



**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**

---

---

**Integración de Residuos de la Industria Acuícola y Láctea en la  
Producción de Productos de Valor Agregado**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

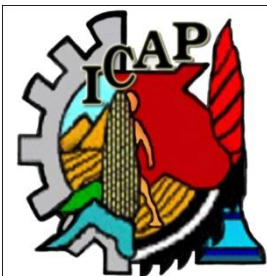
**MAESTRÍA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**Javier García Tolentino**

Director de Tesis: Dr. Rafael Campos Montiel

Asesores: Dra. Diana Jaqueline Pimentel González  
Dra. Aurora Quintero Lira



Tulancingo de Bravo, Hgo. Noviembre del 2011



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Agropecuaria  
Área Académica de Ingeniería Agroindustrial


Tulancingo de Bravo, Hgo. A 20 de Septiembre de 2011


M. en C. JULIO CESAR LEINES MEDECIGO  
Director de Control Escolar UAEH


A través de este conducto, los integrantes de la Comisión de Tesis titulada "**Integración de Residuos de la Industria Acuícola y Láctea en la Producción de Productos de Valor Agregado**", que presenta el **Ing. Javier García Tolentino**, le informamos que después de haber revisado el documento consideramos que cumple con los elementos suficientes de contenido y forma para su defensa oral en el Examen de Grado. Por ello expresamos nuestra aprobación para que se imprima y siga los trámites académicos y administrativos correspondientes.

Atentamente

Comisión Revisora

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rafael Germán Campos Montiel

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Aurora Quintero Lira



Rancho Universitario. Av. Universidad Km. 1  
Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32 CP 43600  
Tulancingo, Hgo.  
Tel. y fax 01 771 2000 Ext. 4641 775 753 3495



## **DEDICATORIA**

A mis padres, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado en toda mi formación profesional.

A Maricruz, por todo el amor, cariño y comprensión que has compartido conmigo en estos últimos años.

A Cruz Javier, que sin saber aún, me ayuda a superarme día a día.

A mis hermanos: Lupe, Roger y Bety, por buscar también sus caminos y hacer que la familia sea la base de todo en nuestras vidas.

A mis compañeros de maestría: Rosy, Eli, Roberto y Marco, gracias por compartir sus experiencias con un servidor.

A los compañeros de la carrera y sobre todo los mejores amigos: Marco, Raúl, Moy, Armando, Juan José, Enoch, José F., y Humberto.

Javier García Tolentino

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchas gracias doctor Rafael Campos, por todo el apoyo brindado en la elaboración de este trabajo, sobre todo por confiar en un servidor, aprendí muchas cosas de Usted en este tiempo.

A mis asesoras de Tesis: doctora Diana Jaqueline Pimentel González y a la doctora Aurora Quintero Lira por la revisión y sus aportaciones.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en especial a todos los profesores, que con su tiempo y esfuerzo aportaron mucho en mi experiencia profesional.

## INDICE

I INTRODUCCIÓN .....	1
II OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo General .....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
III HIPÓTESIS .....	4
IV REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
4.1 Residuos Sólidos Orgánicos .....	5
4.2 Residuos agroindustriales .....	5
4.2.1 Residuos agroindustriales .....	5
4.2.2 Residuos acuícolas .....	6
4.3 Lactosuero.....	6
4.4 Digestión Anaerobia .....	7
4.4.1 Principios químicos y microbiológicos de la Digestión Anaerobia (DA) .....	7
4.4.2 Hidrólisis.....	7
4.4.3 Acidogénesis .....	8
4.4.4 Metanogénesis.....	9
4.5 Abono orgánico .....	15
V ANTECEDENTES .....	16
VI MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
6.1 Localización del experimento.....	20
6.2 Descripción de la materia prima .....	20
6.2.1 Lactosuero ácido.....	20
6.2.2 Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (RSOPT).....	21
6.3 Establecimiento del experimento.....	21
6.4 Diseño de tratamientos .....	21
6.5 Variables de estudio para la producción de gas metano.....	22
6.5.1. Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	22
6.5.2 Determinación de azúcares totales (Técnica de Antrona).....	24

---

6.5.3	Potencial de Hidrógeno .....	25
6.5.4	Determinación de ácidos grasos volátiles por Electroforesis Capilar ...	25
6.5.5	Determinación de metano por cromatografía de gases .....	26
6.6	Variables de estudio del Biosol.....	27
6.6.1	Sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos (SF) .....	27
6.6.2	Determinación de Nitrógeno .....	28
6.6.3	Determinación de fósforo .....	30
6.6.4	Análisis microbiológicos.....	31
6.7	Ensayo Biológico.....	34
6.8	Análisis de resultados .....	35
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
7.1	Producción de biogás en una co-digestión de RSOPT con LA.....	36
7.1.1	Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	36
7.1.2	Evolución del pH.....	37
7.1.3	Azúcares totales .....	39
7.1.4	Ácidos Grasos Volátiles.....	39
7.1.5	Producción de Metano .....	41
7.1.6	Producción de CO <sub>2</sub> .....	42
7.2	Producción del biosol .....	43
7.2.1	Sólidos totales .....	43
7.2.2	Sólidos volátiles .....	44
7.2.3	Contenido de Nitrógeno y Fósforo .....	45
7.2.4	Sólidos fijos.....	47
7.2.5	Análisis microbiológicos .....	47
7.3	Bioensayo .....	48
7.3.1	Generación de biomasa del cultivo vegetal.....	49
	CONCLUSIONES .....	54
	BLIBLIOGRAFÍA .....	56

**INDICE DE TABLAS**

Cuadro 1. Composición de tratamientos: lactosuero (LA) y residuos sólidos orgánicos de la producción de Tilapia (RSOPT). .....	22
Cuadro 2. Contenido de nitrógeno en cada tratamiento y su aplicación al ensayo .....	35
Cuadro 3. Comportamiento del contenido de Azúcares de una co-digestión de RSOPT y LA .....	39
Cuadro 4. Contenido de N <sub>2</sub> y P al inicio y al final de la co-digestión RSOPT y LA. ....	46
Cuadro 5. Comportamiento de sólidos fijos (SF) en una co-digestión de RSOPT y LA. ....	47
Cuadro 6. Microorganismos contenidos al inicio y al final de la co-digestión de RSOPT y LA. ....	48

