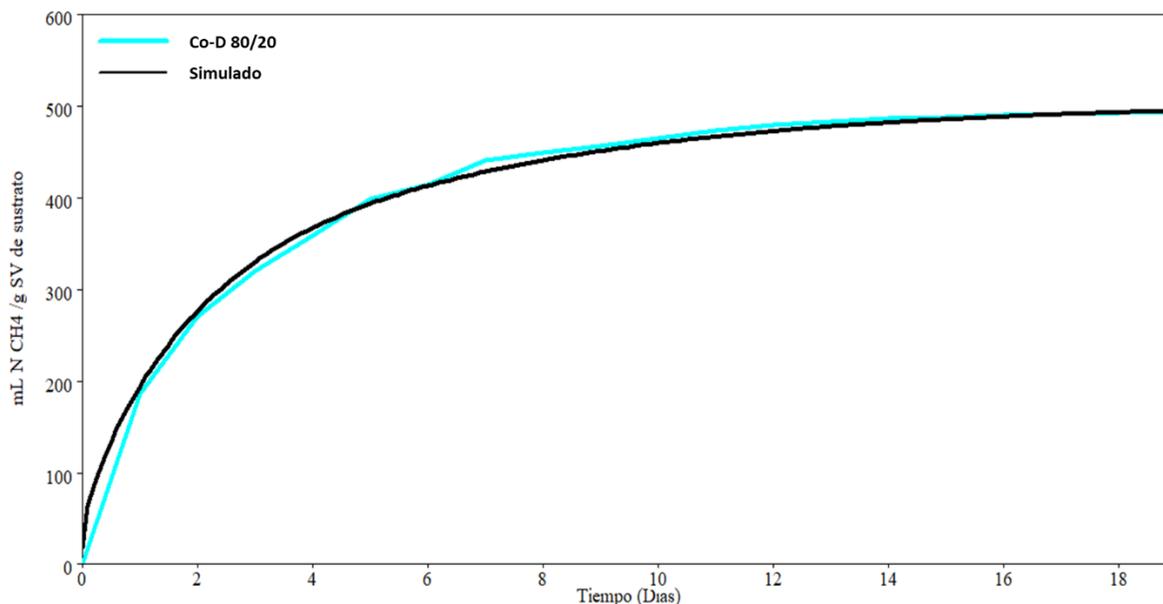


Figura 5.8. Producción de metano calculada para la co-digestión 80/20 comparada con la producción de metano experimental

La Figura 5.9 muestra la representación del proceso de co-digestión 60/40 simulada con ADM1, la cual presenta similitud con los valores de producción de CH₄ obtenidos experimentalmente. En esta se observa una producción mayor de CH₄ con respecto al tiempo en el inicio, así como al final de proceso comparada con la co-digestión 80/20. Entre los días 1 y 4 se aprecia una disminución marcada en la velocidad de producción de los datos experimentales en comparación con la simulación. A partir de los días 5 y 9 los datos experimentales muestran un aumento en la producción para luego estabilizarse hasta el final del proceso; posteriormente el comportamiento de la producción simulada tiende a elevarse (387.9 mL N CH₄/g SV) y muestra una diferencia hacia el final del proceso con los valores experimentales (375.4 mL N CH₄/g SV).

El comportamiento de los datos experimentales de la co-digestión 60/40 en los primeros días del proceso podría deberse a la disminución de la cantidad de material rápidamente hidrolizable presente en la FORSU debido a la reducción en la proporción añadida en la prueba. A partir de los días 5 a 9 el comportamiento corresponde al igual que en los anteriores a una mayor producción debida al consumo de los AGV presentes en el sistema, finalmente la etapa de estabilización de la gráfica correspondería a la producción alcanzada por los materiales lentamente degradables como se observa el comportamiento general de los procesos mostrados previamente.

En este caso, la diferencia observada hacia el final del proceso entre el modelo y los datos experimentales también se puede deber a la observación realizada por Derbal *et al.* (2009) en la que indica que la producción simulada de gas exhibe una tendencia promedio a partir del total de la materia orgánica biodegradable considerada en el fraccionamiento inicial por lo que no se estaría representando el agotamiento total del sustrato de la etapa experimental.

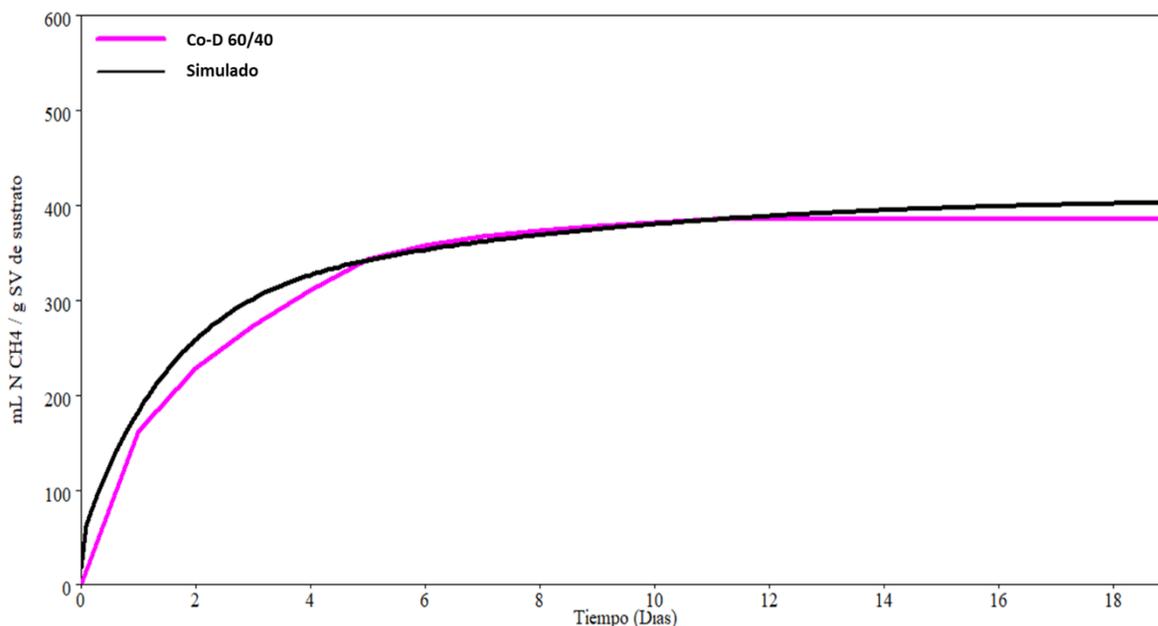


Figura 5.9. Producción de metano calculada para la co-digestión 60/40 comparada con la producción de metano experimental

En esta simulación las modificaciones que se realizaron corresponden a la constante de desintegración de partículas complejas ($Kdis$), constante de hidrólisis de carbohidratos (Kh_{xch}), constante de hidrólisis de proteínas (Kh_{xpr}), constante de hidrólisis lipídica (Kh_{xli}), tasa máxima específica de consumo de monosacáridos (Km_{su}), así como las tasas de decaimiento de consumidores de aminoácidos ($kdec_{xaa}$), acetato ($kdec_{xac}$), butirato y valerato ($kdec_{xc4}$), AGCL ($kdec_{xfa}$), propionato ($kdec_{xpro}$) y monosacáridos ($kdec_{xsu}$).

El valor de $Kdis$ utilizado para la simulación, como en los casos anteriores, es menor (0.24 d^{-1}) con respecto al valor reportado en la literatura de 0.5 d^{-1} que corresponde al original propuesto por el modelo ADM1. Para las constantes de hidrólisis también se utilizaron valores más bajos (7 d^{-1}) que los propuestos originalmente de 10 d^{-1} , lo mismo que tasa máxima específica de consumo de monosacáridos (27 d^{-1}) en la que el valor original es de 30 d^{-1} . En el caso de las tasas de decaimiento de consumidores estas son iguales para todos los casos (0.8 d^{-1}) con excepción de $kdec_{xac}$ en la que se utilizó un valor de 1 d^{-1} y mayores con respecto al valor original de 0.02 d^{-1} . Con estas modificaciones se logra una representación más apegada del modelo a los datos obtenidos de manera experimental.

La modificación en el valor utilizado se debe en el caso de $kdis$ a los mismos efectos descritos previamente, de menor velocidad de desintegración de las partículas debido a su tamaño, sin embargo, en comparación con la co-digestión 80/20, en este caso este valor aumenta ya que la proporción de FORSU añadida al reactor es menor lo que se ve reflejado en el aumento de la velocidad de desintegración de las partículas del reactor en general.

Para los valores de las kh el modelo ADM1 considera una composición constante de partículas con fracciones fijas para carbohidratos, proteínas, lípidos e inertes. Sin embargo, los residuos sólidos son heterogéneos y cambian dinámicamente su composición (Zaher *et al.*, 2009). García-Gen *et al.*, (2015) indican que los coeficientes cinéticos de hidrólisis para carbohidratos, proteínas y lípidos

entre otros sustratos pueden ser distintos debido a diferentes condiciones experimentales, diferentes relaciones de biomasa hidrolítica a sustrato y el efecto concentrado de desintegración e hidrólisis. Y reporta valores para la desintegración-hidrólisis de carbohidratos y proteínas en el intervalo de 0.5-2.0 d⁻¹ y 0.25-0.8 d⁻¹, respectivamente, y para lípidos entre 0.1 y 0.76 d⁻¹. Comúnmente la velocidad de hidrólisis disminuye al aumentar el tamaño de partícula. En la materia orgánica, las partículas más pequeñas, se hidrolizan más rápido que las partículas más grandes (Dimock y Morgenroth, 2006), por lo que podría considerarse que la disminución en los valores de las constantes de hidrólisis en este caso ocurrió también debido a la reducción en la proporción de FORSU añadida en la prueba, debido a la menor cantidad de partículas de materiales hidrolizables de mayor tamaño. También es importante mencionar que, si la constante de desintegración es menor que la hidrólisis de carbohidratos, proteínas y lípidos, la influencia de las constantes de hidrólisis puede ser descartada y el efecto de desintegración e hidrólisis de las partículas solo puede ser explicado por la desintegración (García-Gen *et al.*, 2015).

En lo referente a la tasa máxima de consumo de azúcares (Km_{su}) basada en las cinéticas de tipo Monod, o sea, tasas de crecimiento específico en términos de concentración de sustrato (Antonopoulou *et al.*, 2012 b), del mismo modo que en el trabajo realizado por Schoen *et al.* (2009) este parámetro cinético, tuvo que ser reducido para evitar una sobreestimación de la producción de CH₄, lo cual podría reflejar una pobre adaptación para la degradación de azúcares en las primeras etapas del proceso.

Las modificaciones de las $kdec$ para la simulación de la co-digestión 80/20 se encuentran entre el intervalo propuesto por Batstone *et al.*, (2004) (de 5-0.1 d⁻¹). En estas se utilizó 0.8 d⁻¹ para $kdec_{xaa}$, $kdec_{xc4}$, $kdec_{xfa}$, $kdec_{xpro}$, $kdec_{xsu}$ con los efectos observados previamente en la curva simulada y para $kdec_{xac}$ el valor utilizado fue 1 d⁻¹, por la sobreestimación de la biomasa de esta población de consumidores reflejada en los resultados del modelo que fue referido anteriormente.

Como se puede notar, el cambio en las proporciones de sustratos a degradar surte un efecto importante en la producción total del proceso, y es clara la influencia del aumento en la proporción de lodo de purga para la reducción en el rendimiento del proceso, lo que puede deberse, como se sugirió previamente, a su composición y a la presencia de sustancias poliméricas extracelulares que dificultan la biodegradación de la materia orgánica presente en este.

La Figura 5.10 muestra la representación del proceso de co-digestión 40/60 simulada con ADM1, la cual presenta similitud con los valores de producción de CH₄ obtenidos experimentalmente. Se observa una producción mayor de CH₄ con respecto al tiempo al inicio, así como al final de proceso como ocurrió en el caso de la co-digestión 60/40. Entre los días 1 y 4 se aprecia una disminución marcada en la velocidad de producción de los datos experimentales en comparación con la simulación. A partir de los días 5 y 9 los datos experimentales muestran una mayor producción para luego estabilizarse hasta el final del proceso; posteriormente el comportamiento de la producción simulada tiende a elevarse (260.8 mLN CH₄/g SV) y muestra una diferencia hacia el final del proceso con los valores experimentales (240.2 mLN CH₄/g SV).

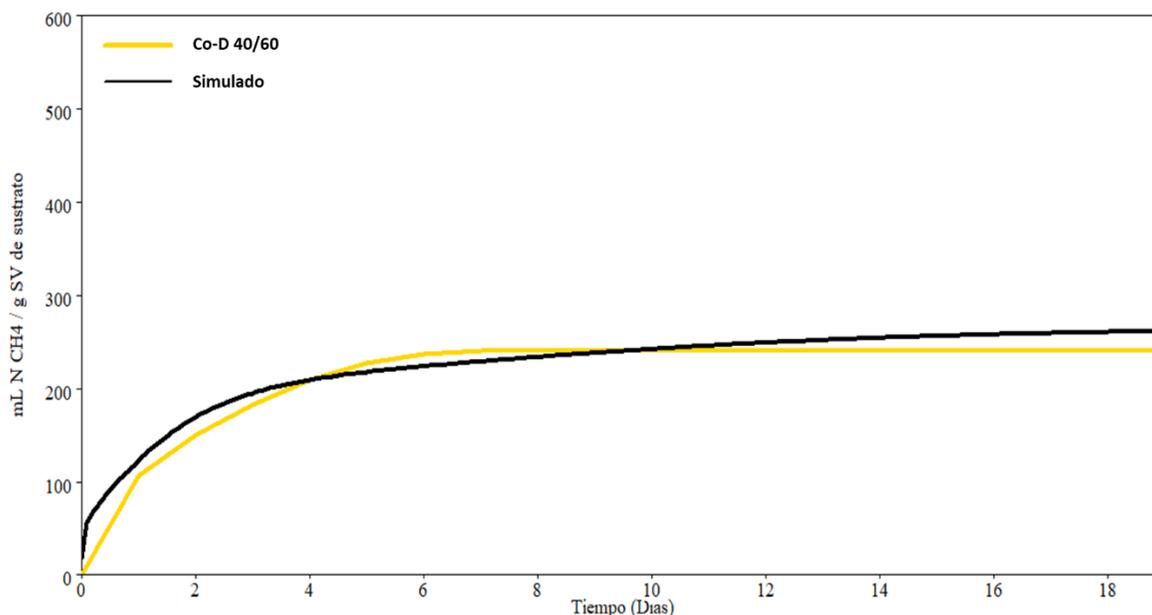


Figura 5.10. Producción de metano calculada para la co-digestión 40/60 comparada con la producción de metano experimental

El comportamiento de los datos experimentales de la co-digestión 40/60 en los primeros días del proceso podría deberse a la disminución de la cantidad de material rápidamente hidrolizable presente en la FORSU debido a la reducción en la proporción añadida en la prueba. A partir de los días 5 a 9 el comportamiento corresponde como en los casos anteriores a un aumento de la producción debida al consumo de los AGV presentes en el sistema, finalmente la etapa de estabilización de la gráfica correspondería a la producción alcanzada por la fracción lentamente degradable como se observa el comportamiento general de los procesos mostrados antes. La diferencia hacia el final del proceso entre el modelo y los datos experimentales también se puede deber a la observación realizada por Derbal *et al.* (2009) descrita previamente.

En esta simulación las modificaciones que se realizaron corresponden a la constante de desintegración de partículas complejas ($Kdis$), las constantes de hidrólisis de carbohidratos (Kh_{xch}), proteínas (Kh_{xpr}) y lípidos (Kh_{xli}), las tasas máximas específicas de consumo de monosacáridos (Km_{su}), aminoácidos (Km_{aa}), AGCL (Km_{fa}), valerato y butirato (Km_{c4}), propionato (Km_{pr}) y acetato (Km_{ac}); así como las tasas de decaimiento de consumidores de aminoácidos ($kdec_{xaa}$), acetato ($kdec_{xac}$), butirato y valerato ($kdec_{xc4}$), AGCL ($kdec_{xfa}$), propionato ($kdec_{xpro}$) y monosacáridos ($kdec_{xsu}$).

El valor de $Kdis$ utilizado para la simulación, como en los casos anteriores, es menor ($0.28 d^{-1}$) con respecto al valor original reportado en la literatura de $0.5 d^{-1}$ propuesto en el modelo ADM1. En las constantes de hidrólisis también se utilizaron valores más bajos ($2 d^{-1}$) que los propuestos originalmente de $10 d^{-1}$; en las tasas máximas específicas de consumo igualmente se utilizaron valores inferiores a los originales: para monosacáridos $24 d^{-1}$ (original $30 d^{-1}$), aminoácidos $45 d^{-1}$ (original $50 d^{-1}$), AGCL $5 d^{-1}$ (original $6 d^{-1}$), valerato y butirato $15 d^{-1}$ (original $20 d^{-1}$), propionato $10 d^{-1}$ (original $13 d^{-1}$) y acetato $6 d^{-1}$ (original $8 d^{-1}$). En el caso de las tasas de decaimiento de consumidores estas son iguales para todos los casos ($0.95 d^{-1}$) con excepción de $kdec_{xac}$ en la que

se utilizó un valor de 2 d^{-1} y mayores con respecto al valor original de 0.02 d^{-1} . Con estas modificaciones se logra una representación más apegada del modelo a los datos obtenidos de manera experimental.

La modificación de *kdis* se debe a los efectos descritos previamente, de menor velocidad de desintegración de las partículas debido a su tamaño, sin embargo, en comparación con la co-digestión 60/40, este valor aumenta por que la proporción de FORSU añadida al reactor es menor, lo que se refleja en el aumento de la velocidad de desintegración de las partículas del reactor en general.

Para el caso de las *kh* podría considerarse que la disminución en los valores de las constantes de hidrólisis ocurrió también debido la reducción en la proporción de FORSU añadida en la prueba, debido a la menor cantidad de partículas de materiales hidrolizables de mayor tamaño, así como al aumento en la cantidad de lodo de purga contenido en el reactor, por los efectos descritos en los resultados de las pruebas presentadas anteriormente referentes al aumento de velocidad de hidrólisis por el tamaño de partículas.

La tasa máxima de consumo de azúcares (*Km_{su}*) en este caso también fue reducida como en el caso de la co-digestión 60/40 para evitar una sobreestimación de la producción de CH_4 , debido a la reducción de la proporción de materia orgánica a degradar presente en la FORSU por la menor cantidad de azúcares considerados como sustratos intermediarios en el proceso (Boubaker y Ridha, 2008; Derbal *et al.*, 2009). Otra opción de la reducción posiblemente sea la pobre adaptación de los microorganismos para la degradación de azúcares en las primeras etapas del proceso de acuerdo con lo reportado por Schoen *et al.* (2009).

Los valores originales de *km_{aa}* y *km_{ac}* en ADM1 indican una rápida descomposición del sustrato y un rápido crecimiento de la biomasa en el digester, lo que resulta en una rápida degradación de AGCL y ácidos orgánicos y, por lo tanto, una mayor producción de CH_4 (Chen *et al.*, 2016). En el caso de la co-digestión 40/60 en la que se observa una disminución en la producción de CH_4 , podría estarse presentando el efecto contrario a lo descrito por Chen *et al.* (2016) por lo que la reducción de estas variables (*km_{aa}* y *km_{ac}*) es necesaria para una mejor simulación del proceso. De acuerdo con lo anterior específicamente en el caso de *km_{ac}*, Montecchio *et al.* (2019) sugieren que, utilizando los parámetros cinéticos predeterminados de ADM1, el consumo de acetato es lo suficientemente rápido como para evitar su acumulación y proponen que la caída en la producción de CH_4 es consecuencia de esta acumulación. Por lo tanto, al reducir el valor predeterminado de *Km_{ac}* (8 d^{-1}) se permite lograr un mejor ajuste con resultados experimentales, tanto para acetato como para metano, lo que indica que en el proceso la metanogénesis acetoclástica es una vía crucial.

Al respecto de las modificaciones de *Km_{ac}*, Souza *et al.*, (2013) observaron cambios importantes en el comportamiento de la simulación con el uso de valores bajos en comparación con el original, lo que podría significar que existe una falta de microorganismos degradadores y causar la acumulación de ácido acético en el sistema, que bajaría el pH e inhibiría la metanogénesis. Sin embargo, también indican que esta interpretación debe tratarse con cuidado, ya que las pruebas de PBM generalmente están protegidas para evitar caídas de pH, y la sensibilidad de este parámetro no tendría gran importancia. Además, reportan el mismo efecto para *km_{fa}*.

Para el caso de los AGV, considerando que el acetato se produce como un producto intermediario del consumo del butirato para ser posteriormente convertido a CH₄, lo mismo que en el caso del propionato; aunque en este la degradación ocurre con más lentamente, Antonopoulou *et al.* (2012 a) proponen valores más bajos en las variables km_{ac} (5 d⁻¹) y Km_{c4} (9 d⁻¹) para pruebas en un reactor batch, comparados con los propuestos en el ADM1 original (8 y 20 d⁻¹ respectivamente) y un valor igual al del modelo para Km_{pr} (13 d⁻¹) obteniendo muy buenas predicciones en la producción de CH₄ durante los experimentos. Este efecto también se observa en el caso de la co-digestión 40/60, en el que las km de los AGV también se redujeron a valores similares a los obtenidos por Antonopoulou *et al.* (2012 a) obteniendo mejores resultados en la simulación de esta prueba, lo que demuestra su estrecha relación.

Las modificaciones de las $kdec$ para la simulación de la co-digestión 40/60 también se encuentran entre el intervalo propuesto por Batstone *et al.* (2004) (de 5 - 0.1 d⁻¹). En este caso se utilizó un valor más alto que en las simulaciones previas de 0.95 d⁻¹ para $kdec_{xaa}$, $kdec_{xc4}$, $kdec_{xfa}$, $kdec_{xpro}$, $kdec_{xsu}$ con los efectos observados previamente en la curva simulada y para $kdec_{xac}$ el valor utilizado fue 2 d⁻¹, por la sobreestimación de la biomasa de esta población de consumidores reflejada en los resultados del modelo que ya fue referido. Además de lo anterior, el aumento en las $kdec$ también coincide con el trabajo de Mottet *et al.* (2013) en el que proponen valores más elevados en las tasas de decaimiento (0.04 a 0.10 d⁻¹ en el caso de los consumidores de valerato y butirato y de 0.50 d⁻¹ en el caso de los degradadores de propionato y acetato) en comparación con los valores del ADM1 estándar para residuos de lodos activados con la finalidad de alimentar la fracción correspondiente a la materia lentamente hidrolizable y producir una mayor cantidad de materia orgánica disponible lentamente obteniendo resultados más realistas que los valores utilizados en el ADM1 original.

En esta representación del proceso se observa también el efecto en la producción total del proceso del cambio en las proporciones de sustratos a degradar y es más marcada la influencia del aumento en la proporción de lodo de purga en la reducción en el rendimiento del proceso, por la dificultad para la biodegradación de la materia orgánica

La Figura 5.11 representa el proceso de co-digestión 20/80 simulado con ADM1, con resultados comparables con los valores de producción de CH₄ experimentales. Se observa una producción simulada mayor de CH₄ con respecto al tiempo en el inicio del proceso, el aumento es gradual y se estabiliza por encima del valor experimental. En los datos experimentales, entre los días 1 y 7 se puede notar una disminución en la velocidad de producción en comparación con la simulación. A partir del día 7 los datos experimentales muestran un aumento en la producción de 160.6 a 177.5 mLN CH₄/g SV en el día 8, para luego estabilizarse hasta el final del proceso.

En la co-digestión 20/80 el comportamiento de los datos experimentales en los primeros días del proceso podría deberse a la disminución de la materia rápidamente hidrolizable presente en la FORSU debido a que en esta prueba se usó la menor proporción de las probadas. En este caso al igual que en el anterior no se observan picos de producción de CH₄ durante los primeros días del proceso ni en los posteriores, por el contrario, la producción inicia lentamente y se mantiene en niveles bajos durante el resto de la prueba para estabilizarse a partir del día 8 aproximadamente posiblemente por el bajo contenido de materia orgánica y hacia el final la producción de CH₄ correspondería a la fracción lentamente degradable por lo que la curva se mantiene estable.

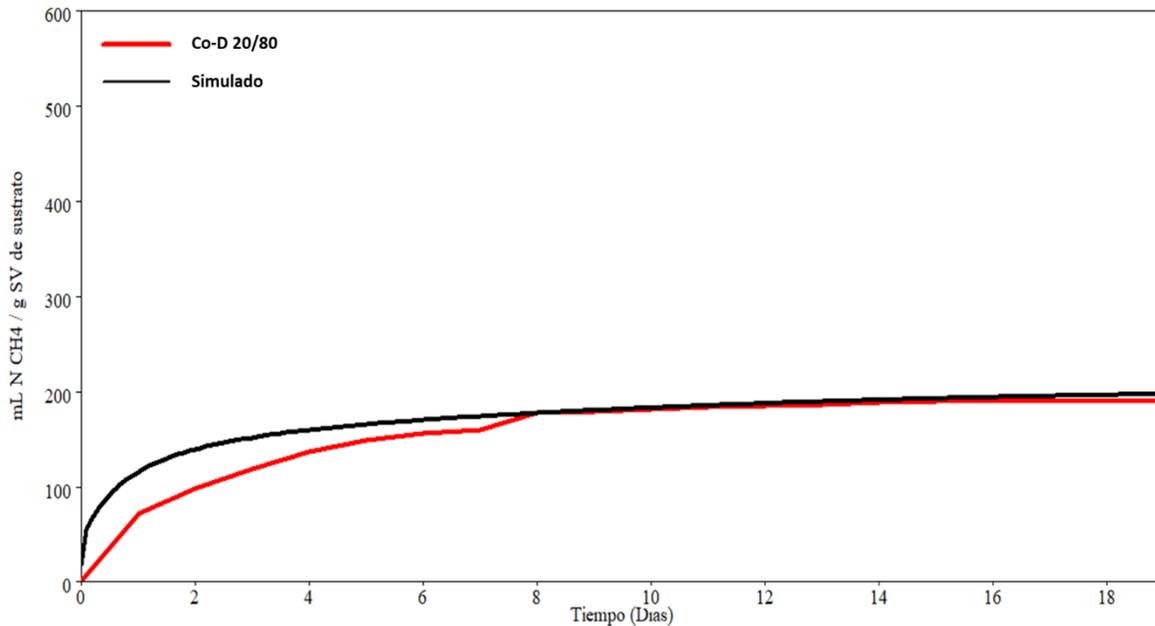


Figura 5.11. Producción de metano calculada para la co-digestión 20/80 comparada con la producción de metano experimental

Las modificaciones se realizaron en la constante de desintegración de partículas complejas ($Kdis$), las constantes de hidrólisis de carbohidratos (Kh_xch), proteínas (Kh_xpr) y lípidos (Kh_xli), las tasas máximas específicas de consumo de monosacáridos (Km_su), aminoácidos (Km_aa), AGCL (Km_fa), valerato y butirato (Km_c4), propionato (Km_pr) y acetato (Km_ac); así como las tasas de decaimiento de consumidores de aminoácidos ($kdec_xaa$), acetato ($kdec_xac$), butirato y valerato ($kdec_xc4$), AGCL ($kdec_xfa$), propionato ($kdec_xpro$) y monosacáridos ($kdec_xsu$).

Como en los casos anteriores el valor de $Kdis$ utilizado para la simulación es menor ($0.12\ d^{-1}$) que el valor original reportado en la literatura de $0.5\ d^{-1}$ propuesto en el modelo ADM1. En las constantes de hidrólisis también se utilizaron valores más bajos ($1.5\ d^{-1}$) que los propuestos originalmente de $10\ d^{-1}$; de igual manera en las tasas máximas específicas de consumo se utilizaron valores inferiores a los originales: para monosacáridos $15\ d^{-1}$ (original $30\ d^{-1}$), aminoácidos $35\ d^{-1}$ (original $50\ d^{-1}$), AGCL $4\ d^{-1}$ (original $6\ d^{-1}$), valerato y butirato $10\ d^{-1}$ (original $20\ d^{-1}$), propionato $9\ d^{-1}$ (original $13\ d^{-1}$) y acetato $5\ d^{-1}$ (original $8\ d^{-1}$). Las tasas de decaimiento de consumidores son iguales para todos los casos ($0.8\ d^{-1}$) con excepción de $kdec_xac$ en la que se utilizó un valor de $0.9\ d^{-1}$ y mayores con respecto al valor original de $0.02\ d^{-1}$. Con estas modificaciones se logra una representación más apegada de la simulación a los datos obtenidos experimentalmente.

La modificación de $kdis$ se debe a los efectos ya descritos, referentes a la velocidad de desintegración de las partículas debido a su tamaño, sin embargo, en comparación con la co-digestión 40/60, este valor cambia por que la proporción de FORSU añadida al reactor es la menor de las usadas en las pruebas, lo que se refleja en el aumento de la velocidad de desintegración de las partículas del reactor.

Para el caso de las constantes de hidrólisis su disminución ocurrió también debido la reducción en la proporción de FORSU añadida en la prueba, debido a la menor cantidad de partículas de materiales hidrolizables de mayor tamaño, así como al aumento en la cantidad de lodo de purga

añadido al reactor, por los efectos descritos anteriormente referentes al aumento de velocidad de hidrólisis en función del tamaño de partícula. De acuerdo con Polizzi *et al.* (2017), los ajustes en la hidrólisis de proteínas, lípidos y carbohidratos, con valores por debajo del ADM1 predeterminado, podrían contrarrestar el efecto general de las constantes de desintegración más altas y permitirían el ajuste de la curva final simulada. Sin embargo, como estos son los primeros pasos de la digestión anaerobia, los valores bajos de estas constantes indicarían que todo el proceso puede estar limitado por la falta de disponibilidad del sustrato.

La tasa máxima de consumo de azúcares (Km_{su}) en este caso también fue reducida como en el caso de la co-digestión 40/60 para evitar una sobreestimación de la producción de CH_4 , ya que se considera que los azúcares producidos, como sustratos intermediarios del proceso (Boubaker y Ridha, 2008; Derbal *et al.*, 2009) son reducidos principalmente por la menor proporción de materia orgánica a degradar presente en la FORSU. Además, otra opción es que la reducción podría deberse posiblemente a la pobre adaptación de los microorganismos para la degradación de azúcares en las primeras etapas del proceso de acuerdo con lo reportado por Schoen *et al.* (2009).

Con respecto a km_{aa} y km_{ac} los valores utilizados podrían estar indicando una descomposición lenta del sustrato como ocurrió en la prueba de co-digestión 40/60, en la que se hacía referencia a lo descrito por Chen *et al.* (2016) por lo que la reducción de estas variables es necesaria para una mejor simulación del proceso. Esto también coincide con lo sugerido por Souza *et al.* (2013) y Montechio *et al.* (2019) en referencia a la reducción de los valores de Km_{ac} y km_{fa} que podría significar una falta de microorganismos consumidores que causa la acumulación de ácido acético, la baja en el pH e inhibición de la metanogénesis.

En referencia a los AGV, debido a la reducción de km_{ac} , como se describió previamente, los valores de Km_{c4} y Km_{pr} también se redujeron a valores similares a los obtenidos por Antonopoulou *et al.* (2012) obteniendo mejores resultados en la simulación de esta prueba.

En la simulación de la co-digestión 20/80, las modificaciones de las $kdec$ se encuentran en el intervalo propuesto por Batstone *et al.* (2004) (de 5 - 0.1 d^{-1}). En este caso, el aumento puede ser atribuido a lo descrito en el trabajo de Mottet *et al.* (2013) en el que se proponen valores más elevados en las tasas de decaimiento comparados con el ADM1 original para residuos de lodos activados con la finalidad de alimentar la fracción correspondiente a la materia lentamente hidrolizable y producir una mayor cantidad de materia orgánica disponible lentamente, obteniendo mejores resultados en la simulación.

En esta simulación del proceso se puede notar de manera más puntual el efecto de la adición de lodo de purga sobre la producción de CH_4 total, reduciendo drásticamente los valores experimentales alcanzados en comparación con las demás co-digestiones probadas debido a la dificultad para su biodegradación, haciendo evidente que el aumento en el rendimiento de biogás se debe a la principalmente al material biodegradable presente en la FORSU, que en este caso es limitada, por lo que el sustrato disponible es mucho menor en volumen y los valores de producción no son comparables con las demás pruebas.

La Figura 5.12 representa el proceso de mono-digestión de lodo de purga simulado con ADM1, este presenta resultados comparables con los valores de producción de CH_4 experimentales. Se observa una producción mayor de CH_4 con respecto al tiempo en el inicio del proceso, el aumento es gradual y se estabiliza por encima del valor experimental. En los datos experimentales, entre los días 1 y 7

se puede notar una disminución en la velocidad de producción en comparación con la simulación. A partir del día 7 la producción experimental aumenta para luego estabilizarse hasta el final del proceso.

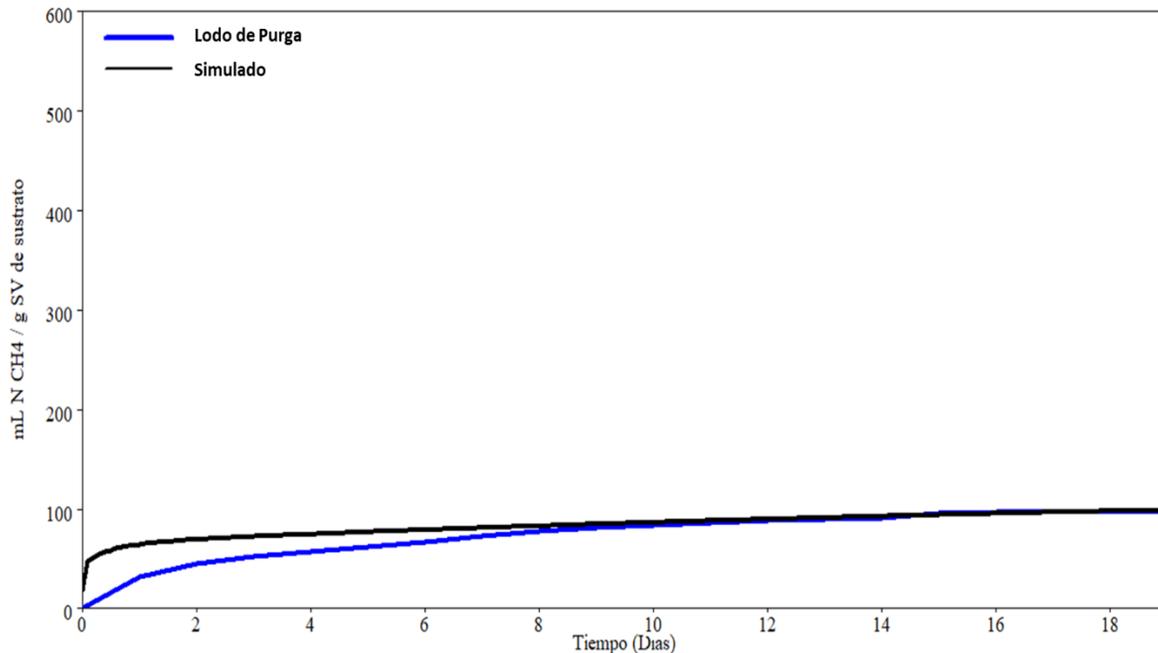


Figura 5.12. Producción de metano calculada a partir de lodo de purga comparada con la producción de metano experimental

En la mono-digestión del lodo de purga el comportamiento de los datos experimentales en los primeros días del proceso podría deberse a un muy bajo o nulo contenido de material rápidamente hidrolizable y no se observan picos de producción de CH₄ durante los primeros días del proceso ni en los posteriores; la producción inicia lentamente y se mantiene en niveles bajos durante el resto de la prueba para estabilizarse a partir del día 8 aproximadamente lo que podría corresponder a la biodegradación de la fracción lentamente degradable por lo que la curva se mantiene estable.

Las modificaciones se realizaron en la constante de desintegración de partículas complejas (K_{dis}), las constantes de hidrólisis de carbohidratos (K_{h_xch}), proteínas (K_{h_xpr}) y lípidos (K_{h_xli}), las tasas máximas específicas de consumo de monosacáridos (K_{m_su}), aminoácidos (K_{m_aa}), AGCL (K_{m_fa}), valerato y butirato (K_{m_c4}), propionato (K_{m_pr}) y acetato (K_{m_ac}); así como las tasas de decaimiento de consumidores de aminoácidos (k_{dec_xaa}), acetato (k_{dec_xac}), butirato y valerato (k_{dec_xc4}), AGCL (k_{dec_xfa}), propionato (k_{dec_xpro}) y monosacáridos (k_{dec_xsu}).