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Principales rutas metabólicas de la Digestión Anaerobia .....	11
Figura 2. Demanda Química de Oxígeno (mg/L), en una co-digestión de RSOPT y diferentes concentraciones de LA.....	37
Figura 3. Comportamiento del pH en una co-digestión de RSOPT y LA .....	38
Figura 4. Desarrollo del ácido acético de RSOPT en co-digestión con LA.....	40
Figura 5. Producción de metano en una co-digestión de RSOPT y LA.....	42
Figura 6. Contenido de CO <sub>2</sub> en una co-digestión de RSOPT y LA .....	43
Figura 7. Comportamiento de sólidos totales producto de la co-digestión de RSOPT y LA.....	44
Figura 8. Valores de sólidos volátiles en la co-digestión RSOPT y LA.....	45
Figura 9. Porcentaje de germinación obtenido en un biosol producto de la co-digestión RSOPT y LA .....	49

Figura 10. Crecimiento de raíz en un biosol producto de la co-digestión de RSOPT y LA ..... 50

Figura 11. Crecimiento vegetal del tallo en un biosol producto de la co-digestión de RSOPT y LA. .... 52

Figura 12. Crecimiento de hojas en un biosol producto de la co-digestion RSOPT y LA. .... 53



## RESUMEN

Una interesante opción para incrementar la digestión anaerobia de los residuos sólidos es la co-digestión y consiste en utilizar un co-sustrato para que exista un sinergismo al incluir en esta mezcla los nutrientes que no tenga el sustrato principal.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la adición del lactosuero en una co-digestión con residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia (RSOPT). Se trabajaron con bio-reactores de 4 litros sin controlar el pH ni la temperatura.

Se realizaron cuatro tratamientos los cuales contenían: 0, 12.5, 25 y 50 % de lactosuero. Se cuantificó demanda química de oxígeno (DQO), ácidos grasos volátiles (AGV), pH, metano, sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV), pH, coliformes fecales (CF), *Salmonella* sp. (SS), hongos (H), N<sub>2</sub>, P y la realización de un bioensayo para probar el biosol. Los resultados demostraron que la eficiencia de eliminación de DQO fue mayor al 90% en todos los tratamientos. Existieron diferencias significativas en el pH inicial ( $p > 0.05$ ), en la producción de metano el mejor tratamiento fue el 25% de lactosuero. Existe un coeficiente de correlación del 0.94 entre el aumento de sólidos totales y el incremento de LA. Se encontró una mayor eliminación de ST con el tratamiento del 50% de LA. La eliminación de STV fue directamente proporcional al aumento de LA. En

todos los tratamientos el pH final fue mayor a 7.4. Además, existió una buena mineralización en el nitrógeno y fósforo en el tratamiento de 50 % de LA durante la co-digestión. La reducción de CF, SS y H fue mayor a 99%.

En el ensayo de germinación, existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos en el crecimiento de tallo, hoja y raíz, influyendo ligeramente el tratamiento de 12.5 % de LA en el desarrollo del tallo a los 7 y 15 días del experimento.

Por lo anterior, se puede afirmar que la co-digestión de RSOPT con LA es una buena opción para producir biosoles para uso agrícola.

## I INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos orgánicos se refieren a la materia orgánica biodegradable con humedades por debajo de 85-90%. Una interesante opción para incrementar la digestión anaerobia de los residuos sólidos es la co-digestión. En este proceso se debe utilizar un co-sustrato para que exista un sinergismo al incluir nutrientes que no tenga el sustrato principal (Mata-Alvarez *et al.* 2000). Para que sean viables estos procesos, es importante que los componentes de la co-digestión se encuentren en la misma zona para disminuir los costos. En trabajos reportados por Suárez *et al.* (2008), se encontró que el fertilizante orgánico obtenido en la co-digestión de estiércol y lactosuero fue de la misma calidad sin importar la concentración del lactosuero. La facilidad de la co-digestión de los sedimentos de aguas residuales y una simulación de Residuos Sólidos Municipales (por sus siglas en inglés, OFMSW) fueron examinadas por Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz (1992)., y encontraron que los beneficios de la mezcla de estos residuos se refieren a la dilución de componentes tóxicos potenciales, para mejorar el balance de nutrientes, el sinergismo de los microorganismos y el incremento de la materia orgánica biodegradable. Estos autores afirmaron que la digestión de los nutrientes de los desechos sólidos y la diversidad de bacterias de varios desechos optimizan los procesos de digestión. Hartmann y Ahring (2005), realizaron experimentos a nivel laboratorio de mezclas de un reactor con estiércol de vaca y OFMSW con bacterias termófilas, encontrando que la co-digestión tuvo procesos más

estables. Otro experimento fue elaborado por Carucci *et al.* (2005), donde la mezcla fue producto de los sedimentos de una planta tratadora de aguas industriales y residuos de comida, los resultados mostraron que la co-digestión tuvo una mejor digestión anaerobia reduciendo la inhibición de la metanogénesis.

## II OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la adición de lactosuero en co-digestión de residuos sólidos orgánicos de la producción de Tilapia.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar los procesos bioquímicos durante el proceso de digestión anaerobia.
- Cuantificar la estabilización de sólidos para la obtención de un biosol
- Probar el biosol mediante un bioensayo

### **III HIPÓTESIS**

La co-digestión de residuos sólidos orgánicos de la producción de Tilapia con lactosuero mejorará la producción de biogás y de biosoles.

## IV REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Residuos Sólidos Orgánicos

Normalmente se entiende como un residuo biodegradable con un contenido de humedad entre 85 y 90 %. Existen muchos criterios sobre los términos pero uno de los conceptos más relevantes es el usado por autores como: Fracción Orgánica de Residuos Sólidos Municipales, (OFMSW siglas en inglés), (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

### 4.2 Residuos agroindustriales

#### 4.2.1 Residuos agroindustriales

Pese a su importante contribución al desarrollo agrícola y general, la agroindustria perjudica el medio ambiente: descarga residuos orgánicos o peligrosos en los suministros hídricos; emisión de polvo o gases que empeoran la calidad del aire y producen sustancias tóxicas. La gravedad de los problemas de contaminación provocados por la actividad agroindustrial varía mucho. Industrias de elaboración de productos agrícolas, como las fábricas de azúcar, pueden llegar a ser no sólo autosuficientes en energía mediante la conversión de los residuos de biomasa.