Como en los casos anteriores el valor de K_{dis} utilizado para la simulación es menor (0.05 d^{-1}) que el valor original reportado en la literatura de 0.5 d^{-1} propuesto en el modelo ADM1. En las constantes de hidrólisis también se utilizaron valores más bajos (0.8 d^{-1}) que los propuestos originalmente de 10 d^{-1} ; en las tasas máximas específicas de consumo se utilizaron valores inferiores a los originales: para monosacáridos 4 d^{-1} (original 30 d^{-1}), aminoácidos 20 d^{-1} (original 50 d^{-1}), AGCL 2 d^{-1} (original 6 d^{-1}), valerato y butirato 10 d^{-1} (original 20 d^{-1}), propionato 3 d^{-1} (original 13 d^{-1}) y acetato 2.5 d^{-1} (original 8 d^{-1}). Las tasas de decaimiento de consumidores son iguales para todos los casos (1.8 d^{-1})

con excepción de k_{dec_xac} en la que se utilizó un valor de 2.8 d^{-1} y mayores con respecto al valor original de 0.02 d^{-1} . Con estas modificaciones se logra una representación más apegada de la simulación a los datos obtenidos experimentalmente.

Los residuos del sistema de lodos activados tienen una estructura compleja que incluye varios tipos de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como sustancias SPE, microorganismos y cationes multivalentes. Por lo cual, el acceso a la materia orgánica para los microorganismos anaerobios es variable, lo que implica diferentes tasas de degradación de acuerdo con la accesibilidad de la materia. Por lo tanto, la biodegradabilidad del lodo está estrechamente relacionada con la naturaleza química y la estructura de la materia orgánica, lo que podría tener como consecuencia una modelación de la degradación de partículas difícil (Mottet *et al.*, 2013).

De acuerdo con Astals *et al.* (2013), debido a la fracción de materia orgánica que debe solubilizarse antes de su metanización, la etapa de desintegración/hidrólisis es la etapa limitante del proceso global de digestión anaerobia de lodos de agua residual; e indica que además del tamaño de partícula podría influir también la estructura del material compuesto en la cinética de solubilización y se proponen valores que oscilan entre 0.1 y 0.6 día^{-1} para k_{dis} . En este caso la modificación se encuentre abajo del valor inicial del intervalo reportado en la literatura (0.05 d^{-1}), lo que podría deberse a los efectos descritos previamente, de menor velocidad de desintegración de las partículas en relación a su tamaño además de indicar una mucho menor cantidad de material biodegradable rápidamente en el lodo de purga por lo que los valores se reducen considerablemente. Se ha observado también que el contenido de ST en el reactor tiene un efecto sobre las tasas cinéticas ya que a menor contenido de ST, debido al aumento del contenido de agua y las mejores condiciones de transporte y transferencia de masa, parece factible que los microorganismos estén mejor provistos de sustratos solubles (Polizzi *et al.*, 2017); lo que también podría explicar los valores más bajos en las constantes de desintegración e hidrólisis.

La hidrólisis en la digestión anaerobia de residuos del tratamiento de agua residual en partículas es un proceso muy complejo que incluye la desintegración física de flóculos de lodo, materia orgánica en partículas y biomasa muerta, así como la transformación de los polímeros a monómeros. El proceso puede describirse hidrólisis en dos pasos: colonización bacteriana, donde las bacterias hidrolíticas cubren la superficie de los sólidos y la producción de enzimas en la superficie de la partícula o cerca de esta, lo que permite la producción de monómeros (Mottet *et al.*, 2013).

En el caso de las constantes de hidrólisis su disminución puede deberse como se indicó, a la menor cantidad de material biodegradable rápidamente en el lodo de purga, así como al menor contenido de ST en el reactor, debido al aumento en el volumen de la fracción líquida que propicia mejores condiciones de transporte y transferencia de masa, que provee de sustratos solubles a los microorganismos, por lo que los valores también se reducen considerablemente. Lo que coincide con lo descrito por Polizzi *et al.* (2017), referente a que los valores bajos de estas constantes indicarían que todo el proceso puede estar limitado por la falta de disponibilidad del sustrato.

A manera de ejemplo, se menciona el trabajo de Zaher *et al.* (2009) en el que se reportaron tasas estimadas de hidrólisis de 0.019 , 0.025 , 0.022 d^{-1} , para residuos de estiércol diluido. Las cuales son considerablemente más bajas en comparación con los valores predeterminados de ADM1 (10 d^{-1}). Sin embargo, de acuerdo con sus resultados, las tasas originales ahora se consideran demasiado

grandes al menos por un factor de diez. Indicando en el caso de las tasas bajas que la cantidad de CH₄ producido se debe principalmente a la digestión de la fracción de DQO soluble.

Souza *et al.* (2013), hacen una recopilación de valores de las constantes de hidrólisis, reportando para residuos de lodo activado crudo una k_{dis} de 0.24 d⁻¹, y para la hidrólisis de carbohidratos y proteínas en residuos de lodo activado pre tratado, una kh_{ch} de 0.72 d⁻¹ y kh_{pr} de 1.07 d⁻¹ respectivamente. Además de parámetros de hidrólisis en el intervalo de 0.15-0.25 d⁻¹ en pruebas PBM. Por su parte Derbal *et al.* (2009) informaron un valor estimado mediante pruebas por lotes de 0.3842 d⁻¹ para residuos de lodo activado en co-digestión con residuos orgánicos.

Las tasas máximas de consumo así como las de decaimiento en general fueron reducidas, en estas se puede ver el efecto específico del lodo de purga en el proceso sin la adición de la FORSU como co-sustrato lo que produce los efectos descritos previamente en las variables modificadas, los cuales se hacen más evidentes en el caso de la mono-digestión de lodo de purga, dejando claro que la baja producción de este sustrato y colocando a la FORSU como el principal sustrato aprovechable para los microorganismos del sistema.

Como se mencionó, Km_{su} fue reducida para evitar una sobreestimación de la producción de CH₄, por la menor proporción de materia orgánica a degradar presente en el lodo de purga, por lo que la cantidad de microorganismos que son susceptibles de aprovechar este sustrato también tendrán que reducir su población o de acuerdo con Schoen *et al.* (2009), podría haber una pobre adaptación de estos para el consumo de azúcares en las primeras etapas del proceso. Los valores de km_{aa} y km_{ac} podría indicar una descomposición lenta del sustrato como lo describieron Chen *et al.* (2016) por lo que la reducción de estas variables mejora simulación del proceso. Además, coincide con lo sugerido por Souza *et al.* (2013) y Montechio *et al.* (2019) en referencia a que podría significar una falta de microorganismos consumidores que causa la acumulación de ácido acético, la baja en el pH e inhibición de la metanogénesis, o por la reducción de los sustratos disponibles para su degradación. En referencia a Km_{c4} y Km_{pr} , debido a la reducción de km_{ac} , también se redujeron a valores similares a los obtenidos por Antonopoulou *et al.* (2012) obteniendo mejores resultados en la simulación.

Las modificaciones de las k_{dec} se encuentran para este caso también se encuentran en el intervalo propuesto por Batstone *et al.* (2004) (de 5 - 0.1 d⁻¹). En este caso, como lo describen Mottet *et al.* (2013), el aumento puede ser atribuido a la alimentación de la fracción correspondiente a la materia lentamente hidrolizable y producir una mayor cantidad de materia orgánica disponible lentamente, obteniendo mejores resultados en la simulación, por lo que se proponen valores más elevados en las tasas de decaimiento comparados con el ADM1 original para residuos de lodos activados.

Como lo muestran los resultados de la prueba con el lodo de purga, la composición de la materia orgánica en el sustrato, así como las condiciones de funcionamiento tienen un gran impacto en el rendimiento de la digestión anaerobia (Mottet *et al.*, 2010). En el lodo activado los flóculos se componen de microorganismos, SPE, partículas orgánicas e inorgánicas, los cuales son responsables de su estructura y propiedades, particularmente de las formadoras de gel para las cuales es importante la presencia de cationes. Las SPE corresponden a la fracción más grande del flóculo y las proteínas y polisacáridos son sus principales componentes (Nielsen *et al.*, 2004).

Las proteínas pueden considerarse como un compuesto pobremente biodegradable debido a que se originan a partir de la actividad biológica, necesitan el rompimiento de la estructura del flóculo

y de las células de membrana para estar disponibles para la biomasa anaerobia. Por lo tanto, este fenómeno reduce la degradación de proteínas. Los carbohidratos presentes, son polisacáridos que pueden contribuir a formar una matriz de gel que actúa como cemento para el flóculo de lodo. Estos constituyentes forman la primera capa del flóculo y están más fácilmente disponibles durante el proceso anaerobio (Mottet *et al.*, 2010).

A pesar de su menor importancia en masa, las células bacterianas vivas siguen siendo clave en las propiedades de los lodos. Su patrón de crecimiento afecta al flóculo ya que algunas bacterias pueden moverse y permanecer en este o nadar, otras pueden formar microcolonias estables, y algunas crecen como bacterias filamentosas y, en casos de crecimiento excesivo, causar abultamiento (Nielsen *et al.*, 2004).

Los microorganismos del lodo activado residen en dos clases de SPE, una unida con calcio y magnesio y otra con hierro y aluminio. La digestión anaerobia degrada preferentemente los compuestos unidos a hierro y aluminio y la digestión aerobia los unidos a calcio y magnesio; por lo tanto, la composición influye en su degradabilidad (Menniti *et al.*, 2012). Se sabe también, que la coagulación con iones multivalentes (hierro, aluminio, calcio y magnesio) modifica la accesibilidad de las SPE, influyendo en la digestibilidad del lodo en condiciones aerobias y anaerobias (Spérandio *et al.*, 2013).

Si existieran condiciones de inanición, las comunidades microbianas pueden secretar enzimas líticas que degradan las paredes celulares como respuesta de supervivencia. La baja relación alimento/microorganismos en los sistemas de digestión por lote o con tiempo de retención de lodos largos podría provocar que las enzimas líticas degraden las paredes celulares en las condiciones metabólicas donde se produjeron reduciendo algunas poblaciones de microorganismos (Menniti *et al.*, 2012). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la materia orgánica no biodegradable de los residuos de lodos activados generados a partir de condiciones aerobias, sigue siendo no biodegradable en condiciones anaerobias (Ekama *et al.*, 2007; Mottet *et al.*, 2010).

En la simulación correspondiente al lodo de purga se puede notar que este sustrato por individual no es susceptible de ser biodegradado en las condiciones en las que se desarrolló la prueba ya que, como en los casos anteriores, no se observa el efecto causado por la adición de FORSU como co-sustrato aumentando la producción de CH_4 , lo cual reduce significativamente los valores experimentales alcanzados en comparación con las demás pruebas realizadas en este trabajo debido a la dificultad para su biodegradación, haciendo evidente que el lodo de purga pudiera presentar alguna particularidad en su composición que no ha sido determinada a través de la caracterización inicial lo que impide obtener los resultados esperados en cuanto a la producción de CH_4 así como los efectos sinérgicos deseados en las pruebas de co-digestión.

En el caso de las co-digestiones 40/60, 60/40 y 20/80 en el que el modelo no presenta un ajuste cercano al experimental en la etapa inicial del proceso se considera que esto podría deberse de acuerdo con Polizzi *et al.* (2017) a que el modelo presenta alta sensibilidad a la concentración inicial de biomasa en condiciones controladas. Para lograr esto, se requiere una caracterización adecuada de la biomasa activa, es decir, de la relación real I/S en el modelo, lo cual puede resultar una tarea desafiante para sistemas en lote. Cabe señalar que la fracción referida al inóculo puede variar según las condiciones operativas, la aclimatación de la biomasa o la afinidad con un sustrato dado.

Esto indica que el modelo calcula la producción de biogás a partir de la concentración total de DQO inicial, así como de la composición del inóculo utilizado, sin tomar en cuenta que existen diferencias en la composición de los sustratos. Por este motivo, es posible que en el caso de las co-digestiones antes mencionadas, por el contenido en mayor cantidad de compuestos de difícil degradación o recalcitrantes debido a la mayor proporción de lodo de purga, esto resulte en una velocidad de degradación más lenta en comparación con las pruebas con un mayor contenido de FORSU, esto implica una menor cantidad de sustrato disponible para los grupos de consumidores considerados en el inóculo, por lo que las curvas de producción experimentales tienen un comportamiento distinto al de la simulación en ADM1.

Girault *et al.*, (2011) reportan un efecto similar de sobreestimación significativa de la degradación de DQO en el digestor realizada por el modelo, que aumentó de la tasa de producción de metano, por lo que recomiendan la necesidad de ajuste de los parámetros de ADM1 de acuerdo con el sustrato utilizado.

Polizzi *et al.* (2017) sugieren una dependencia real de la cinética de desintegración en la relación I/S, para sustratos sólidos complejos, por lo que una alternativa para disminuir las diferencias observadas entre los resultados de la simulación y los del modelo podría ser la diferenciación de la variable Xc (material complejo) en Xc_rápida y Xc_lenta para tener una mejor precisión en los cálculos del modelo y así evitar la sobreestimación de la tasa de producción de metano cuando las condiciones del sustrato así lo requieran de acuerdo con su origen y composición.

Con el objetivo de compilar la información sobre los resultados de producción de biogás generada en la etapa experimental, así como los obtenidos a través de la aplicación del modelo ADM1 en AQUASIM 2.0, en la Tabla 5.10 se muestran los valores obtenidos en ambos casos el día en el que finalizó el proceso de digestión anaerobia para cada una de las pruebas realizadas, lo que permite visualizar la aproximación entre estos y el modelo con respecto al valor final.

Tabla 5.10 Valores de producción obtenidos experimentalmente y valores calculados por el modelo al tiempo de finalización del proceso de co-digestión anaerobia

Prueba	Día	Valor experimental (mLN CH ₄ /g SV)	Valor del modelo (mLN CH ₄ /g SV)	Desviación (%)
FORSU	11	481.8	484.1	0.5
80/20	19	483.7	494	2
60/40	12	375.4	387.9	3
40/60	7	231	228.2	1
20/80	15	180.2	191.8	6
Lodo de Purga	16	87.4	94.52	8

De acuerdo con la Tabla 5.10, los porcentajes de desviación simulados presentan poca diferencia en relación con los valores experimentales de producción de CH₄. En el caso de la mono-digestión de FORSU se encuentra la menor desviación con 0.5 %, por el contrario, la mono-digestión de lodo de purga presenta la mayor desviación de todas las pruebas con el 8%. Las co-digestiones presentaron desviaciones menores a la del lodo de purga que se reducen a medida que aumenta la

proporción de FORSU; la 20/80 con 6 %, la 60/40 con 3 % y la 80/20 con 2 %, la excepción se presenta en la co-digestión 40/60 que presenta 1% de desviación.

Para establecer si las medias de los resultados obtenidos experimentalmente difieren de los valores calculados por el modelo, se realizó una prueba ANOVA de un factor y se determinó que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos a partir de estos dos métodos.

En referencia a la relación de la comunidad microbiana presente en el inóculo con el proceso de calibración y modelación de la producción de biogás Ramirez *et al.* (2009) mencionan que ADM1 no distingue entre los microorganismos que realizan la misma reacción, lo que implica que el modelo supone que todos los organismos tienen las mismas propiedades, y por lo tanto no puede representar o predecir adecuadamente los resultados experimentales con respecto a este tipo de diversidad entre especies. Por lo que existe la necesidad de incorporar datos detallados a microescala en sobre la comunidad microbiana y sus propiedades. En ADM1, una población microbiana está asociada a cada reacción. A cada uno de los siete grupos funcionales de microorganismos se asocia una población con una reacción y el número de especies por reacción es arbitrario. Dentro de cada grupo funcional, las especies pueden diferir en términos de su coeficiente de rendimiento, así como en la tasa máxima específica de consumo (K_m) y la constante de saturación media (K_s). Por lo tanto, es necesaria una comunidad microbiana mayor que la original para que esta variabilidad permita una mayor resistencia a las condiciones del entorno, por ejemplo, menor acumulación de AGV y DQO, y con ello un mejor rendimiento del proceso. Un modelo más apegado a la naturaleza, composición y distribución de la comunidad microbiana puede permitir explicar cómo la diversidad de los organismos podría variar con las condiciones ambientales y dado que el tipo de microorganismos presentes en un reactor define su rendimiento operativo, esta información puede ser de suma importancia. Al respecto Zhao *et al.* (2019) mencionan que ADM1 ignora los cambios en la actividad microbiana en respuesta a los cambios ambientales relacionados con la tasa máxima específica de absorción (K_m) y la constante de saturación media (K_s) y simplemente realiza cálculos numéricos mecánicos, por lo que es importante incorporar las influencias de un entorno cambiante en la actividad microbiana para hacer una representación más precisa del proceso. Rabii *et al.* (2019) sugieren que el monitoreo de los cambios cualitativos y cuantitativos en la estructura comunitaria microbiana permitiría evaluar la influencia de la adición de un co-sustrato en las poblaciones microbianas que contribuyen a la producción de biogás. Sin embargo, no se ha evaluado cómo el cambio de algunos parámetros (relación de mezcla, TRH, temperatura y C/N) influyen en la población microbiana y la producción de metano en la co-digestión y hay pocos estudios disponibles en la literatura.

A partir de lo anterior se puede mencionar que, en relación con los resultados de identificación de microorganismos y el proceso de calibración y modelación, el modelo original utiliza algunas proporciones definidas para cada uno de los 7 grupos de organismos consumidores en las diferentes etapas del proceso, entre estas, la que corresponde a los organismos metanogénicos (consumidores de acetato e hidrógeno) es notoria ya que es la mayor con respecto a las demás, especialmente la de los organismos acetogénicos y se puede considerar que esto tendría relación con los organismos identificados en este trabajo ya que también las arqueas metanogénicas fueron las especies que presentaron un mayor número con respecto al total de las identificadas y las acetogénicas del género *Methanosaeta* también tuvieron una mayor cantidad de especies. Por lo tanto, los principales efectos observados en la calibración del modelo se presentaron al realizar las modificaciones en las variables relacionadas con las tasas específicas de consumo y decaimiento de

la biomasa de estos organismos, así como algunas otras relacionados con estas. Sin embargo, a partir de lo reportado en la literatura se puede inferir que es necesario ampliar la información obtenida con respecto a las especies de organismos presentes en el proceso, especialmente en el inóculo, así como el conocimiento de los efectos causados por las condiciones operativas sobre las comunidades microbianas para poder obtener un resultado que represente de manera más acertada el proceso de digestión anaerobia.

Finalmente es importante mencionar, de acuerdo con Xu *et al.* (2015), que el modelado matemático es siempre un ejercicio dirigido por objetivos. En general, los más comunes son: comprender el comportamiento del sistema y las interacciones de los componentes; verificar cuantitativamente una hipótesis; y predecir el comportamiento del sistema en el futuro o en circunstancias similares.

En este sentido, los modelos representan una forma efectiva de predecir y optimizar el diseño y la operación del proceso de co-digestión anaerobia y formalizar el conocimiento disponible. Además, mejoran la comprensión del sistema, facilitan la formulación y validación de hipótesis, reduciendo los costos, el riesgo de falla y el tiempo de operación del proceso (Kouas *et al.*, 2018).

Entre las aplicaciones típicas en la industria, el trabajo de simulación permite obtener conclusiones en poco tiempo con costos mínimos, lo que representa beneficios directos a través de la toma de decisiones que eviten la realización de proyectos con poca posibilidad de éxito. También genera una mejor comprensión de los procesos en reactores a gran escala, así como una correcta evaluación de posibles impactos en modificaciones operativas (Batstone y Keller, 2003). Los modelos dinámicos puede ser una herramienta útil para la predicción del rendimiento del proceso y sus condiciones de trabajo óptimas (Manjusha y Beevi, 2016).

En particular el modelo ADM1 ha demostrado ser una herramienta poderosa para la simulación del comportamiento dinámico en digestores anaerobios que tratan el lodo de las aguas residuales en condiciones mesofílicas (Mendes, *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Sin embargo, es importante señalar que se encuentra relativamente limitado en la simulación de algunos procesos complejos ya que no puede reproducir las variaciones íntimas de los diferentes parámetros, no obstante, se exhibe una tendencia promedio de éstos. Esta situación puede explicarse por el hecho de que no todos los parámetros cinéticos de entrada pueden ser obtenidos mediante análisis de laboratorio, sino que son extraídos de la literatura (Derbal, *et al.*, 2009).

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en las diferentes etapas del proceso se pueden establecer las siguientes conclusiones:

La caracterización de los sustratos e inóculo permite obtener la información necesaria para establecer las porciones que se utilizan para la aplicación de las pruebas de PBM en el equipo AMPTS II, especialmente los parámetros referentes a ST, SV y SF, también proporcionan una perspectiva general del comportamiento esperado en el proceso de digestión anaerobia a partir de sus componentes fisicoquímicos y por medio de estos se puede llevar a cabo la estimación de las fracciones de material biodegradable en el proceso de modelación. Los resultados de la caracterización en general, son comparables con lo reportado en la literatura para sustratos similares.

Al respecto de las pruebas de mono-digestión y co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga, los valores de producción de CH₄ obtenidos experimentalmente se encuentran dentro de los valores teóricos calculados, reduciendo gradualmente desde 3% hasta 81% en relación con la producción teórica a medida que el contenido de lodo de purga aumenta en cada una de las mezclas de co-digestión probadas.

A partir de los resultados de producción, se hace evidente que la co-digestión 80/20 obtuvo la mayor producción de CH₄ de todas las mezclas probadas, y también fue superior a la prueba de FORSU por individual. Además, es notoria la escasa producción de CH₄ con respecto a lo esperado a partir del lodo de purga y el efecto provocado en cada una de las pruebas a medida que su proporción aumenta en el reactor. Las diferencias en la producción de CH₄ se deben posiblemente a las proporciones de material fácilmente degradable contenido en los sustratos como carbohidratos, proteínas y lípidos típicos en el caso de la FORSU, y proteínas o compuestos más complejos como las sustancias poliméricas extracelulares presentes principalmente en el lodo de purga, además de elementos o compuestos no determinados en su composición a través de la caracterización fisicoquímica inicial.

Con base en el método propuesto por Nielfa, *et al.* (2015) se determinó que ninguna de las mezclas de co-digestión presenta efectos sinérgicos entre los sustratos probados. La mezcla 80/20 indica que los sustratos funcionan de modo independiente y en las restantes se presenta un efecto competitivo entre sustratos. Resultados similares a los obtenidos en las pruebas de co-digestión han sido reportados previamente en la literatura (Dai, *et al.*, 2013; Koch *et al.*, 2015; Liu, *et al.*, 2016; Gu, *et al.*, 2020).

Con la prueba ANOVA de un factor se determinó que, con respecto a la producción de CH₄, en el caso de la FORSU y lodo de purga comparados por individual, existe una diferencia significativa entre estos; para la FORSU comparada con las mezclas de co-digestión, las pruebas indican que no existe diferencia significativa entre la FORSU y la co-digestión 80/20, sin embargo, las mezclas de co-digestión 60/40, 40/60 y 20/80 todas presentan una diferencia significativa; en el caso del lodo de purga todas las mezclas de co-digestión difieren con respecto al sustrato por individual.

Por medio de técnicas proteómicas fue posible identificar un total de 24 especies diferentes de microorganismos presentes en los sustratos e inóculo utilizados en este trabajo. Con los datos

obtenidos no es posible establecer una relación directa entre el total de especies identificadas y las poblaciones de organismos consumidores de sustratos de las diferentes etapas del proceso que se consideran en la modelación a través de ADM1. Sin embargo, de manera general se pueden reconocer claramente algunos grupos de microorganismos, predominando los metanogénicos con la mayor cantidad de especies identificadas tanto al inicio del proceso como al final, encontrándose un total 11. Destacan también los organismos característicos del tratamiento de las aguas residuales que se identificaron en las muestras de lodo de purga y lodo anaerobio con 5 especies, así como los agrupados específicamente como participantes activos de los procesos de hidrólisis y acidogénesis con 5 especies. Se presentaron también 2 especies de microorganismos patógenos en la FORSU al inicio del proceso. Además de éstas se encontró también un microorganismo metanótrofo.

Se llevó a cabo la representación de la producción de CH_4 de la mono-digestión y co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga realizado experimentalmente. De forma deductiva, a partir de la representación, se pudo obtener información referente a los efectos producidos por las constantes de desintegración de partículas complejas (K_{dis}) e hidrólisis (K_h), así como de las tasas de máximas específicas de consumo (K_m) y las tasas de decaimiento de consumidores (k_{dec}) de los diferentes grupos de microorganismos involucrados en el proceso. Resulta de importancia el efecto provocado por el tamaño de las partículas añadidas al sistema reflejado en la reducción de las tasas de desintegración e hidrólisis en general, así como los de la reducción en las poblaciones de los microorganismos consumidores de sustratos a medida que la proporción de FORSU en el sistema era reducida; además del aumento en las tasas de decaimiento de consumidores, especialmente acetato, a medida que la producción de CH_4 decrecía en cada una de las pruebas. El resultado de la calibración con los valores establecidos para estos sustratos puede ser utilizada como referente para futuras aplicaciones con los mismos sustratos e inóculo.

Con las simulaciones del proceso en ADM1 a través de AQUASIM 2.0 se obtuvieron valores de producción de CH_4 cercanos a los experimentales con porcentajes de desviación que van del 0.5 al 8%. En el caso de la mono-digestión de FORSU la desviación corresponde al 0.5 %, por el contrario, la mono-digestión de lodo de purga presenta la mayor desviación de todas las pruebas con el 8%. Las co-digestiones presentaron desviaciones que se reducen a medida que aumenta la proporción de FORSU; la 20/80 con 6 %, la 60/40 con 3 % y la 80/20 con 2 %, la excepción se presenta en la co-digestión 40/60 con 1% de desviación.

A partir de la prueba ANOVA de un factor se determinó que no existe diferencia significativa entre las medias de los resultados obtenidos experimentalmente y por medio de la simulación con el modelo ADM1 a través de AQUASIM 2.0.

7. RECOMENDACIONES

En futuros trabajos sobre co-digestión anaerobia de FORSU y lodo de purga de agua residual se pueden considerar las siguientes recomendaciones.

Complementar la caracterización fisicoquímica de los sustratos con análisis que permitan determinar su composición elemental para poder llevar a cabo cálculos más precisos sobre la producción de metano estimada, así como análisis para determinar la presencia de metales pesados específicamente en los lodos de purga, los cuales podrían causar efectos adversos en el desarrollo de las pruebas.

Determinar la composición del biogás producido durante el proceso de co-digestión a través de las técnicas disponibles en el laboratorio de investigación con la finalidad de conocer los porcentajes de sus principales componentes.

En el caso de la identificación de los microorganismos, esta puede ser complementada o sustituida con técnicas genómicas que proporcionen información más precisa sobre la totalidad de las especies de organismos presentes en las muestras a analizar, así como de sus índices de diversidad y abundancia.

En relación con la aplicación del modelo ADM1, se recomienda realizar la separación de los componentes del sustrato inicial para considerar las fracciones de material rápidamente degradable y lentamente degradable en caso de ser necesario y ampliar la identificación de microorganismos como se sugirió anteriormente para obtener mejores resultados en el proceso. Si es posible, llevar a cabo el análisis y comprobación a nivel laboratorio de los efectos producidos por las modificaciones realizadas a las constantes utilizadas para la calibración con los sustratos objeto de este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abou-Zeid, D. M., Biebl, H., Spröer, C., & Müller, R. J. (2004). *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-positive, spore-forming anaerobe that produces propionic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 951–954. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03054-0>.
2. Adams, V., Han, X., Lyras, D., & Rood, J. I. (2018). Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*, 99(June), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.002>.
3. Ai, S., Liu, H., Wu, M., Zeng, G., & Yang, C. (2018). Roles of acid-producing bacteria in anaerobic digestion of waste activated sludge. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 12(6). <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1050-y>.
4. Aichinger P., Wadhawan T., Kuprian M., Higgins M., Ebner C., Fimml C., Murthy S., & Wett B. (2015). Synergistic Co-Digestion of Solid-Organic-Waste and Municipal-Sewage-Sludge: 1 Plus 1 Equals More than 2 in Terms of Biogas Production and Solids Reduction, *Water Research*, 87, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.033>.
5. Ali, H., Scanlan, J., Dumont, M. G., & Murrell, J. C. (2006). Duplication of the *mmoX* gene in *Methylosinus sporium*: Cloning, sequencing and mutational analysis. *Microbiology*, 152(10), 2931–2942. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29031-0>.
6. Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Management*, 36, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>.
7. Andrews J. (1969). Dynamic model of the anaerobic digestion model; Proceedings of the American Society of Civil Engineers. *Journal of the Sanitary Engineering Division*. Vol. 1. pp. 95–116.
8. Andrews J., Graef, S. (1971). Dynamic modeling and simulation of the anaerobic digestion process. *Advances in Chemistry Series*. 126–162. <https://doi.org/10.1021/ba-1971-0105.ch008>.
9. Angelidaki, I., Ellegaard, L., & Ahring, B. K. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: Focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(2), 159–166. <https://doi.org/10.1002/bit.260420203>.
10. Angelidaki, I., Ellegaard, L., & Ahring, B. K. (1999). A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(3), 363–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990505\)63:3<363::AID-BIT13>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<363::AID-BIT13>3.0.CO;2-Z).
11. Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & 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. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>.
12. Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Lyberatos, G. (2012 a). ADM1-based modeling of methane production from acidified sweet sorghum extract in a two stage process. *Bioresource Technology*, 106(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.088>.
13. Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Lyberatos, G. (2012 b). Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 191–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.081>.

14. Appels, L., Lauwers, J., Degreve, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Van Impe, J., & Dewil, R. (2011). Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(9), 4295–4301. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.121>.
15. Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., & Lens, P. N. L. (2014). Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy*, *123*, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.035>.
16. Arnell, M., Astals, S., Åmand, L., Batstone, D. J., Jensen, P. D., & Jeppsson, U. (2016). Modelling anaerobic co-digestion in Benchmark Simulation Model No. 2: Parameter estimation, substrate characterisation and plant-wide integration. *Water Research*, *98*, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.070>.
17. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their applications. *Journal of Chromatographic Science*, *55*(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.
18. Astals, S., Esteban-Gutiérrez, M., Fernández-Arévalo, T., Aymerich, E., García-Heras, J. L., & Mata-Alvarez, J. (2013). Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A biodegradability and modelling study. *Water Research*, *47*(16), 6033–6043. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.019>.
19. Astals, S., Batstone, D. J., Mata-Alvarez, J., & Jensen, P. D. (2014). Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. *Bioresource Technology*, *169*, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.024>.
20. Astals, S., Musenze, R. S., Bai, X., Tannock, S., Tait, S., Pratt, S., & Jensen, P. D. (2015). Anaerobic co-digestion of pig manure and algae: Impact of intracellular algal products recovery on co-digestion performance. *Bioresource Technology*, *181*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.039>.
21. Batstone D., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S., Pavlostathis S., Rozzi A., Sanders W., Siegrist H., & Vavilin V. (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, *45*(10), 65–73. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0292>.
22. Batstone, D. J., & Keller, J. (2003). Industrial applications of the IWA anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, *47*(12), 199–206. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0647>.
23. Batstone, D. J., Keller, J., & Blackall, L. L. (2004). The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Research*, *38*(6), 1390–1404. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.003>.
24. Batstone, D. J. (2006). Mathematical modelling of anaerobic reactors treating domestic wastewater: Rational criteria for model use. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *5*(1), 57–71. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-7191-z>.
25. Bernatchez, S., Anoop, V., Saikali, Z., & Breton, M. (2018). A microbial identification framework for risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, *116*(September 2017), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.040>.
26. Bonk, F., Popp, D., Weinrich, S., Sträuber, H., Becker, D., Kleinstüber, S., Harms, H., & Centler, F. (2019). Determination of microbial maintenance in acetogenesis and methanogenesis by experimental and modeling techniques. *Frontiers in Microbiology*, *10*(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00166>

27. Boone, D. R., & Mah, R. A. (2015). Methanosarcina. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 266(c), 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00519>.
28. Borrel, G., Harris, H. M. B., Tottey, W., Mihajlovski, A., Parisot, N., Peyretailade, E., Peyret, P., Gribaldo, S., O'Toole, P. W., & Brugère, J. F. (2012). Genome sequence of “candidatus methanomethylophilus alvus” Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6940–6941. <https://doi.org/10.1128/JB.01867-12>.
29. Boubaker, F., & Ridha, B. C. (2008). Modelling of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste using anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Bioresource Technology*, 99(14), 6565–6577. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.035>.
30. Bowman, J. P. (2015). Methylosinus. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00833>.
31. Bozinis, N. A., Alexiou, I. E., & Pistikopoulos, E. N. (1996). A mathematical model for the optimal design and operation of an anaerobic co-digestion plant. *Water Science and Technology*, 34(5-6-6 pt 3), 383–391. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00669-5](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00669-5).
32. Bräuer, S., Cadillo-Quiroz, H., Kyrpides, N., Woyke, T., Goodwin, L., Detter, C., Podell, S., Yavitt, J. B., & Zinder, S. H. (2015). Genome of Methanoregula boonei 6A8 reveals adaptations to oligotrophic peatland environments. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(8), 1572–1581. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000117>.
33. Brewis, I., & Brennan, P. (2010). Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 80(10), 1–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381264-3.00001-1>.
34. Brumm, P. J., Land, M. L., & Mead, D. A. (2015). Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0031-z>.
35. Bułkowska, K., Białobrzewski, I., Gusiatin, Z. M., Klimiuk, E., & Pokój, T. (2015). ADM1-based modeling of anaerobic codigestion of maize silage and cattle manure - Calibration of parameters and model verification (part II). *Archives of Environmental Protection*, 41(3), 20–27. <https://doi.org/10.1515/aep-2015-0027>.
36. Cadillo-Quiroz, H., Yavitt, J. B., & Zinder, S. H. (2009). *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(5), 928–935. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.006890-0>.
37. Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S. L., Goodson, N., Yavitt, J. B., & Zinder, S. H. (2014). *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 5), 1473–1480. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.059964-0>.
38. Cadillo-Quiroz, H., Browne, P., Kyrpides, N., Woyke, T., Goodwin, L., Detter, C., Yavitt, J. B., & Zinder, S. H. (2015). Complete genome sequence of *Methanosphaerula palustris* E1-9CT, a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. *Genome Announcements*, 3(6), 6–7. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01280-15>.
39. Campuzano R. (2015). Lixiviación de residuos sólidos orgánicos urbanos para incrementar la rapidez de producción de biogás. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

40. Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2015). Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase methane production. *Bioresource Technology*, *178*, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.042>.
41. Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2016). Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, *54*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>.
42. Cardona, L., Levrard, C., Guenne, A., Chapleur, O., & Mazéas, L. (2019). Co-digestion of wastewater sludge: Choosing the optimal blend. *Waste Management*, *87*, 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.016>.
43. Carrera-Chapela, F., Donoso-Bravo, A., Jeison, D., Díaz, I., Gonzalez, J. A., & Ruiz-Filippi, G. (2016). Development, identification and validation of a mathematical model of anaerobic digestion of sewage sludge focusing on H₂S formation and transfer. *Biochemical Engineering Journal*, *112*, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.008>.
44. Chatterjee, B., & Mazumder, D. (2019). Role of stage-separation in the ubiquitous development of Anaerobic Digestion of Organic Fraction of Municipal Solid Waste: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *104*(January), 439–469. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.026>.
45. Chatterjee, A., DeLorenzo, D. M., Carr, R., & Moon, T. S. (2020). Bioconversion of renewable feedstocks by *Rhodococcus opacus*. *Current Opinion in Biotechnology*, *64*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.013>.
46. Chellapandi, P., Bharathi, M., Sangavai, C., & Prathiviraj, R. (2018). Methanobacterium formicum as a target rumen methanogen for the development of new methane mitigation interventions: A review. *Veterinary and Animal Science*, *6*(September), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.09.001>.
47. Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, *99*(10), 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>.
48. Chen, X., Chen, Z., Wang, X., Huo, C., Hu, Z., Xiao, B., & Hu, M. (2016). Application of ADM1 for modeling of biogas production from anaerobic digestion of *Hydrilla verticillata*. *Bioresource Technology*, *211*, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.002>.
49. Ciešlik, B. M., Namiešnik, J., & Konieczka, P. (2015). Review of sewage sludge management: Standards, regulations and analytical methods. *Journal of Cleaner Production*, *90*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.11.031>.
50. Cook, S. M., Skerlos, S. J., Raskin, L., & Love, N. G. (2017). A stability assessment tool for anaerobic codigestion. *Water Research*, *112*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.027>.
51. Córdova A., Carrera C., Zepeda A., Ruiz J. (2019). Enhancing the performance and stability of the anaerobic digestion of sewage sludge by zero valent iron nanoparticles dosage. *Bioresource Technology*, *275*(December 2018), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.086>.
52. Corstjens, P., & Muyzer, G. (1993). Phylogenetic Analysis of the Metal-Oxidizing Bacteria *Leptothrix discophora* and *Sphaerotilus natans* Using 16S rDNA Sequencing Data. *Systematic and Applied Microbiology*, *16*(2), 219–223. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80471-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80471-6).
53. Costello, D. J., Greenfield, P. F., & Lee, P. L. (1991). Dynamic modelling of a single-stage high-rate anaerobic reactor-I. Model derivation. *Water Research*, *25*(7), 847–858. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90166-N](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90166-N).