Los riesgos y peligros causados por la contaminación agroindustrial pueden ser muy graves y percibirse inmediatamente, ya que tales industrias tienden a concentrarse en zonas urbanas y locales. Por último, la incidencia de los residuos y contaminación agroindustriales depende en gran medida de la eficiencia del marco legislativo y de las medidas reglamentarias que se adopten para proteger el medio ambiente (FAO, 1997).

#### **4.2.2 Residuos acuícolas**

Según la SAGARPA, en el 2009 se produjeron en Hidalgo 6,300 toneladas de peces en presas y estanques, mismas que generaron un gran contenido de residuos sólidos producto del manejo de la actividad pesquera, parte de esos residuos (lodos), son utilizados como abonos o en su defecto son vertidos a las corrientes de agua.

#### **4.3 Lactosuero**

El lactosuero es un subproducto de la separación de la cuajada durante el proceso de fabricación del queso y uno de los desechos más contaminantes de la industria alimentaria. Cada kilogramo de queso producido genera 9 kilogramos de suero y anualmente, a nivel mundial, se producen 110 millones de toneladas (Padín-González, Díaz-Fernández, 2009).



## **4.4 Digestión Anaerobia**

La digestión anaerobia incluye la ruptura de casi todos los tipos de materia orgánica por la acción de una amplia variedad de microorganismos en especial de bacterias, en ausencia de oxígeno o de otros agentes oxidantes, (*Bermúdez et al.*, 1988), donde los productos resultado son metano y CO<sub>2</sub> y cantidades menores al 1% del volumen del gas de N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S.

### **4.4.1 Principios químicos y microbiológicos de la Digestión Anaerobia (DA)**

La DA es un proceso complicado que transforma a los compuestos orgánicos en Metano y CO<sub>2</sub>, en condiciones libres de oxígeno. Generalmente se clasifican tres etapas que determinan todo el proceso de biodigestión: hidrólisis o licuefacción, acidogénesis y metanogénesis, (*Zaher et al.*, 2007).

### **4.4.2 Hidrólisis**

La Hidrólisis o licuefacción consiste en la descomposición de grandes sustancias orgánicas, complejas e insolubles en pequeñas que pueden ser transportadas a las células microbianas para ser metabolizadas por enzimas extracelulares, tales como celulasas, proteasas y lipasas. La hidrólisis puede realizarse por separado utilizando métodos aeróbicos, térmicos, químicos o enzimáticos. Esencialmente la estabilización de los residuos orgánicos no se produce durante la hidrólisis, la

materia orgánica simplemente se convierte en una forma soluble que puede ser utilizada por las bacterias, (Zaher *et al.*, 2007).

La primera etapa, se puede convertir en la limitante de la digestión anaerobia cuando los polímeros a hidrolizar y fermentar son poco solubles, tóxicos o de difícil biodegradación. Por el contrario, si los sustratos son solubles y fácilmente hidrolizables y fermentables, la primera etapa ocurre sin mayor problema, dado su carácter termodinámicamente exergónico (fenómeno o reacción química que libera energía). En este caso en particular, será necesario evitar una sobrecarga de sustratos, y por lo tanto, una sobreproducción de ácidos grasos que pudieran disminuir el pH del sistema a niveles inhibitorios para la microflora. Cuando hay una sobrecarga en un digestor, la acumulación de ácidos grasos volátiles puede inducir un pH menor a 6.2, el cual, resulta inhibitorio para la población, (Montiel-Bustos, 2010).

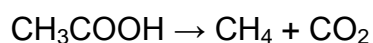
#### **4.4.3 Acidogénesis**

La etapa de acidogénesis es una fase compleja que involucra la fermentación, formación de ácidos, producción de hidrógeno y un paso acetogénico (formación de ácido acético). Una vez que los compuestos orgánicos complejos son hidrolizados, las bacterias acidogénicas convierten los azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos más pequeños en hidrógeno y dióxido de carbono. Los productos que se forman varían con los tipos de bacterias así como

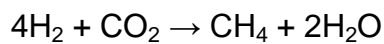
con las condiciones ambientales. La comunidad de bacterias responsables de la producción de ácido pueden incluir bacterias anaerobias facultativas, anaerobias estrictas o ambas, (por ejemplo: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*). El hidrógeno es producido por bacterias acidogénicas y acetogénicas. Las Bacterias acetogénicas tales como *Syntrobacter wolini* y *Wolfei syntrophomonas* convierten los ácidos grasos volátiles (por ejemplo, ácido propiónico y el ácido butírico) y alcohol, en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, que se utilizan en la metanogénesis. Estos microorganismos están relacionados y pueden tolerar una amplia gama de condiciones ambientales. Bajo condiciones normales, la presencia de hidrógeno en solución inhibe la oxidación, por lo que las bacterias del hidrógeno están obligados a soportar la conversión de todos los ácidos (Zaher *et al.*, 2007).

#### **4.4.4 Metanogénesis**

La formación de metano, que es el producto final del tratamiento anaeróbico, se produce por dos principales rutas. El ácido fórmico, ácido acético, el metanol y el hidrógeno se puede utilizar como fuentes de energía por los diferentes microorganismos metanógenos. La ruta principal es la fermentación de los productos de la fase acidogénica, es decir, el ácido acético, a metano y dióxido de carbono. Las bacterias que utilizan ácido acético son bacterias acetoclásticas (grupo de bacterias acéticas). La reacción general es:



El grupo acetoclástico comprende dos géneros principales: *Methanosarcina* y *Methanotherix*. Durante la digestión termofílica de residuos lignocelulósicos, las bacterias del género *Methanosarcina* es el grupo más dominante encontrado en el bioreactor. Cerca de dos tercios del gas metano se obtiene a partir de la conversión del acetato por medio de los metanógenos acetoclásticos. Algunos metanógenos usan el hidrógeno para reducir el dióxido de carbono a metano (metanógenos hidrogenofílicos), (Zaher *et al.*, 2007), de acuerdo con la siguiente reacción global:



Un esquema básico de las vías del metabolismo anaeróbico se puede observar en la Figura 1. El acetato es un producto final común de la acidogénesis, que es fácilmente convertido a metano en la fase metanogénica. Debido a la dificultad de aislar anaerobios y la complejidad de los procesos de bioconversión, aún queda mucho sin resolver acerca de la digestión anaerobia.