54. Da Ros, C., Cavinato, C., Cecchi, F., & Bolzonella, D. (2014). Anaerobic co-digestion of winery waste and waste activated sludge: Assessment of process feasibility. *Water Science and Technology*, 69(2), 269–277. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.692>.
55. Dai, X., Duan, N., Dong, B., & Dai, L. (2013). High-solids anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste in comparison with mono digestions: Stability and performance. *Waste Management*, 33(2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.10.018>.
56. De Leon, E. (2018). Microbial ecology of industrial activated sludge process: linking functional diversity to system performance. Dissertation. Fakultät für Ingenieurwissenschaften. Universität Duisburg-Essen.
57. Derbal, K., Bencheikh-lehocine, M., Cecchi, F., Meniai, A. H., & Pavan, P. (2009). Application of the IWA ADM1 model to simulate anaerobic co-digestion of organic waste with waste activated sludge in mesophilic condition. *Bioresource Technology*, 100(4), 1539–1543. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.064>.
58. Dereli, R. K., Ersahin, M. E., Ozturk, I., & Aydin, A. F. (2010). Applicability of Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) for a specific industrial wastewater: Opium alkaloid effluents. *Chemical Engineering Journal*, 165(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.069>.
59. Dewil, R., Lauwers, J., Appels, L., Gins, G., Degreève, J., & Van Impe, J. (2011). Anaerobic digestion of biomass and waste: Current trends in mathematical modeling. In IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline) (Vol. 44, Issue 1 PART 1). IFAC. <https://doi.org/10.3182/20110828-6-IT-1002.03208>.
60. Diario Oficial de la Federación (1985). Norma Mexicana NMX-AA-015-1985, Protección al Ambiente. Contaminación del Suelo. Residuos Sólidos Municipales. Muestreo. Método de Cuarteo.
61. Diario Oficial de la Federación (2003). Norma Oficial Mexicana. NOM-004-SEMARNAT-2002. Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.
62. DiLallo R., Albertson O. (1961). Volatile Acids by Direct Titration. Water Pollution Control Federation. Vol. 33. No. 4. pp. 356-365.
63. Di Maria F. (2017). The Recovery of Energy and Materials From Food Waste by Codigestion with Sludge: Internal Environment of Digester and Methanogenic Pathway. In *Food Bioconversion*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811413-1/00003-6>.
64. Di Maria, F., & Barratta, M. (2015). Boosting methane generation by co-digestion of sludge with fruit and vegetable waste: Internal environment of digester and methanogenic pathway. *Waste Management*, 43, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.007>.
65. Dimock, R., & Morgenroth, E. (2006). The influence of particle size on microbial hydrolysis of protein particles in activated sludge. *Water Research*, 40(10), 2064–2074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.03.011>.
66. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P.; Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.*, 28 (3), 350–356. DOI 10.1021/ac60111a017.
67. Durán A., Casas D., Rojas U. Vázquez G., Roa M. y Alcántara R. (2014). Fundamentos de Digestión anaerobia de Residuos Sólidos Orgánicos. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

68. Ekama, G. A., Sötemann, S. W., & Wentzel, M. C. (2007). Biodegradability of activated sludge organics under anaerobic conditions. *Water Research*, 41(1), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.014>.
69. Esposito, G., Frunzo, L., Panico, A., & Pirozzi, F. (2011 a). Model calibration and validation for OFMSW and sewage sludge co-digestion reactors. *Waste Management*, 31(12), 2527–2535. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.07.024>.
70. Esposito, G., Frunzo, L., Panico, A., & Pirozzi, F. (2011 b). Modelling the effect of the OLR and OFMSW particle size on the performances of an anaerobic co-digestion reactor. *Process Biochemistry*, 46(2), 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.010>.
71. Esteban, M. (2014). Co-digestión anaerobia de lodo de EDAR con residuos orgánicos de diferente naturaleza: combinación de técnicas experimentales y herramientas matemáticas. Memoria Doctoral. Escuela Superior de Ingenieros Industriales. Universidad de Navarra. España.
72. European Commission. (2001). Disposal and recycling routes for sewage sludge—Part 3: scientific and technical report. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
73. Fang, F., Ni, B. J., & Yu, H. Q. (2009). Estimating the kinetic parameters of activated sludge storage using weighted non-linear least-squares and accelerating genetic algorithm. *Water Research*, 43(10), 2595–2604. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.002>.
74. Feng, S., Hou, S., Huang, X., Fang, Z., Tong, Y., & Yang, H. (2019). Insights into the microbial community structure of anaerobic digestion of municipal solid waste landfill leachate for methane production by adaptive thermophilic granular sludge. *Electronic Journal of Biotechnology*, 39, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.04.001>.
75. Fernández Rodríguez, J., Pérez, M., & Romero, L. I. (2012). Mesophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Optimisation of the semicontinuous process. *Chemical Engineering Journal*, 193–194, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.018>.
76. Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., & Romero, L. I. (2013). Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis. *Chemical Engineering Journal*, 232, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.066>.
77. Fischer, M. A., Güllert, S., Refai, S., Künzel, S., Deppenmeier, U., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2019). Long-term investigation of microbial community composition and transcription patterns in a biogas plant undergoing ammonia crisis. *Microbial Biotechnology*, 12(2), 305–323. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13313>.
78. Fitamo, T., Treu, L., Boldrin, A., Sartori, C., Angelidaki, I., & Scheutz, C. (2017). Microbial population dynamics in urban organic waste anaerobic co-digestion with mixed sludge during a change in feedstock composition and different hydraulic retention times. *Water Research*, 118, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.012>.
79. Food and Agriculture Organization (FAO). (2011). Manual de Biogás. Santiago de Chile.
80. Galí, A., Benabdallah, T., Astals, S., & Mata-Alvarez, J. (2009). Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresource Technology*, 100(11), 2783–2790. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.052>.
81. García-Gen, S., Lema, J. M., & Rodríguez, J. (2013). Generalised modelling approach for anaerobic co-digestion of fermentable substrates. *Bioresource Technology*, 147, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.063>.
82. García-Gen, S., Sousbie, P., Rangaraj, G., Lema, J. M., Rodríguez, J., Steyer, J. P., & Torrijos, M. (2015). Kinetic modelling of anaerobic hydrolysis of solid wastes, including disintegration processes. *Waste Management*, 35(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.10.012>.

83. Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Bozinis, N. A., & Lyberatos, G. (1996). Anaerobic codigestion of agricultural industries' wastewaters. *Water Science and Technology*, 34(11 pt 7), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00822-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00822-0).
84. Gerardi M. (2003). *The microbiology of anaerobic digesters*. Wiley-Interscience. United States of America.
85. Gil, A., Siles, J. A., Martín, M. A., Chica, A. F., Estévez-Pastor, F. S., & Toro-Baptista, E. (2018). Effect of microwave pretreatment on semi-continuous anaerobic digestion of sewage sludge. *Renewable Energy*, 115, 917–925. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.112>.
86. Girault, R., Rousseau, P., Steyer, J. P., Bernet, N., & Béline, F. (2011). Combination of batch experiments with continuous reactor data for ADM1 calibration: Application to anaerobic digestion of pig slurry. *Water Science and Technology*, 63(11), 2575–2582. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.594>.
87. Göker, M., Teshima, H., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J. F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Huntemann, M., Liolios, K., Ivanova, N., Pagani, I., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., ... Klenk, H. P. (2011). Complete genome sequence of the acetate-degrading sulfate reducer *Desulfohalobaculum acetoxidans* type strain (ASRB2 T). *Standards in Genomic Sciences*, 4(3), 393–401. <https://doi.org/10.4056/sigs.2064705>.
88. Gonzalez-Martinez, A., Rodriguez-Sanchez, A., Lotti, T., Garcia-Ruiz, M. J., Osorio, F., Gonzalez-Lopez, J., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2016). Comparison of bacterial communities of conventional and A-stage activated sludge systems. *Scientific Reports*, 6(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep18786>.
89. Gosset J., Belsler R. (1982). Anaerobic digestion of waste activated sludge. *Journal of Environmental Engineering*. Vol. 108. pp. 1101-1120.
90. Gray N.F. (2005). *Water technology: An introduction for environmental scientists and engineers*. Second edition. Elsevier Ltd.
91. Grosser, A., Neczaj, E., Singh, B. R., Almås, Å. R., Brattebø, H., & Kacprzak, M. (2017). Anaerobic digestion of sewage sludge with grease trap sludge and municipal solid waste as co-substrates. *Environmental Research*, 155(February), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.02.007>.
92. Gu, J., Liu, R., Cheng, Y., Stanisavljevic, N., Li, L., Djatkov, D., Peng, X., & Wang, X. (2020). Anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge under mesophilic and thermophilic conditions: Focusing on synergistic effects on methane production. *Bioresource Technology*, 301(January). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122765>.
93. Gunsalus, R. P., Cook, L. E., Crable, B., Rohlin, L., McDonald, E., Mouttaki, H., Sieber, J. R., Poweleit, N., Zhou, H., Lapidus, A. L., Daligault, H. E., Land, M., Gilna, P., Ivanova, N., Kyrpides, N., Culley, D. E., & McInerney, M. J. (2016). Complete genome sequence of *Methanospirillum hungatei* type strain JF1. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0124-8>.
94. Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., & Lu, X. (2017). Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(September 2016), 1485–1496. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.184>.
95. He, R., Chen, M., Ma, R. C., Su, Y., & Zhang, X. (2017). Ammonium conversion and its feedback effect on methane oxidation of *Methylosinus sporium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(4), 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.003>.
96. Hidaka, T., Wang, F., & Tsumori, J. (2015). Comparative evaluation of anaerobic digestion for sewage sludge and various organic wastes with simple modeling. *Waste Management*, 43, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.04.026>.

97. Hill D. (1982). A comprehensive dynamic model for animal waste methanogenesis. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 25(5), 1374–1380. <https://doi.org/10.13031/2013.33730>.
98. Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J. C., De Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515–2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>.
99. Horne A. y Lessner D. (2013). Assessment of the oxidant tolerance of Methanosarcina acetivorans. *FEMS Microbiol Lett*. Vol. 343 (1) pp. 13–19. doi:10.1111/1574-6968.12115.
100. Iacovidou, E., Ohandja, D. G., & Voulvoulis, N. (2012). Food waste co-digestion with sewage sludge - Realising its potential in the UK. *Journal of Environmental Management*, 112, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.029>.
101. Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., & Sekiguchi, Y. (2007). Pelotomaculum propionicum sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1487–1492. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.64925-0>.
102. INECC-SEMARNAT. (2012). Diagnóstico básico para la gestión integral de los residuos. Versión extensa.
103. Jain, S., Jain, S., Wolf, I. T., Lee, J., & Tong, Y. W. (2015). A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.091>.
104. Kacprzak, M., Neczaj, E., Fijałkowski, K., Grobelak, A., Grosser, A., Worwag, M., Rorat, A., Brattebo, H., Almås, Å., & Singh, B. R. (2017). Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research*, 156(January), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.010>.
105. Karlikanovaite-Balikci, A., Ozbayram, E. G., Yagci, N., & Ince, O. (2019). Microbial community shifts in the oxic-settling-anoxic process in response to changes to sludge interchange ratio. *Heliyon*, 5(4), e01517. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01517>.
106. Karlsson R., Gonzales-Siles L., Boulund F., Svensson-Stadler L., Skovbjerg S., Karlsson A., Davidson M., Hulthe S., Kristiansson E., & Moore E. (2015). Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms - A prospectus. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.006>.
107. Kern, T., Fischer, M. A., Deppenmeier, U., Schmitz, R. A., & Rother, M. (2016). Methanosarcina flavescens sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a full-scale anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1533–1538. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000894>.
108. Kiely, G., Tayfur, G., Dolan, C., & Tanji, K. (1997). Physical and mathematical modelling of anaerobic digestion of organic wastes. *Water Research*, 31(3), 534–540. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00175-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00175-3).
109. Kim, W., & Whitman, W. B. (2014). Methanogens. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2, 602–606. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00204-4>.

110. 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. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.10.025>.
111. Kouas, M., Torrijos, M., Schmitz, S., Soubie, P., Sayadi, S., & Harmand, J. (2018). Co-digestion of solid waste: Towards a simple model to predict methane production. *Bioresource Technology*, *254*(January), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.055>.
112. Kythreotou, N., Florides, G., & Tassou, S. A. (2014). A review of simple to scientific models for anaerobic digestion. *Renewable Energy*, *71*, 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.05.055>.
113. Lara R. (2014). Obtención de biogás a partir de codigestión anaerobia de microalgas y fangos de EDAR. Memoria. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona. Recuperado de: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/22006/PFCfinalLara.pdf>.
114. Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Ho, C. C., & Woo, P. C. Y. (2015). Gene amplification and sequencing for bacterial identification. In *Methods in Microbiology* (1st ed., Vol. 42). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.04.003>.
115. Lawson, P. A., & Rainey, F. A. (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(2), 1009–1016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000824>.
116. Lee, G., Lee, I., & Han, J. I. (2019). A combined method of hydrodynamic cavitation and alkaline treatment for waste-activated sludge solubilization; N/P recovery from anaerobic granular sludge. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *7*(5), 103329. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103329>.
117. Lee, J., & Hwang, S. (2019). Single and combined inhibition of *Methanosaeta concillii* by ammonia, sodium ion and hydrogen sulfide. *Bioresource Technology*, *281*(January), 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.106>.
118. Li, C., Moertelmaier, C., Winter, J., & Gallert, C. (2015). Microbial community shifts during biogas production from biowaste and/or propionate. *Bioengineering*, *2*(1), 35–53. <https://doi.org/10.3390/bioengineering2010035>.
119. Li, Y., Chen, Y., & Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied Energy*, *240*(June 2018), 120–137. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.243>.
120. Liaquat, R., Jamal, A., Tauseef, I., Qureshi, Z., Farooq, U., Imran, M., & Ali, M. I. (2017). Characterizing bacterial consortia from an anaerobic digester treating organic waste for biogas production. *Polish Journal of Environmental Studies*, *26*(2), 709–716. <https://doi.org/10.15244/pjoes/59332>.
121. Lin, J., Zuo, J., Ji, R., Chen, X., Liu, F., Wang, K., & Yang, Y. (2012). Methanogenic community dynamics in anaerobic co-digestion of fruit and vegetable waste and food waste. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *24*(7), 1288–1294. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60927-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60927-3).
122. Lindmark, J., Thorin, E., Bel Fdhila, R., & Dahlquist, E. (2014). Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *40*, 1030–1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.182>.
123. Liotta, F., D'Antonio, G., Esposito, G., Fabbicino, M., Frunzo, L., Van Hullebusch, E. D., Lens, P. N., & Pirozzi, F. (2014). Effect of moisture on disintegration kinetics during anaerobic digestion of complex organic substrates. *Waste Management and Research*, *32*(1), 40–48. <https://doi.org/10.1177/0734242X13513827>.

124. Liu, C., Li, H., Zhang, Y., & Liu, C. (2016 a). Improve biogas production from low-organic-content sludge through high-solids anaerobic co-digestion with food waste. *Bioresource Technology*, 219, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.130>.
125. Liu, J., Yu, D., Zhang, J., Yang, M., Wang, Y., Wei, Y., & Tong, J. (2016 b). Rheological properties of sewage sludge during enhanced anaerobic digestion with microwave-H₂O₂ pretreatment. *Water Research*, 98, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.073>.
126. Liu, C., Li, H., Zhang, Y., Si, D., & Chen, Q. (2016 c). Evolution of microbial community along with increasing solid concentration during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. *Bioresource Technology*, 216, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.048>.
127. Liu, G., Li, X., Ma, L., Ma, X., & Chen, H. (2019). Enhancement of excess sludge hydrolysis and decomposition by combined lysozyme and rhamnolipid pretreatment. *Bioresource Technology*, 289(July 2018), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121703>.
128. López-Hernández, J. E., Ramírez-Higareda, B. L., Gomes-Cabral, C. B., & Morgan-Sagastume, J. M. (2017). *Guía técnica para el manejo y aprovechamiento de biogás en plantas de tratamiento de aguas residuales*. <http://aneas.com.mx/wp-content/uploads/2017/10/guia-odos2017-dig.pdf>.
129. Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., Aklujkar, M., Butler, J. E., Giloteaux, L., Rotaru, A. E., Holmes, D. E., Franks, A. E., Orellana, R., Risso, C., & Nevin, K. P. (2011). Geobacter. The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 59). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5>.
130. Lovley, D. R. (2018). The hydrogen economy of methanosarcina barkeri: Life in the fast lane. *Journal of Bacteriology*, 200(20), 1–5. <https://doi.org/10.1128/JB.00445-18>.
131. Ma, K., Liu, X., & Dong, X. (2006). Methanosaeta harundinacea sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 127–131. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63887-0>.
132. Manara, P., & Zabaniotou, A. (2012). Towards sewage sludge based biofuels via thermochemical conversion - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 2566–2582. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.074>.
133. Manjusha, C., & Beevi, B. S. (2016). Mathematical Modeling and Simulation of Anaerobic Digestion of Solid Waste. *Procedia Technology*, 24, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.174>.
134. Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Okoh, A. I., Makaka, G., & Simon, M. (2013). Microbial anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 4390–4417. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094390>.
135. Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>.
136. Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Macé, S., & Astals, S. (2011). Codigestion of solid wastes: A review of its uses and perspectives including modeling. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(2), 99–111. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.525496>.
137. 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. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>.

138. Matheri, A. N., Ndiweni, S. N., Belaid, M., Muzenda, E., & Hubert, R. (2017). Optimising biogas production from anaerobic co-digestion of chicken manure and organic fraction of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *80*(June), 756–764. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.068>.
139. Maus, I., Wibberg, D., Winkler, A., Pühler, A., Schnürer, A., & Schlüter, A. (2016). Complete genome sequence of the methanogen *Methanoculleus bourgensis* BA1 isolated from a biogas reactor. *Genome Announcements*, *4*(3), 3–4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00568-16>.
140. McLeod, J. D., Othman, M. Z., Beale, D. J., & Joshi, D. (2015). The use of laboratory scale reactors to predict sensitivity to changes in operating conditions for full-scale anaerobic digestion treating municipal sewage sludge. *Bioresource Technology*, *189*, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.049>.
141. Mehariya, S., Patel, A. K., Obulisamy, P. K., Punniyakotti, E., & Wong, J. W. C. (2018). Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. *Bioresource Technology*, *265*(March), 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.030>.
142. Mendes, C., Esquerre, K., & Matos Queiroz, L. (2015). Application of Anaerobic Digestion Model No. 1 for simulating anaerobic mesophilic sludge digestion. *Waste Management*, *35*(1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.10.013>.
143. Menniti, A., Rieger, L., Boltz, J. P., Johnson, B., Daigger, G., Habermacher, J., Derlon, N., & Morgenroth, E. (2012). Critical review on the degradability of endogenous decay products. WEFTEC 2012 - 85th Annual Technical Exhibition and Conference, *12*, 7406–7408. <https://doi.org/10.2175/193864712811703711>.
144. Monroy, O., Famá, G., Meraz, M., Montoya, L., & MacArie, H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Water Research*, *34*(6), 1803–1816. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00301-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00301-2).
145. Montecchio, D., Astals, S., Di Castro, V., Gallipoli, A., Gianico, A., Pagliaccia, P., Piemonte, V., Rossetti, S., Tonanzi, B., & Braguglia, C. M. (2019). Anaerobic co-digestion of food waste and waste activated sludge: ADM1 modelling and microbial analysis to gain insights into the two substrates' synergistic effects. *Waste Management*, *97*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.036>.
146. Mori, K., & Harayama, S. (2011). *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *61*(1), 138–143. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022723-0>.
147. Moscoviz, R., De Fouchécour, F., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Cooperative growth of *Geobacter sulfurreducens* and *Clostridium pasteurianum* with subsequent metabolic shift in glycerol fermentation. *Scientific Reports*, *7*(March), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep44334>.
148. Mottet, A., François, E., Latrille, E., Steyer, J. P., Déléris, S., Vedrenne, F., & Carrère, H. (2010). Estimating anaerobic biodegradability indicators for waste activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, *160*(2), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.059>.
149. Mottet, A., Ramirez, I., Carrère, H., Déléris, S., Vedrenne, F., Jimenez, J., & Steyer, J. P. (2013). New fractionation for a better bioaccessibility description of particulate organic matter in a modified ADM1 model. *Chemical Engineering Journal*, *228*, 871–881. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.082>.
150. Muñoz-Tamayo, R., Popova, M., Tillier, M., Morgavi, D. P., Morel, J. P., Fonty, G., & Morel-Desrosiers, N. (2019). Hydrogenotrophic methanogens of the mammalian gut: Functionally

- similar, thermodynamically different. A modelling approach. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226243>.
151. Nakasaki, K., Nguyen, K. K., Ballesteros, F. C., Maekawa, T., & Koyama, M. (2020). Characterizing the microbial community involved in anaerobic digestion of lipid-rich wastewater to produce methane gas. *Anaerobe*, 61, 102082. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102082>.
 152. Nielfa, A., Cano, R., & Fdz-Polanco, M. (2015). Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports*, 5(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.005>.
 153. Nielsen, P. H., Thomsen, T. R., & Nielsen, J. L. (2004). Bacterial composition of activated sludge - Importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology*, 49(10), 51–58. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0606>.
 154. Novarino, D., & Zanetti, M. C. (2012). Anaerobic digestion of extruded OFMSW. *Bioresource Technology*, 104, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.001>.
 155. Patel, G. B. (2015). Methanosaeta. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00513>.
 156. Pavlostathis, S. G., & Gossett, J. M. (1986). A kinetic model for anaerobic digestion of biological sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(10), 1519–1530. <https://doi.org/10.1002/bit.260281010>.
 157. Peng, H., Zhao, Z., Xiao, H., Yang, Y., Zhao, H., & Zhang, Y. (2019). A strategy for enhancing anaerobic digestion of waste activated sludge: Driving anodic oxidation by adding nitrate into microbial electrolysis cell. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 81, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.02.009>.
 158. Peña-Vargas, M. Y., & Durán-Moreno, A. (2018). Influence of two types of sludge on the biogas production of assorted waste streams and the significance of beef cattle waste and liquid cheese whey in the organic fraction of municipal solid waste. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 53(14), 1235–1242. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1528037>.
 159. Pérez A. Torres P. (2008). Indices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Ingeniería y Competitividad*, 10. (2), 41-52.
 160. Perrier, M., & Dochain, D. (1992). Analysis of the impact of controlled variables selection on the operation of anaerobic digestion processes. *IFAC Symposia Series*, 25(10), 65–70. [https://doi.org/10.1016/0967-0661\(93\)91472-9](https://doi.org/10.1016/0967-0661(93)91472-9).
 161. Poehlein, A., Daniel, R., & Seedorf, H. (2017). The Draft Genome of the Non-Host-Associated Methanobrevibacter arboriphilus Strain DH1 Encodes a Large Repertoire of Adhesin-Like Proteins. *Archaea*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4097425>.
 162. Polizzi, C., Alatríste-Mondragón, F., & Munz, G. (2017). Modeling the disintegration process in anaerobic digestion of tannery Sludge And Fleshing. *Frontiers in Environmental Science*, 5(JUN), (37), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00037>.
 163. Prabhu, M. S., & Mutnuri, S. (2016). Anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste. *Waste Management and Research*, 34(4), 307–315. <https://doi.org/10.1177/0734242X16628976>.
 164. Prenafeta-Boldú, F. X., Fernández, B., Viñas, M., Lizardo, R., Brufau, J., Owusu-Asiedu, A., Walsh, M. C., & Awati, A. (2017). Effect of Bacillus spp. direct-fed microbial on slurry characteristics and gaseous emissions in growing pigs fed with high fibre-based diets. *Animal*, 11(2), 209–218. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001415>.

165. Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., & Elbeshbishy, E. (2019). A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. *Energies*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/en12061106>.
166. Ramirez, I., Volcke, E. I. P., Rajinikanth, R., & Steyer, J. P. (2009). Modeling microbial diversity in anaerobic digestion through an extended ADM1 model. *Water Research*, 43(11), 2787–2800. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.034>.
167. Raposo, F., De La Rubia, M. A., Fernández-Cegri, V., & Borja, R. (2012). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>.
168. Rathnasiri, P. G. (2016). Dynamic Modelling and Simulation of Pilot Scale Anaerobic Digestion Plant Treating Source Separated Food Waste and Effect of Recycling Sludge. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.082>.
169. Reichert, P. (1998). AQUASIM 2.0. User Manual. Computer Program for the Identification and Simulation of Aquatic Systems. Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG). Dübendorf, Switzerland.
170. 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(September 2017), 1069–1076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.109>.
171. Rosen C., Jeppsson U. (2006). Aspects on ADM1 implementation within the BSM2 framework. Technical Report, Department of Industrial Electrical Engineering and Automation. Lund University. Lund, Sweden. pp. 1-35.
172. Rozzi, A., Merlini, S., & Passino, R. (1985). Development of a four population model of the anaerobic degradation of carbohydrates. *Environmental Technology Letters*, 6(12), 610–619. <https://doi.org/10.1080/09593338509384382>.
173. Saha, S., Basak, B., Hwang, J. H., Salama, E. S., Chatterjee, P. K., & Jeon, B. H. (2020). Microbial Symbiosis: A Network towards Biomethanation. *Trends in Microbiology*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.012>.
174. Sandle T. (2016). Microbial identification. *Pharmaceutical Microbiology*. Essentials for Quality Assurance and Quality Control. pp. 103-113. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100022-9.00009-8>.
175. Schoen, M. A., Sperl, D., Gadermaier, M., Goberna, M., Franke-whittle, I., Insam, H., Ablinger, J., & Wett, B. (2009). Bioresource Technology Population dynamics at digester overload conditions. *Bioresource Technology*, 100(23), 5648–5655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.033>.
176. SEMARNAT. (2017). Programa Nacional para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos 2017-2018.
177. Seswoya, R., Fen, A. S., Yang, L. K., & Sulaiman, S. M. (2019). Performance of anaerobic digestion of fruit and vegetable waste (FVW). *AIP Conference Proceedings*, 2157(September). <https://doi.org/10.1063/1.5126561>.
178. Shah, F. A., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I. A., & Shah, M. M. (2015). Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 627–642. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.053>.

179. Shelobolina, E. S., Vrionis, H. A., Findlay, R. H., & Lovley, D. R. (2008). *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1075–1078. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65377-0>.
180. Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>.
181. Sieber, J. R., Sims, D. R., Han, C., Kim, E., Lykidis, A., Lapidus, A. L., McDonnald, E., Rohlin, L., Culley, D. E., Gunsalus, R., & McInerney, M. J. (2010). The genome of *Syntrophomonas wolfei*: New insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production. *Environmental Microbiology*, 12(8), 2289–2301. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02237.x>.
182. Siegrist, H., Renggli, D., & Gujer, W. (1993). Mathematical modelling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment. *Water Science and Technology*, 27(2), 25–36. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0070>.
183. Siddique, M. N. I., & Wahid, Z. A. (2018). Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *Journal of Cleaner Production*, 194(1), 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155>.
184. Silvestre, G., Bonmatí, A., & Fernández, B. (2015). Optimisation of sewage sludge anaerobic digestion through co-digestion with OFMSW: Effect of collection system and particle size. *Waste Management*, 43, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.029>.
185. Sloan, A., Wang, G., & Cheng, K. (2017). Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing. *Clinica Chimica Acta*, 473(June), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.08.035>.
186. Souza, T. S. O., Carvajal, A., Donoso-Bravo, A., Peña, M., & Fdz-Polanco, F. (2013). ADM1 calibration using BMP tests for modeling the effect of autohydrolysis pretreatment on the performance of continuous sludge digesters. *Water Research*, 47(9), 3244–3254. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.041>.
187. Sousa, J. R., Silveira, C. M., Fontes, P., Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., Van Driessche, G., Devreese, B., Moura, I., Moura, J. J. G., & Almeida, M. G. (2017). Understanding the response of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 to the electron acceptors nitrate and sulfate - biosynthetic costs modulate substrate selection. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(11), 1455–1469. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.021>.
188. Spérandio, M., Labelle, M. A., Ramdani, A., Gadbois, A., Paul, E., Comeau, Y., & Dold, P. L. (2013). Modelling the degradation of endogenous residue and “unbiodegradable” influent organic suspended solids to predict sludge production. *Water Science and Technology*, 67(4), 789–796. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.629>.
189. Spring, S., Lapidus, A., Schröder, M., Gleim, D., Sims, D., Meincke, L., del Rio, T. G., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J. F., Lucas, S., Chen, F., Nolan, M., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., ... Han, C. (2009). Complete genome sequence of *Desulfotomaculum acetoxidans* type strain (5575 T). *Standards in Genomic Sciences*, 1(3), 242–253. <https://doi.org/10.4056/sigs.39508>.
190. Supaphol, S., Jenkins, S. N., Intomo, P., Waite, I. S., & O'Donnell, A. G. (2011). Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresource Technology*, 102(5), 4021–4027. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.124>.
191. The UniProt Consortium. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. Vol. 45. Issue D1. Pages D158–D169.

192. Tyagi V., Fdez-Güelfoc L., Zhoud Y., Álvarez-Gallego C., Romero L. I., & Wun Jern N. (2018). Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93(May), 380–399. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.051>.
193. Uhlenhut, F., Schlüter, K., & Gallert, C. (2018). Wet biowaste digestion: ADM1 model improvement by implementation of known genera and activity of propionate oxidizing bacteria. *Water Research*, 129(1), 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.012>.
194. Van Lier, J. B., Mahmoud, N., & Zeeman, G. (2008). Biological wastewater treatment: principles, modeling and design - Chapter 16: Anaerobic wastewater treatment. In *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing. London, UK. <https://doi.org/10.1021/es00154a002>.
195. Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J., & Zitomer, D. (2015). Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function: Supplementary Issue: Water Microbiology. *Microbiology Insights*, 8s2, MBI.S33593. <https://doi.org/10.4137/mbi.s33593>.
196. Ventorino, V., Romano, I., Pagliano, G., Robertiello, A., & Pepe, O. (2018). Pre-treatment and inoculum affect the microbial community structure and enhance the biogas reactor performance in a pilot-scale biodigestion of municipal solid waste. *Waste Management*, 73, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.005>.
197. Vivekanand V., Mulat D., Eijsink V., Horn S. (2018). Synergistic effects of anaerobic co-digestion of whey, manure and fish ensilage. *Bioresource Technology*, 249(July 2017), 35–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.169>.
198. Vögeli Y., Riu C., Gallardo A., Diener S., Zurbrügg C. (2014). Anaerobic Digestion of Biowaste in Developing Countries. Practical Information and Case Studies. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag), Dübendorf, Switzerland.
199. Von Sperling, M. (2007). Biological Wastewater Treatment. Vol. 6: Sludge Treatment and Disposal. IWA Publishing. London. UK.
200. Walter, A., Probst, M., Franke-Whittle, I. H., Ebner, C., Podmirseg, S. M., Etemadi-Shalamzari, M., Hupfuf, S., & Insam, H. (2019). Microbiota in anaerobic digestion of sewage sludge with and without co-substrates. *Water and Environment Journal*, 33(2), 214–222. <https://doi.org/10.1111/wej.12392>.
201. Wang, X., Yang, G., Li, F., Feng, Y., Ren, G., & Han, X. (2013). Evaluation of two statistical methods for optimizing the feeding composition in anaerobic co-digestion: Mixture design and central composite design. *Bioresource Technology*, 131, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.174>.
202. Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., & Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99(17), 7928–7940. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.044>.
203. Ward, N. L., Challacombe, J. F., Janssen, P. H., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Wu, M., Xie, G., Haft, D. H., Sait, M., Badger, J., Barabote, R. D., Bradley, B., Brettin, T. S., Brinkac, L. M., Bruce, D., Creasy, T., Daugherty, S. C., Davidsen, T. M., DeBoy, R. T., ... Kuske, C. R. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2046–2056. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-08>.
204. Wei, L., An, X., Wang, S., Xue, C., Jiang, J., Zhao, Q., Kabutey, F. T., & Wang, K. (2017). Effect of hydraulic retention time on deterioration/restarting of sludge anaerobic digestion:

- Extracellular polymeric substances and microbial response. *Bioresource Technology*, 244(July), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.110>.
205. Xie, S., Hai, F. I., Zhan, X., Guo, W., Ngo, H. H., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2016). Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization. *Bioresource Technology*, 222, 498–512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.015>.
206. Xu, F., Li, Y., & Wang, Z. W. (2015). Mathematical modeling of solid-state anaerobic digestion. *Progress in Energy and Combustion Science*, 51, 49–66. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2015.09.001>.
207. Yamamoto, K., Tamaki, H., Cadillo-Quiroz, H., Imachi, H., Kyrpides, N., Woyke, T., Goodwin, L., Zinder, S. H., Kamagata, Y., & Liu, W.-T. (2014). Complete Genome Sequence of *Methanoregula formicica* SMSP T, a Mesophilic Hydrogenotrophic Methanogen Isolated from a. *Genome Announcements*, 2(5), e00870-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00870-14>. Copyright.
208. Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T., & Imachi, H. (2011). *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 53–59. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014811-0>.
209. Yong, Z., Dong, Y., Zhang, X., & Tan, T. (2015). Anaerobic co-digestion of food waste and straw for biogas production. *Renewable Energy*, 78, 527–530. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.033>.
210. Yu L., Wensel P., Ma J., Chen S. (2013). Mathematical Modeling in Anaerobic Digestion (AD). *Journal of Bioremediation and Biodegradation*. S4: 003. DOI:10.4172/2155-6199.S4-003.
211. Yuan, H., & Zhu, N. (2016). Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.261>.
212. Zaher, U., Li, R., Jeppsson, U., Steyer, J. P., & Chen, S. (2009). GISCOD: General Integrated Solid Waste Co-Digestion model. *Water Research*, 43(10), 2717–2727. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.018>.
213. Zhang, C., Liu, X., & Dong, X. (2004). *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 969–973. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02903-0>.
214. Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., & Tan, T. (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.038>.
215. Zhang, Z., Guo, L., Wang, Y., Li, F., Zhao, Y., Gao, M., & She, Z. (2017). Degradation and transformation of extracellular polymeric substances (EPS) and dissolved organic matters (DOM) during two-stage anaerobic digestion with waste sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(15), 9619–9629. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.201>.
216. Zhang, S., Chang, J., Liu, W., Pan, Y., Cui, K., Chen, X., Liang, P., Zhang, X., Wu, Q., Qiu, Y., & Huang, X. (2018). A novel bioaugmentation strategy to accelerate methanogenesis via adding *Geobacter sulfurreducens* PCA in anaerobic digestion system. *Science of the Total Environment*, 642, 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.043>.
217. Zhang, M., Zhang, Y., Li, Z., Zhang, C., Tan, X., Liu, X., Wan, C., Yang, X., & Lee, D. J. (2019 a). Anaerobic co-digestion of food waste/excess sludge: substrates - products transformation and

- role of NADH as an indicator. *Journal of Environmental Management*, 232(2005), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.087>.
218. Zhang, P., Zhu, J., Xu, X. Y., Qing, T. P., Dai, Y. Z., & Feng, B. (2019 b). Identification and function of extracellular protein in wastewater treatment using proteomic approaches: A minireview. *Journal of Environmental Management*, 233(December 2018), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.028>.
219. Zhang, W., Zhang, F., Li, Y. X., Jiang, Y., & Zeng, R. J. (2019 c). No difference in inhibition among free acids of acetate, propionate and butyrate on hydrogenotrophic methanogen of *Methanobacterium formicum*. *Bioresource Technology*, 294(di), 122237. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122237>.
220. Zhang, Q., Wang, M., Ma, X., Gao, Q., Wang, T., Shi, X., Zhou, J., Zuo, J., & Yang, Y. (2019 d). High variations of methanogenic microorganisms drive full-scale anaerobic digestion process. *Environment International*, 126 (February), 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.005>.
221. Zhao, X., Li, L., Wu, D., Xiao, T., Ma, Y., & Peng, X. (2019). Modified Anaerobic Digestion Model No. 1 for modeling methane production from food waste in batch and semi-continuous anaerobic digestions. *Bioresource Technology*, 271(1), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.091>.
222. Zhou, H., Li, H., & Wang, F. (2012). Anaerobic digestion of different organic wastes for biogas production and its operational control performed by the modified ADM1. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(1), 84–92. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.629585>.
223. Zhou, L., Yu, H., Ai, G., Zhang, B., Hu, S., & Dong, X. (2015). Transcriptomic and physiological insights into the robustness of long filamentous cells of *Methanosaeta harundinacea*, prevalent in upflow anaerobic sludge blanket granules. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 831–839. <https://doi.org/10.1128/AEM.03092-14>.
224. Zhou, L., & Dong, X. (2019). *Methanospirillum*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00511.pub2>.
225. Ziemiński K., & Frąc M., (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11(18), 4127–4139. <https://doi.org/10.5897/ajbx11.054>.
226. Zinder, S., & Bräuer, S. (2016). *Methanoregula*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01368>.
227. Ziganshina, E. E., Mohammed, W. S., Shagimardanova, E. I., Shigapova, L. H., & Ziganshin, A. M. (2018). Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain EZ-C07 isolated from digested agricultural wastes. *BMC Research Notes*, 11(1), 10–12. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3710-1>

9. ANEXOS

9.1 PRUEBA DE ANOVA DE UN FACTOR PARA COMPARACIÓN DE RESULTADOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CH₄.

A partir de los resultados de producción de CH₄ obtenidos en la etapa experimental, así como a través de la modelación del proceso de co-digestión anaerobia se propuso realizar pruebas de ANOVA de un factor a través del software Minitab, para determinar si las medias de las producciones de CH₄ a partir de las mezclas de co-digestión presentan diferencias significativas con respecto a las producciones de CH₄ de los sustratos por individual, así como con los resultados obtenidos por medio del modelo ADM1 en AQUASIM 2.0

Formulación de hipótesis

Hipótesis nula (H₀): No existe diferencia entre los grupos.