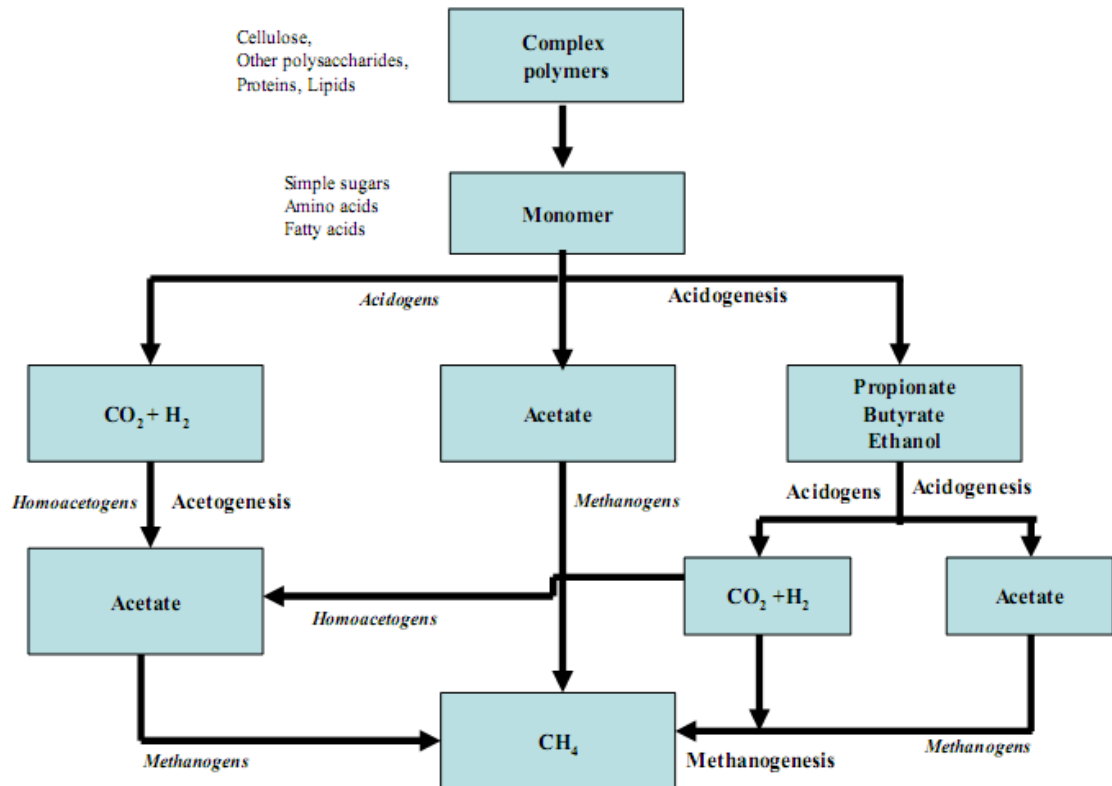


Figura 1. Principales rutas metabólicas de la Digestión Anaerobia, (Zaher *et al.*, 2007).

#### 4.5 Tiempo de retención

El tiempo de retención es la duración media en la que se digiere la materia orgánica. Cuanto más tiempo se mantiene un sustrato bajo condiciones apropiadas, la degradación será más completa. La tasa de reacción, sin embargo, disminuye con el tiempo de residencia en aumento, por lo que no es un óptimo en el costo eficaz de la digestión, en función de la materia prima, las condiciones y el uso de la digestión. Si se reduce el tamaño del digester el tiempo de retención será menor, lo que resulta en ahorros de costos y conduce a un incremento en las tasas de producción por unidad de volumen del

reactor, además de un nivel más bajo de la degradación y el mayor rendimiento de gas. Los intervalos de tiempo de retención varían entre 14 y 30 días para la mayoría de procesos en seco, y puede ser tan bajo como de 3 días para los procesos en húmedo. El valor óptimo varía de acuerdo a la tecnología, detalles del proceso, temperatura y composición de los residuos. Para un digestor específico, incluso puede cambiar día a día con el cambio de materia prima o de una estación a otra con el cambio de temperaturas (Buekens, 2005).

#### **4.6 Sinergismo**

Son diversos tratamientos que a menudo se han combinado entre sí para lograr un mayor grado de solubilización. Muchas combinaciones diferentes, tales como termo-químico, termo-mecánico y químico-mecánica se han aplicado a tratamientos previos que basados en combinados de diferentes mecanismos de acción permitirá la reducción no sólo de requerimiento de energía, sino también lograr una mayor solubilización. Una vez que la diferencia es positiva, es decir, la solubilidad del pre-tratamiento combinado es mayor que la suma del pre-tratamiento individual, puede ser llamado "efecto sinérgico". A través del efecto sinérgico, se tiene un ahorro de energía y se puede alcanzar una mayor aplicación práctica del tipo de tratamiento (Cho, S.K., 2010).

## **4.7 Co-digestión**

Recientemente, ha surgido un gran interés en la producción de biogás a partir de desechos agropecuarios, principalmente por los deseos del gobierno para disminuir la dependencia energética del país de los combustibles fósiles debido a la tendencia decreciente de la producción de petróleo. La Biocombustión de residuos orgánicos y otros desechos generados por la agricultura o de negocios agroindustriales es ahora una opción. El beneficio obtenido que genera el proceso de co-digestión mediante la mezcla de dos o más residuos orgánicos en digestión anaeróbica es que un microorganismo siempre puede obtener los requisitos necesarios para su reproducción. Este proceso comienza cuando un compañero de sustrato utiliza los nutrientes que el sustrato principal no tiene para producir una sinergia mediante la inclusión en la mezcla. Para que la co-digestión sea viable es necesario utilizar sustratos que son fáciles de obtener (Villegas-Cardenaz, 2010).

## **4.8 Energía Renovable**

Se refiere a todas las técnicas utilizadas para la obtención de energía utilizada a beneficio del hombre. En su libro sobre energía renovable, Sorensen (2004), comenta que la relación entre las actividades económicas y el bienestar social ha sido debatido durante un buen tiempo en relación a los límites sobre la explotación de los recursos naturales del planeta, donde algunos expertos indican que es el hombre quien tiene que dar solución a la amenaza de dichos recursos, buscando alternativas antes de agotar la energía fósil y nuclear.

## **4.9 Biosólidos**

Para Ríos del Águila, (1992), si el bioabono es sólido se denomina biosol, si es líquido se denomina biol. Este último puede ser incorporado o aplicado directamente a la planta. Mirrales R. *et al.* (2002), define a los biosólidos como la depuración de aguas residuales antes de ser vertidas a otros receptores que generan grandes cantidades de residuos. Del saneamiento de cuencas se genera un subproducto denominado biosólido, que corresponde a lodos estabilizados que contienen nutrientes y materia orgánica, constituyéndose en fuente importante de elementos esenciales para el mejoramiento del suelo y el desarrollo de especies vegetales (Araya-Castillo, 2008).

## **4.10 Biosol**

Para efectos de este trabajo el biosol se entiende como el resultado de la digestión anaerobia de desechos agroindustriales en co-digestión con otros sustratos que puede ser utilizado en la agricultura ya que se considera un biofertilizante de tipo “B” (SEMARNAT, 2002).

## **4.11 Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)**

Si esta relación es alta, es decir, con poca concentración de nitrógeno, traerá como consecuencia que algunas bacterias mueran por falta de éste, empleando las restantes el nitrógeno que constituyen las células de aquéllas. Si la relación es baja, por el contrario el carbono se terminará antes que el nitrógeno, originando



que el proceso de fermentación se detenga y posteriormente el material perderá el nitrógeno remanente. La idea de la digestión anaeróbica es convertir todo el carbono posible a metano (CH<sub>4</sub>), con la menor pérdida posible de nitrógeno (Amaya, 1990).

#### **4.5 Abono orgánico**

El uso de fertilizantes orgánicos no está limitado al uso de compostas de manera normal, sino que se remonta al estudio y elaboración de fermentaciones en las que se descomponen residuos orgánicos con el uso de microorganismos de los mismos compuestos (Herrán *et al.*, 2008). Disminuyendo la carga eléctrica de las soluciones y los microorganismos, dejando compuestos utilizables para las plantas.

## V ANTECEDENTES

El mundo moderno requiere de acciones que ayuden a contrarrestar el daño que como humanos hemos hecho al planeta, para ello es necesario utilizar técnicas ya existentes y las que faltan por descubrir con el único fin de ayudar a generar nuevas formas de proporcionar energía.

Una de estas técnicas resulta ser el aprovechamiento de los residuos "sólidos" orgánicos, término aún no muy preciso. Normalmente se entiende como residuos orgánicos biodegradables con un contenido de humedad inferior al 85-90% (Mata-Álvarez, 2000). Hay muchos desechos agrícolas e industriales de gran impacto en el ambiente de nuestro país que normalmente son vertidos a corrientes de agua, tal es el caso del lactosuero ácido de la producción de queso tipo "Oaxaca" en el Valle de Tulancingo. Así como los lodos que se extraen de algunas granjas de cultivo de peces, que solamente se utilizan para sanear los suelos agrícolas erosionados.

Los desperdicios de alimentos es un problema creciente, y su eliminación es objeto de controversia, causando un aumento de precios debido a los recursos que se tienen que erogar para corregir este problema. Los desperdicios de alimentos constituye un estimado de 8.4 % en peso de los residuos sólidos urbanos en los Estados Unidos, en el Reino Unido, cada hogar compra en promedio 16.5 kg de alimentos a la semana y lanza un tercio de ella. Los residuos de alimentos incluyen los alimentos no consumidos y restos de preparación de alimentos de las residencias, establecimientos comerciales, tales como:

restaurantes, instituciones, cafeterías de las escuelas, comedores de fábricas, etc. Los desperdicios de productos alimenticios es el componente más grande del flujo de residuos en peso en los EE.UU. Este país tira unos 43.6 millones de toneladas de alimentos cada año (Sedláček *et al.*, 2010).

La digestión anaeróbica se puede aplicar para convertir la biomasa vegetal, residuos agrícolas y cultivos energéticos, es decir, las plantas cultivadas específicamente con el fin de producir energía, biogás rico en metano, una fuente de carbono neutral de la energía renovable doméstica. El interés en el uso de metano para la generación de calor y electricidad, así como la mejora del biogás como combustible de vehículos, ha crecido con el fin de aumentar la cuota de renovación en la producción de electricidad y se reúnen para ello, entre otros, la Unión Europea (UE), con el objetivo de aumentar los biocarburantes en los vehículos hasta el 5,75% en el año 2010 (Parlamento Europeo, 2003), (Lehtomäki *et al.*, 2006).

Los cultivos energéticos y residuos de cultivos pueden ser digeridos ya sean solos o en colaboración con la digestión de otros materiales y mediante el empleo de cualquiera de los procesos húmedos o secos. En el sector agrícola una posible solución a la biomasa de cultivos de procesamiento es la co-digestión con estiércol animal, que es el mayor flujo de residuos agrícolas. Además de la producción de energía renovable, la digestión anaerobia controlada de estiércol de animales reduce las emisiones de gases de efecto invernadero, el nitrógeno y el olor del

estiércol, y se intensifica el reciclaje de nutrientes dentro de la agricultura, (Lehtomäki *et al.*, 2006).

Debido al incremento en el costo de los fertilizantes químicos y a la contaminación que algunos propician en el ambiente cuando se utilizan irracionalmente, es necesario encontrar nuevas alternativas de fertilización, económicas y más eficientes. Se considera como una alternativa viable la utilización de las fuentes orgánicas locales y regionales que tradicionalmente se han sub-utilizado, entre las que destacan las excretas líquidas de cerdo (Soria *et al.*, 2001). Es por ello las nuevas técnicas de energías renovables generan un doble beneficio al generar mediante la digestión anaerobia, por un lado biogás, y al final del proceso un fertilizante orgánico que puede ser incorporado a los cultivos.

Takashima y Tanaka (2010), consideran que la digestión anaeróbica puede ser una tecnología clave para el tratamiento de lodos de sistemas mejorados de reutilización, ya que el proceso produce un biogás rico en metano adecuado para la producción de energía. Además, cuando la digestión es rica en nutrientes, pueden ser utilizados como fertilizantes, mientras que su retorno de carga para el sistema de tratamiento de aguas residuales puede causar problemas. Recientemente, cuando realizaron estudios a escala de lodos depurados en digestión anaerobia en combinación con un tratamiento térmico ácido, los autores encontraron que la liberación de fosfato de lodo digerido es drásticamente mejorado con el ácido sulfúrico como el ácido fuerte, no con el ácido clorhídrico, liberando fósforo, y haciendo más rico al fertilizante orgánico.