Hipótesis alternativa (H₁): Existe diferencia entre los grupos.

Significado de la hipótesis

H₀: No existe diferencia significativa en la producción de CH₄ con el uso de los sustratos por individual y en co-digestión.

H₁: Existe diferencia significativa en la producción de CH₄ con el uso de los sustratos por individual y en co-digestión.

Determinación del nivel de significancia

Nivel de significancia (α) = 5% = 0.05

Nivel de confianza = 1 - α = 95% = 0.95

Establecimiento de la regla de decisión

Condiciones para rechazo de la hipótesis nula (H₀):

- Valor de $p < \alpha$

Información del factor

Para el análisis se estableció como variable respuesta la producción de CH₄ y como factor el sustrato o mezcla de co-digestión a comparar. Por lo que para las pruebas el valor 1 corresponde a los datos obtenidos a partir de la producción de FORSU por individual y 2 a los valores obtenidos por cada una de las mezclas de co-digestión, una a la vez por los primeros 5 casos; y en el caso del lodo de purga se ha considerado del mismo modo.

<u>Factor</u>	<u>Niveles</u>	<u>Valores</u>
Sustrato	2	1, 2

A continuación, se muestran algunos de los conceptos que serán utilizados en las tablas de resultados de ANOVA, así como en la tala de medias del análisis:

Grados de libertad

Los grados de libertad total (GL) son la cantidad de información en los datos. El análisis utiliza esa información para estimar los valores de los parámetros de población infinita. El valor de GL está determinado por el número de observaciones en la muestra e indica cuánta información utiliza el término. Si incrementa el tamaño de la muestra, obtendrá más información sobre la población, con lo cual aumentan los GL totales.

Suma de Cuadrados Ajustadas

Las sumas ajustadas de los cuadrados (SC Ajust.) son medidas de variación para los diferentes componentes del modelo. En la tabla de Análisis de varianza, se separan las sumas de los cuadrados en diferentes componentes que describen la variación que se debe a fuentes diferentes.

Error de SC Ajust. El error de la suma de cuadrados es la suma de los residuos cuadráticos. Cuantifica la variación en los datos que los predictores no explican.

SC Ajust. Total. La suma total de los cuadrados es la suma del término suma de los cuadrados y el error en la suma de los cuadrados. Cuantifica la variación total en los datos.

Las sumas ajustadas de cuadrados se utilizan para calcular el valor p de un término. Generalmente, se interpretan los valores p en lugar de las sumas de los cuadrados.

Cuadrados medios ajustados

Los cuadrados medios ajustados (CM Ajust.) miden qué tanta variación explica un término o un modelo, asumiendo que todos los demás términos están en el modelo, independientemente del orden en el que se ingresaron. A diferencia de las sumas ajustadas de los cuadrados, los cuadrados medios ajustados consideran los grados de libertad.

Los cuadrados medios ajustados se utilizan para calcular el valor p de un término. Generalmente, se interpretan los valores p en lugar de los cuadrados medios ajustados.

Valor F

El valor F es la estadística de prueba usada para determinar si el término está asociado con la respuesta. Se utiliza para calcular el valor p, que se usa para tomar una decisión acerca de la significancia estadística de los términos y el modelo. Es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Las probabilidades más bajas proporcionan una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula. Un valor F suficientemente grande indica que el término o el modelo es significativo.

Valor p

El valor p es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Las probabilidades más bajas proporcionan una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula. El valor p indicado en la salida de la tabla ANOVA se utiliza para determinar si las diferencias entre las medias son estadísticamente significativas, comparándolo con el nivel de significancia para evaluar la hipótesis nula. Esta hipótesis indica que las medias de población son todas iguales. Por lo general, el nivel de significancia (α o alfa) de 0.05 funciona adecuadamente. Un nivel de significancia de 0.05 indica un riesgo de 5% de concluir que existe una diferencia cuando no hay una diferencia real.

Valor $p \leq \alpha$: Las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente significativas. Si el valor p es menor que o igual al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que las medias de población no son iguales.

Valor $p > \alpha$: Las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas. Si el valor p es mayor que el nivel de significancia, no se cuenta con suficiente evidencia para rechazar la hipótesis de que las medias de población son iguales.

Gráficas de intervalo

Las gráficas de intervalo muestran la media y el intervalo de confianza para cada grupo. Cada punto representa una media de muestra y cada intervalo es un intervalo de confianza de 95 % de la media de un grupo. Para el análisis de los datos se realizó la comparación entre dos series de datos para evitar que al aumentar el número de comparaciones también se incrementara la probabilidad de que se concluya de forma incorrecta que una de las diferencias observadas es significativamente diferente.

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra (N) es el número total de observaciones en cada grupo analizado. Este valor afecta el intervalo de confianza y la potencia de la prueba. Generalmente, una muestra más grande produce un intervalo de confianza más estrecho. Con un tamaño de muestra más grande, la prueba tendrá más potencia para detectar una diferencia.

Media

La media de las observaciones dentro de cada grupo describe cada grupo con un valor simple que identifique el centro de los datos. Es la suma de todas las observaciones con un grupo dividida entre el número de observaciones en ese grupo. Debido a que cada diferencia en las medias de los grupos se basa en los datos de una muestra y no de toda la población, no se puede asegurar que sea igual a la diferencia en las poblaciones. Para obtener un mejor sentido de la diferencia poblacional, se puede utilizar el intervalo de confianza.

Desviación estándar

La desviación estándar (Desv.Est.) es la medida de dispersión, que indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la media. Utiliza las mismas unidades que la variable. Un valor de desviación estándar más alto indica una mayor dispersión de los datos. Se utiliza para calcular los intervalos de confianza y los valores p .

Intervalo de confianza de las medias de grupo (IC de 95%)

Estos intervalos de confianza (IC) son rangos de valores que probablemente contienen la media real de cada población. Los intervalos de confianza se calculan usando la desviación estándar agrupada. Puesto que las muestras son aleatorias, es poco probable que dos muestras de una población produzcan intervalos de confianza idénticos. El intervalo de confianza consta de las partes siguientes:

Estimación de punto. Es la estimación del parámetro que se calcula a partir de los datos de la muestra. El intervalo de confianza está centrado alrededor de este valor.

Margen de error. Define la amplitud del intervalo de confianza y es determinado por la variabilidad observada en la muestra, el tamaño de la muestra y el nivel de confianza. Para calcular el límite superior del intervalo de confianza, el margen de error se suma a la estimación de punto. Para calcular el límite inferior del intervalo de confianza, el margen de error se resta de la estimación de punto.

Tomando como base lo anterior, el análisis de varianza realizado en Minitab, así como la información sobre las medias de los datos y las gráficas de intervalos para cada caso se muestran a continuación:

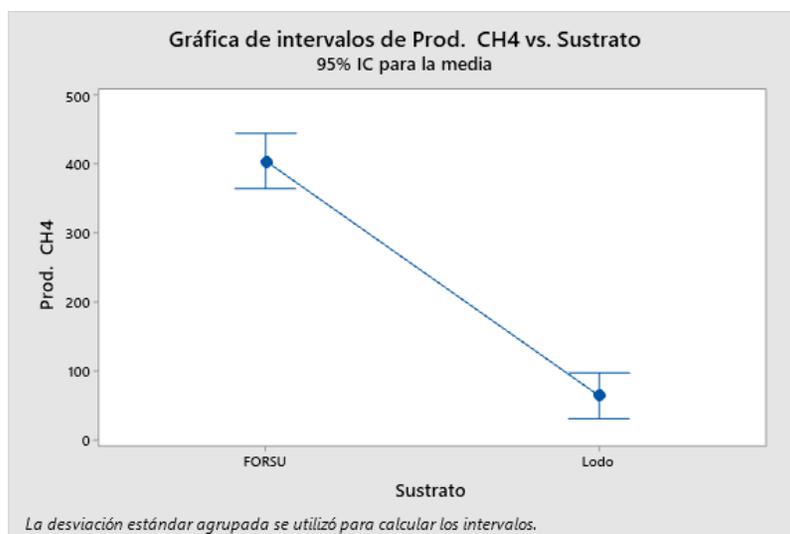
FORSU y Lodo de purga.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	756982	756982	180.96	0.000
Error	25	104576	4183		
Total	26	861559			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	11	404.7	99.5	(364.5, 444.8)
2	16	63.91	19.36	(30.61, 97.21)



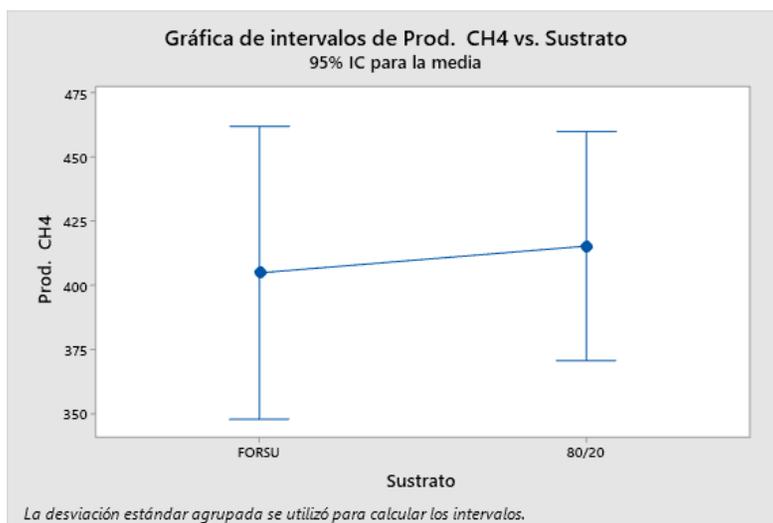
FORSU y 80/20.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	738	737.5	0.09	0.770
Error	27	228751	8472.3		
Total	28	229489			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	11	404.7	99.5	(347.7, 461.6)
2	18	415.1	87.4	(370.6, 459.6)



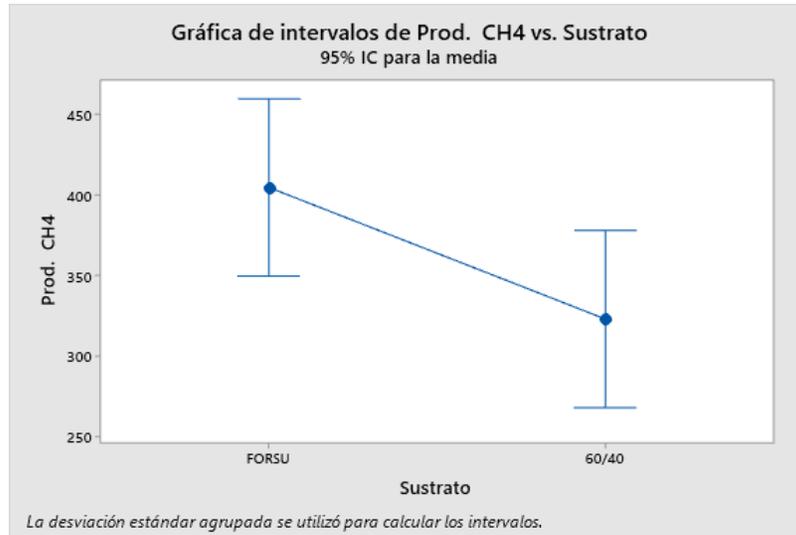
FORSU y 60/40.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	36785	36785	4.80	0.040
Error	20	153186	7659		
Total	21	189972			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	11	404.7	99.5	(349.6, 459.7)
2	11	322.9	73.6	(267.9, 377.9)



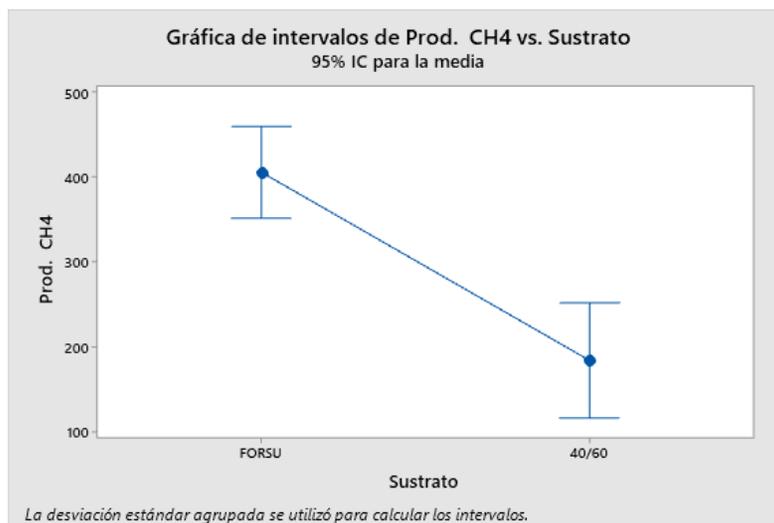
FORSU y 40/60.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	209140	209140	29.33	0.000
Error	16	114077	7130		
Total	17	323217			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	11	404.7	99.5	(350.7, 458.7)
2	7	183.6	50.2	(115.9, 251.2)



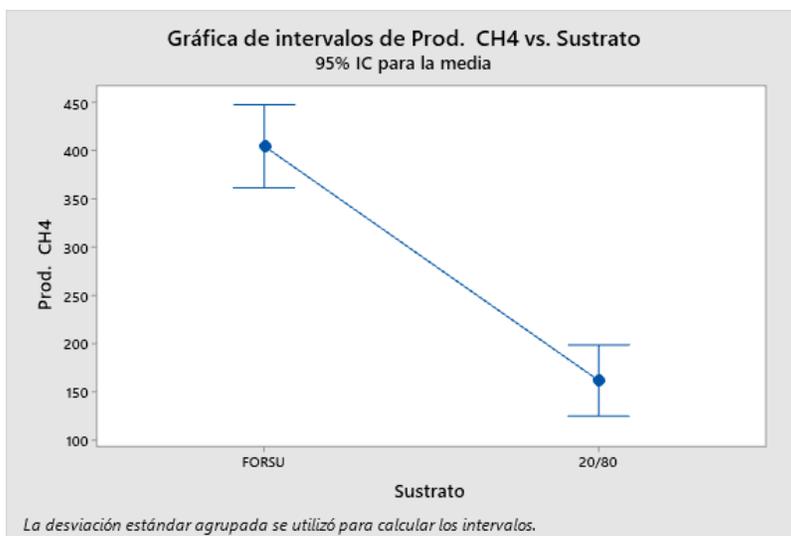
FORSU y 20/80.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	374925	374925	78.33	0.000
Error	24	114873	4786		
Total	25	489798			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	11	404.7	99.5	(361.6, 447.7)
2	15	161.62	33.72	(124.75, 198.49)



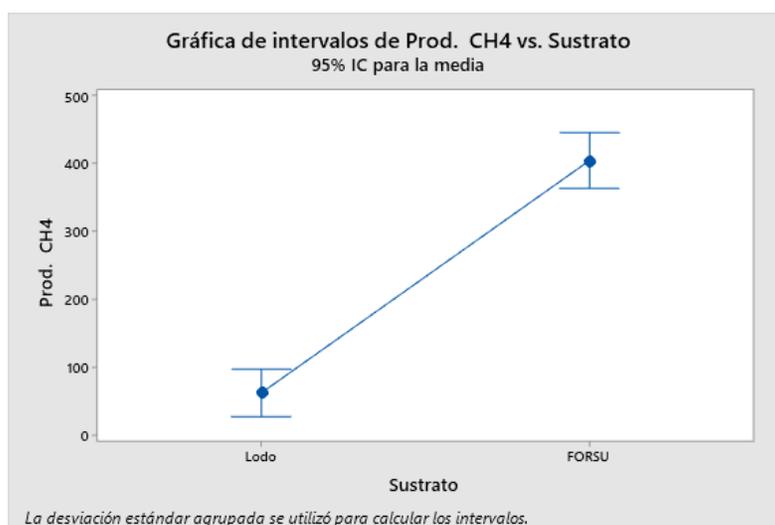
Lodo de purga y FORSU.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	743756	743756	171.66	0.000
Error	24	103987	4333		
Total	25	847743			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	15	62.34	18.97	(27.26, 97.42)
2	11	404.7	99.5	(363.7, 445.6)