Debido a los problemas ecológicos y económicos provocados por el uso intensivo e inadecuado de los fertilizantes minerales sintéticos, la agricultura mundial en los últimos años está encaminada a lograr una agricultura sostenible sobre la base de obtener altos rendimientos con aplicación de bajos insumos de estos productos y ha revitalizado la idea de hacer uso de productos de origen orgánico, teniendo en cuenta lo anterior, el beneficio que representa la aplicación de biosólidos en el suelo desde el punto de vista ecológico y agrícola en áreas urbanas, se proponen trabajos cuyo objetivo es evaluar la respuesta del crecimiento de plántulas de cultivos en diferentes sustratos (Utria-Borges *et al.*, 2008).

La mayoría de los estudios realizados en México sobre el tratamiento de los residuos sólidos orgánicos se basan en los rellenos sanitarios, así como el tratamiento de aguas residuales, de los cuales se obtiene los lodos que son tratados para obtener biosólidos, que son utilizados en prácticas agrícolas. Se tiene muy poca información sobre el tratamiento de desechos agroindustriales tales como: sangre de rastros, lactosuero, granjas avícolas, porcícolas y acuícolas, que para muchos es considerado un desperdicio y para los expertos en la materia de digestión anaerobia, se consideran como una fuente de materia prima capaz de ser transformada en componentes de interés comercial.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Localización del experimento

Para las pruebas experimentales del trabajo se hizo uso del laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) y los Laboratorios del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTA) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

### 6.2 Descripción de la materia prima

#### 6.2.1 *Lactosuero ácido*

Se trabajó con lactosuero ácido, el cual fue proporcionado por la planta procesadora de quesos perteneciente a la UAEH que se ubica en el Rancho Universitario de la misma. Éste se recolectó después del proceso de la elaboración del queso tipo Oaxaca.

### **6.2.2 Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (RSOPT).**

Se obtuvo residuo sólido orgánico de la producción de peces Tilapia, en estado fresco, el cual fue proporcionado por la granja de policultivos ubicada en el municipio de Tezontepec de Aldama, Hidalgo.

### **6.3 Establecimiento del experimento**

El trabajo experimental consistió en tres etapas:

- La primera fue la producción de gas metano determinando: pH, DQO, Azúcares y AGV's.
- En la segunda etapa fue la producción de un fertilizante orgánico (BIOSOL) donde se cuantificaron: ST, SF, STV, N<sub>2</sub>, P, *salmonella*, coliformes totales y hongos.
- La tercera consistió en la realización de un ensayo biológico de germinación en semillas de alfalfa.

### **6.4 Diseño de tratamientos**

Se realizaron cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de lactosuero: 0, 12.5, 25 y 50 % como se muestra en la Tabla 1, en co-digestión con el RSOPT.

Se trabajaron con reactores de 4 L con 5 repeticiones, sin control de pH ni temperatura, simulando las condiciones ambientales del Valle de Tulancingo.

**Cuadro 1. Composición de tratamientos: lactosuero (LA) y residuos sólidos orgánicos de la producción de Tilapia (RSOPT).**

	T1	T2	T3	T4
LA	50%	25%	12.5%	0%
RSOPT	50%	50%	50%	50 %
Agua	0%	25%	37.5%	50%

T1, T2, T3, T4: Tratamiento 1, 2, 3, y 4.

Los reactores fueron muestreados semanalmente para la cuantificación de biogás, y cada 15 días se abría una repetición para monitorear la evolución del proceso de biodigestión. Dichas muestras fueron congeladas a  $-4^{\circ}\text{C}$  para evitar cambios antes de realizar los análisis pertinentes.

## 6.5 Variables de estudio para la producción de gas metano

### 6.5.1. Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)

En este análisis se empleó un agente químico fuertemente oxidante en medio ácido para la determinación del equivalente del oxígeno de la materia orgánica que puede oxidarse. El dicromo de potasio es el agente usado para este propósito.



El ensayo debe hacerse a elevadas temperaturas, además de que es preciso utilizar un catalizador (sulfato de plata) para facilitar la oxidación de determinados tipos de compuestos orgánicos (APHA/AWWA/WPCF, 1989).

Las concentraciones de materia orgánica se determinaron por el método colorimétrico de DQO, para el cual se requirió preparar las siguientes soluciones:

1. Solución digestora: se disolvieron 10.216 g de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), previamente secado a 150 °C durante dos horas, en 500 mL de agua destilada, se añadieron lentamente 167 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y 33.3 g de sulfato de mercurio ( $HgSO_4$ ) posteriormente se aforó con agua destilada a 1 L.

2. Reactivo de ácido sulfúrico: se disolvieron 10.29 g de Sulfato de Plata ( $Ag_2SO_4$ ) en 1 L de ácido sulfúrico. Se tomaron 2 mL de la muestra y se vertieron en un tubo HACH, se le adicionaron 2 mL de reactivo de ácido sulfúrico y 1 mL de solución digestora, después se calentó durante 2 horas a 150 °C en el Microprocessor block heater marca Lab-Line modelo 2006 fabricado en Estados Unidos. Posteriormente se registró la lectura en el espectrofotómetro marca Milton Roy, modelo Spectronic 20D fabricado en Estados Unidos, a 620 nm. Se calculó la DQO tomando como base una curva patrón de diftalato de potasio (KHP) de 0, 250, 500, 750 y 1000 mg/L (APHA/AWWA/WPCF, 1989).

### **6.5.2 Determinación de azúcares totales (Técnica de Antrona)**

En la cuantificación de azúcares totales se aprovechan las propiedades químicas de los monosacáridos. Una vía muy general es la deshidratación en caliente y en medio ácido de los grupos oxidrilo (OH), que conducen a la formación de compuestos intermedios como el furfural para las pentosas y el 5-hidroximetil furfural para las hexosas. Estos compuestos se pueden cuantificar directamente midiendo su absorbancia. En el método con reactivo de antrona (9,10-dihidro-oxoantraceno), los derivados furfurálicos condensados de esta, dan un color azul verdoso cuya absorbancia se mide a 625 nm. (Trevelyan y Harrison, 1952). Se diluyeron 200 mg de antrona previamente secados en 100 mL de ácido sulfúrico frío. Para determinar concentraciones de azúcares totales se tomó 1 mL de muestra previamente filtrada y se le adicionaron 2 mL de reactivo de antrona en un tubo de ensayo según la técnica de antrona, después se colocaron en baño María a ebullición durante 10 minutos. Se dejó enfriar y se registró la lectura a 625 nm en el espectrofotómetro marca Milton Roy, modelo Spectronic 20D fabricado en Estados Unidos. Los cálculos de las concentraciones de azúcares totales se realizaron tomando como base una curva patrón de glucosa con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L.

### **6.5.3 Potencial de Hidrógeno**

La evaluación electrométrica del pH (NMX-FF-109-SCFI-2007), se basa en la determinación de la actividad del ion  $H^+$  mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al  $H^+$ . La medición del pH es una de las pruebas más importantes y frecuentes. Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro marca Hanna Instruments modelo 211 fabricado en Portugal, calibrado con soluciones tampón con pH de 7 y 4. La muestra se agitó para obtener una mezcla homogénea, se introdujo el electrodo y se registró la lectura una vez estabilizada.

### **6.5.4 Determinación de ácidos grasos volátiles por Electroforesis Capilar**

La electroforesis capilar es un método de separación por carga y tamaño molecular, el cual en general se basa en la separación de los iones: los iones negativos que tienden a migrar hacia el voltaje más alto y los iones positivos hacia el voltaje más bajo, sin importar que se encuentre en solución o en forma de gas, de ahí que, un cuerpo cargado se coloca sobre un campo eléctrico, en el que la velocidad promedio de migración de una especie de analito, es proporcional a la carga eléctrica de un ion, también es proporcional al voltaje medio que se aplica.

Es necesario amortiguar las soluciones que se separan para asegurar que la carga permanezca igual en cualquier medio ácido o básico, de ahí el empleo de buffers como el imidazol. La electroforesis separa los iones según sus diferentes relaciones de cargas con respecto al tamaño (Rubinson y Rubinson, 2000).

La determinación de ácidos grasos volátiles (AGV's) se llevó a cabo en un equipo de electroforesis capilar (marca Beckman Coulter modelo P/ACEMDQ Glycoprotein System, fabricado en Estados Unidos), con un capilar de sílica fundida, con una longitud de inyección a detección de 40 cm., con una presión de nitrógeno en el capilar de 0.5 p.s.i., la separación se realizó a temperatura constante del capilar, la lectura del detector UV se realizó a 214 nm. El amortiguador que se utilizó es una solución de Ácido Benzóico ( $C_6H_5COOH$ ) 10mM, Histidina 10mM y Bromuro de Tetradecil Trimetil Amonio (TTAB) 1mM ajustando el pH a 6 con NaOH 1M (Arellano *et al.*, 2000).

Primero se inyectó un testigo que consistió en una mezcla de ácido acético 100 ppm, propiónico 100 ppm y butírico 100 ppm (1:1:1). Después, se determinaron las concentraciones de AGV's (ácido acético, propiónico y butírico) a muestras previamente filtradas por medio de un filtro de 0.45  $\mu m$ . Finalmente con base en los tiempos de las áreas de los cromatogramas se identificó el tipo de AGV's y de acuerdo con las concentraciones de cada uno de los componentes del testigo se realizaron los cálculos.

### **6.5.5 Determinación de metano por cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es el método de elección para separar y analizar compuestos orgánicos con punto de ebullición inferior a 250 °C y los gases fijos, ambos grupos tienen presión de vapor suficientemente altas de manera que pueden ser transportadas por la fase móvil gaseosa.

El gas metano se determinó por medio de un cromatógrafo de gases Perkin Elmer modelo Autosystem XL fabricado en Estados Unidos. Se utilizó una columna capilar Elite Plot-Q (DVB Plot column) de 30 m de longitud. El nitrógeno se utilizó como gas acarreador. La temperatura del detector fue de 200° C, la del inyector de 150°C y la de la columna de 50°C (APHA/AWWAWPCF.,1989).

## **6.6 Variables de estudio del Biosol**

### **6.6.1 Sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos (SF)**

El principio de esta determinación es la evaporación de la muestra en una cápsula de porcelana a peso constante en un horno a una temperatura de entre 103 y 105 °C durante 24 horas.

Para determinar los sólidos totales se colocó una cápsula de porcelana a 103-105°C durante 24 horas en un horno para secado y esterilizado marca Craft fabricado en México, después se colocó en un desecador durante 1 hora, se registró el peso de la cápsula (peso 1), posteriormente se colocó la muestra en la cápsula para evaporarla a 103-105 °C durante 24 horas. El aumento de peso sobre la cápsula (peso 2) representará los sólidos totales.

Para la determinación de la fracción volátil y fija de la muestra, el residuo que se obtuvo después del secado se incineró en una mufla marca Lunderg Blue, con número de serie BF 51700 fabricada en Estados Unidos a una temperatura de 500 °C ± 50 °C durante 2 h. El peso de la cápsula después de la incineración (peso 3) representa los sólidos totales fijos, mientras que la pérdida de peso por la

incineración representará a los sólidos volátiles (APHA/AWWA/WPCF., 1989). Los porcentajes de sólidos totales, sólidos volátiles y sólidos fijos, se determinaran mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% ST = \frac{(A - B) * 100}{C - B}$$

$$\% SV = \frac{(A - D) * 100}{A - B}$$

$$\% SF = \frac{(D - B) * 100}{A - B}$$

Donde:

ST: Sólidos Totales

SV: Sólidos Volátiles

SF: Sólidos Fijos

A: Peso de la muestra deshidratada + peso de la cápsula de porcelana

B: Peso de la cápsula de porcelana

C: Peso de la muestra fresca + peso de la cápsula de porcelana

D: Peso de las cenizas + peso de la cápsula de porcelana

### **6.6.2 Determinación de Nitrógeno**

Para determinar el contenido de Nitrógeno en el experimento se utilizó el método Kjeldahl, mediante la preparación de las siguientes soluciones:

1. Disolución indicadora de ácido bórico (2 %): se pesaron 20 g de ácido bórico seco y se disolvieron en 500 mL de agua y se aforó a 1 L.
2. Disolución de ácido sulfúrico (0.1 N): se pesaron 49.03 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 500 mL de agua, se enfrió a temperatura ambiente y aforó a 1 L. Se calculó la normalidad exacta de la disolución.
3. Reactivo para la digestión: se pesaron aproximadamente 200 g de sulfato de potasio y 20 g de sulfato cúprico penta-hidratado, se trituró en un mortero el sulfato cúprico penta-hidratado y se mezcló con el sulfato de potasio hasta obtener una mezcla homogénea.
4. Disolución de hidróxido de sodio (30%): se pesaron 300 g de hidróxido de sodio y se disolvieron con agitación constante dentro de un recipiente con hielos en aproximadamente 800 mL de agua, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 1 L.