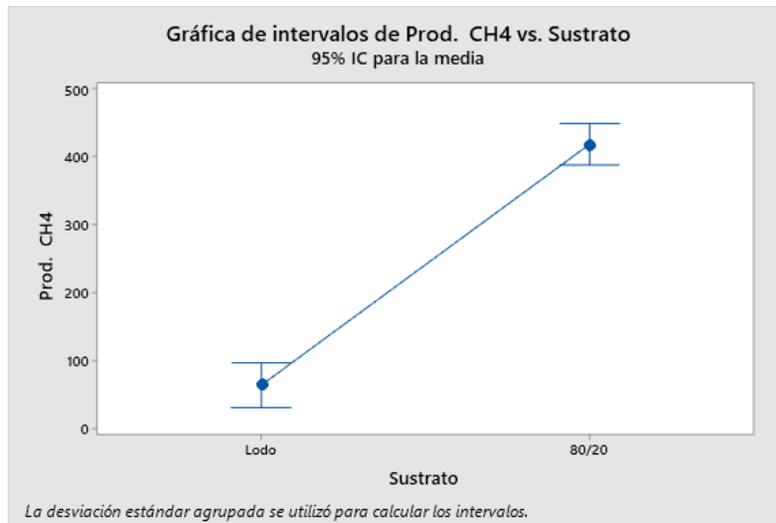
Lodo de purga y 80/20.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	1093265	1093265	257.91	0.000
Error	33	139885	4239		
Total	34	1233149			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	16	63.91	19.36	(30.79, 97.02)
2	19	418.7	86.4	(388.3, 449.1)



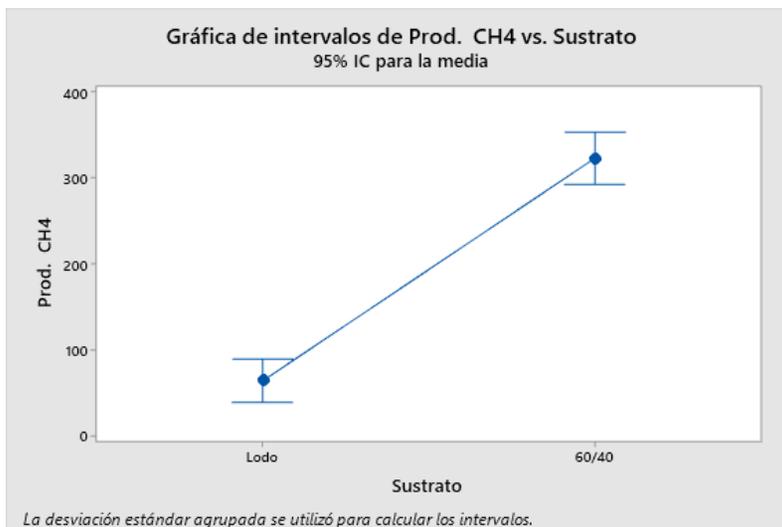
Lodo de purga y 60/40.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	437248	437248	182.62	0.000
Error	25	59859	2394		
Total	26	497106			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	16	63.91	19.36	(38.71, 89.10)
2	11	322.9	73.6	(292.5, 353.3)



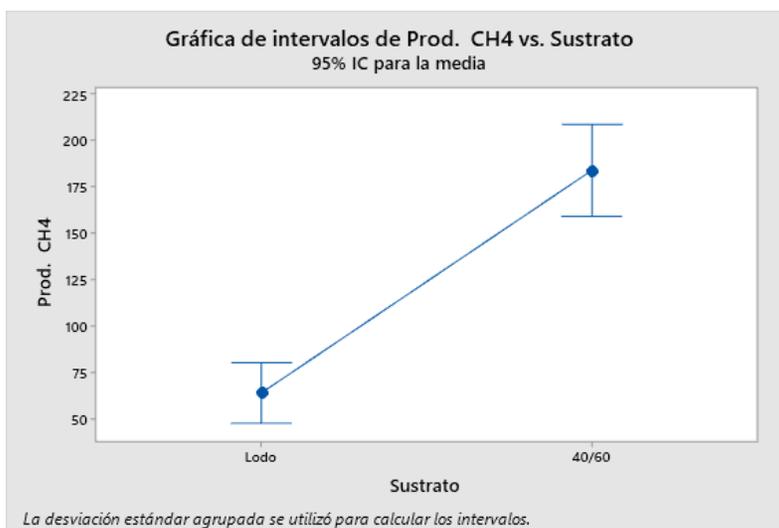
Lodo de purga y 40/60.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	69731	69731.0	70.57	0.000
Error	21	20750	988.1		
Total	22	90481			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	16	63.91	19.36	(47.56, 80.25)
2	7	183.6	50.2	(158.9, 208.3)



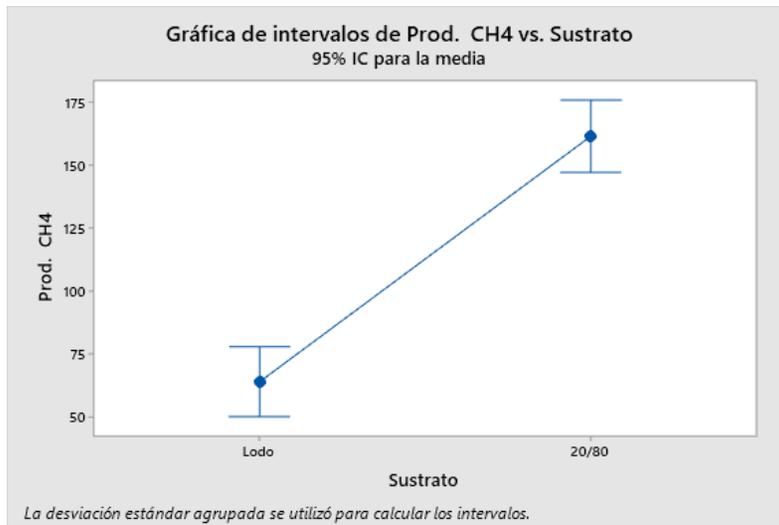
Lodo de purga y 20/80.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	CM Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	1	73920	73919.8	99.50	0.000
Error	29	21546	742.9		
Total	30	95465			

Medias

Sustrato	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
1	16	63.91	19.36	(49.97, 77.84)
2	15	161.62	33.72	(147.23, 176.01)



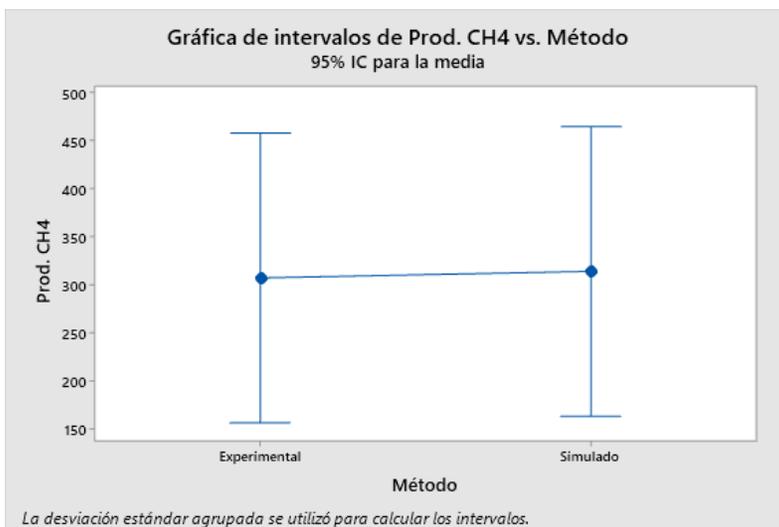
Experimental y Simulado

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Método	1	140	140.2	0.01	0.944
Error	10	273793	27379.3		
Total	11	273933			

Medias

Método	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	6	306.6	165.2	(156.1, 457.1)
2	6	313.4	165.7	(162.9, 463.9)



Interpretación del resultado

Una vez que se cuenta con la información generada previamente se procede a la interpretación de los resultados, así como a emitir una conclusión basada en ellos.

El valor p calculado para cada proceso de mono-digestión y co-digestión deberá compararse con el nivel de significancia (0.05) para evaluar la hipótesis nula. En las Tablas 9.1–9.3 se muestran los valores obtenidos a partir de cada uno de los análisis, así como la hipótesis resultante de la comparación del valor p con α de acuerdo con la regla de decisión.

Tabla 9.1 Resultados del valor p obtenidos e hipótesis aceptada para los sustratos comparados con la FORSU por individual.

Sustrato	Valor P	Hipótesis
F y LP	0.000	Alternativa
F y 80/20	0.770	Nula
F y 60/40	0.040	Alternativa
F y 40/60	0.000	Alternativa
F y 20/80	0.000	Alternativa

F: FORSU

Tabla 9.2 Resultados del valor p obtenidos e hipótesis aceptada para sustratos comparados con el Lodo de purga por individual.

Sustrato	Valor P	Hipótesis
LP y F	0.000	Alternativa
LP y 80/20	0.000	Alternativa
LP y 60/40	0.000	Alternativa
LP y 40/60	0.000	Alternativa
LP y 20/80	0.000	Alternativa

LP: Lodo de purga

Tabla 9.3 Resultados del valor p obtenidos e hipótesis aceptada para la prueba experimental y simulada.

Método	Valor P	Hipótesis
Experimental y Simulado	0.944	Nula

9.2 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS A TRAVÉS DE TÉCNICAS DE PROTEÓMICA

Extracción de proteínas y purificación por fenol básico

- Dos gramos de cada muestra (FORSU, Lodo anaerobio granular y Lodo de purga de PTAR) se maceran utilizando politrón.
- La muestra se coloca en 6 mL de fenol pH 8.8 y 5 mL de buffer de extracción (100mM tris HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-betamerceptoetanol).
- Se aplican 5 pulsos de 1 min en el politrón alternados por 1 min en hielo y posteriormente se mantiene en hielo por 10 min más.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 30 min.
- Tomar la fase orgánica, depositarla en un tubo de 50 mL nuevo y agregar 25 mL de acetato de amonio 100mM en metanol.
- Agitar y dejar reposar 16 h a -20 °C.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 30 min para obtener una pastilla de precipitado y descartar el sobrenadante.
- Lavar pastilla con 5 mL de acetato de amonio en metanol 2 veces y centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos después de cada lavado.
- Lavar la pastilla acetona al 80% dos veces y centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos después de cada lavado.
- Lavar la pastilla con etanol al 70% y resuspender en buffer de urea IEF.
- Cuantificar la cantidad de proteína en Nanodrop 2000.
- Analizar la integridad de proteínas en un gel de electroforesis SDS-PAGE 1D al 12%.
- Colocar un estándar de marcador molecular Precisión Plus de BIO-RAD como referencia e peso molecular para observar su integridad.
- Correr el gel a 70V por 2.5 horas (Figura 9.1).
- Desmontar el gel y colocar en solución colorante.

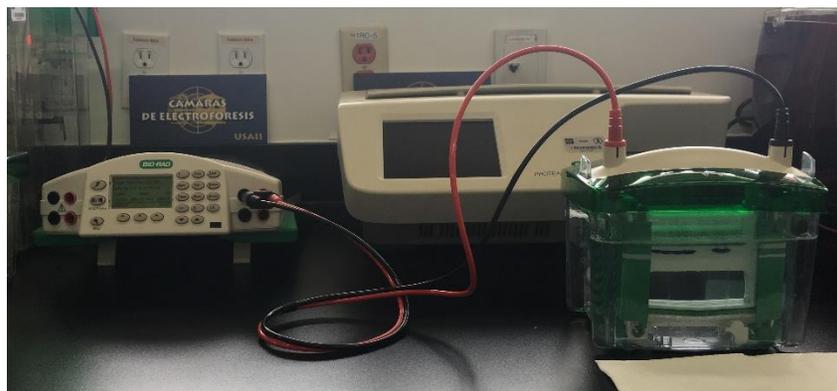


Figura 9.1. Cámara de electroforesis BIO-RAD.

Tinción con Coomassie coloidal

- Finalizada la electroforesis se procede a la fijación de las proteínas incubando los geles en una solución 50% v/v de metano y agua durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Retirar la solución de fijación.
- Incubar el gel en solución de tinción (8% p/v sulfato amónico, 2% ácido fosfórico, 20% metanol y 0.1% de Azul de Coomassie G-250) durante al menos 16 horas a temperatura ambiente.
- Desteñir el gel con agua bidestilada hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de las proteínas.

Captura de imágenes

- La adquisición de la imagen para análisis densitométrico se lleva a cabo en un sistema de densitómetro calibrado GS-900 BIO-RAD.
- Como resultado se obtienen imágenes de alta definición que muestra el patrón de bandeo correspondiente a cada muestra, así como del marcador molecular utilizado y de lisozima colocada como referente de carga y cantidad de proteínas, como se muestra en las Figuras 9.2 y 9.3.

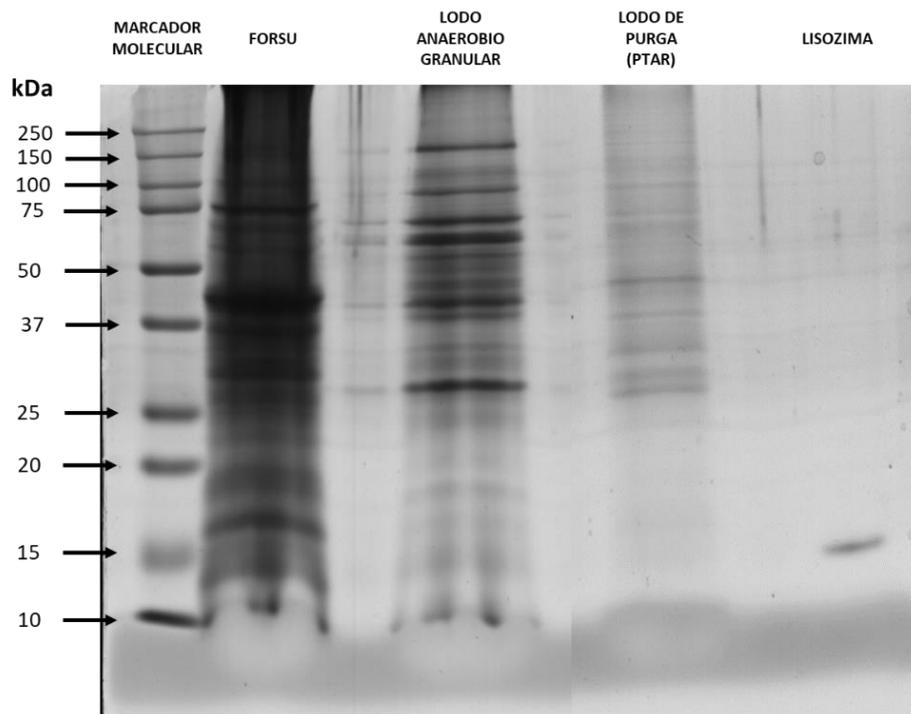


Figura 9.2. Patrón electroforético en 1D de las proteínas obtenidas por fenol básico (FORSU, Lodo anaerobio granular y Lodo de purga de PTAR) así como del marcador molecular y lisozima como referencia.

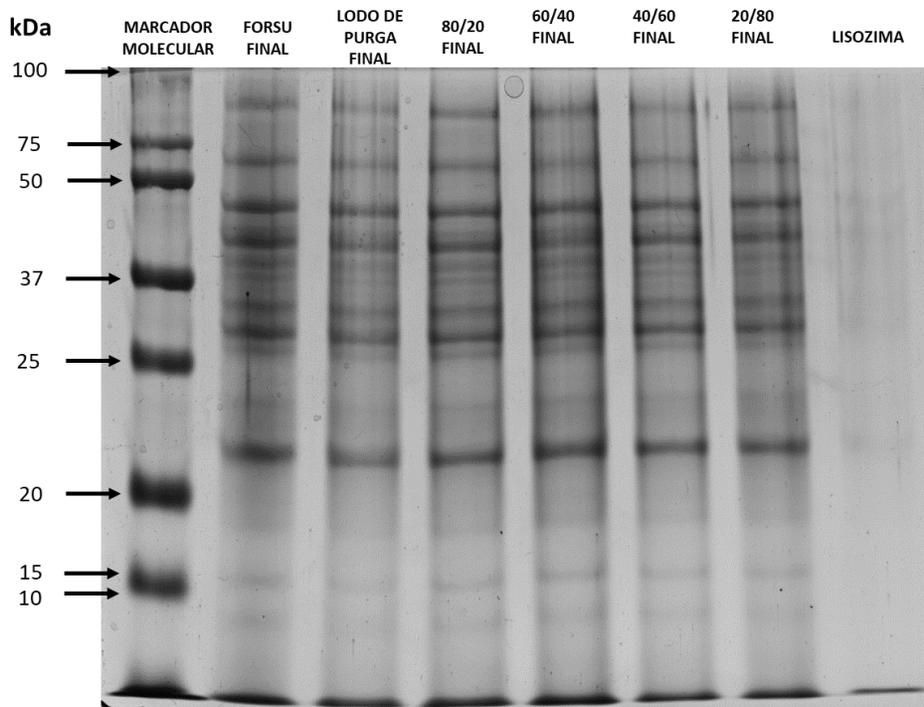


Figura 9.3. Patrón electroforético en 1D de las proteínas obtenidas por fenol básico (FORSU, Lodo de purga y las co-digestiones 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 todas al final del proceso, así como del marcador molecular y lisozima).

Cuantificación de proteínas

- Una vez obtenida la imagen se procede a su análisis a través del software Image Lab para determinar la cantidad de proteínas que se encuentran en cada una de las muestras analizadas.
- El software genera un reporte en el que se encuentra información referente a la calidad de la imagen, la configuración del análisis, parámetros de calibración del equipo y el análisis del volumen de proteínas presentes en las muestras.

Identificación de huella peptídica

- Elaboración de un gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% en el que se colocarán los extractos de proteínas de cada muestra para concentrarlas en un fragmento de gel que posteriormente será analizado.
- A través de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se lleva a cabo de determinación de los espectros de los iones de los péptidos de las proteínas de los microorganismos presentes en la muestra.
- Se establecen las posibles especies presentes en cada muestra para utilizarlas como referencia en el proceso de comparación posterior.
- Comparación de los resultados obtenidos con una base de datos especializada en proteínas para la identificación de los grupos taxonómicos correspondientes (PLGS. Protein Lynx Global Server y/o UniProt).