El análisis se llevó a cabo en 3 etapas, la primera es la digestión en ácido sulfúrico, la segunda consiste en una destilación con hidróxido de sodio (NaOH) y finalmente una valoración con ácido bórico ( $H_3BO_3$ ). El estudio se realizó en el equipo Kjeldahl marca Büchi fabricado en Suiza. Se pesaron 0.5 g de la muestra y se agregó al matraz Kjeldahl junto con 5 g de mezcla digestora y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ). Se calentó el matraz en la Unidad de Digestión marca Büchi modelo B-426 hasta que se produjo un cambio en la coloración (verde transparente) y se terminó la digestión (aproximadamente 2 h).

Posteriormente para la destilación, en un matraz Erlenmeyer se agregaron 50 mL de ácido bórico y 3 gotas de rojo de metilo, mientras que en el matraz Kjeldahl se

agregaron 20 mL de agua destilada y la cantidad suficiente de NaOH para neutralizar la muestra en el Destilador marca Büchi modelo K-350 y cuando el destilado tuvo aproximadamente 300 mL se tituló con una solución valorada de ácido sulfúrico (NMX-AA-026-SCFI-2001).

Para obtener el porcentaje de nitrógeno, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de N}_2 = \frac{(\text{mL. Problema} - \text{mL. Blanco}) (\text{meq. N}) (\text{normalidad del H}_2\text{SO}_4) * 100}{\text{Peso de la Muestra}}$$

### **6.6.3 Determinación de fósforo**

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de organismos, por lo que es común encontrarlo en residuos biológicos. Para la determinación de fósforo (P) en los tratamientos, fue necesario preparar las siguientes soluciones:

1. Solución patrón: se pesaron 219.5 mg de fosfato monobásico de potasio anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) previamente secado, se disolvieron en 500 mL de agua destilada y se aforó a 1 L.
2. Disolución A: se pesaron 25 g de molibdato de amonio y diluyeron en 300 mL de agua destilada.
3. Disolución B: se pesaron 1.25 g de metavanadio de amonio en calentamiento hasta ebullición en 300 mL de agua destilada. Se enfrió y añadió 330 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl). Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Disolución reactivo metavanadio-molibdato: se adicionó la disolución A en la disolución B, se mezcló y aforó a 1 L.



5. Hidróxido de sodio 6 N (NaOH): se pesaron 240 g de NaOH y se diluyeron con 500 mL de agua, se agitó y dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 1L.

El estudio se realizó en el equipo Kjeldahl marca Büchi fabricado en Suiza. Se pesó aproximadamente 1 g de la muestra y se agregó al matraz Kjeldahl junto con 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 mL de ácido perclórico concentrado. Se calentó el matraz en la unidad de digestión marca Büchi modelo B-426 hasta que se produjo un cambio en la coloración (vire a amarillo) y se concluyó la digestión (aproximadamente 2 h). Se dejó enfriar y se adicionó una gota de fenolftaleína y 20 mL de agua destilada. Se neutralizó con NaOH 6 N hasta desvanecer a un color rosa pálido (aproximadamente 25 mL). Posteriormente se aforó a 100 mL con agua destilada y se filtró (utilizando papel filtro de 0.04 mm) hasta obtener 17.5 mL del filtrado y se mezcló perfectamente con 5 mL del reactivo de metavanadio-molibdato. Se dejó reposar 20 min y se registró la lectura a 490 nm en el espectrofotómetro marca Varían modelo Cary fabricado en Australia (NMX-AA-029-SCFI-2001).

Los cálculos de las concentraciones de fósforo se realizaron tomando como base una curva de la solución patrón de  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm.

#### **6.6.4 Análisis microbiológicos**

A las muestras obtenidas de los reactores abiertos se les realizaron análisis microbiológicos para la cuantificación de *salmonella*, coliformes totales y hongos.

#### **6.6.4.1 Determinación de bacterias coliformes**

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varios géneros. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. El número de organismos se establece mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias mediante el Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa. El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

El método de coliformes totales en placa permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (Agar Mac Conkey) en el que se desarrollan bacterias a  $35^\circ\text{C}$  en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos (NMX-F-308-1992, 1992). Para la realización de esta prueba se tuvo que preparar previamente el Agar Mac Conkey marca Bioxon fabricado en México; para lo cual, se suspendieron 50 g del mismo en 1 L de agua destilada. Se mezcló perfectamente hasta que se obtuvo una suspensión uniforme. Se dejó reposar de 10 a 15 minutos. Se calentó suavemente agitando frecuentemente hasta que la solución hirvió durante 1 minuto. Finalmente se esterilizó en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

Una vez preparado el agar, se procedió a la siembra, para lo cual se colocaron en las cajas Petri (previamente esterilizadas al igual que el resto del material que se

utilizó durante el procedimiento), por duplicado, 1 mL de la muestra en la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril. Se repitió el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requería sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución. Se adicionaron de 15 a 20 mL del Agar Mac Conkey fundido. Se mezcló cuidadosamente el inóculo con el medio. Se dejó que la mezcla solidificara dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría. Se invirtieron las placas y se colocaron en la incubadora marca Felisa modelo 133 fabricada en México a 35°C, durante 24 ± 2 horas. Después del período especificado para la incubación, se contaron las colonias con el contador de colonias marca Leica modelo 3327 fabricado en Estados Unidos.

#### **6.6.4.2 Determinación de salmonella**

La cuantificación de *salmonella* se realizó por el método de cuenta en placa a 35 °C en aproximadamente 24 h. Para la realización de esta prueba se tuvo que preparar previamente el agar para *Salmonella* y *Shigella* marca Bioxon fabricado en México; para lo cual, se suspendieron 60 g del mismo en 1 L de agua destilada. Una vez preparado el agar, se procedió a la siembra, la cual se realizó de la misma manera que la siembra de coliformes totales, y se colocaron en la incubadora marca Felisa modelo 133 fabricada en México, a 35°C, durante 24 ± 2 horas. Después del periodo especificado para la incubación, se contaron las colonias con el contador de colonias marca Leica modelo 3327 fabricado en Estados Unidos (NOM-114-SSA 1-1994).

## 6.7 Ensayo Biológico

El biosol obtenido al finalizar el proceso de co-digestión fue utilizado para la realización de un ensayo biológico de germinación, utilizando semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) variedad “El Camino”, que se consiguió en una tienda proveedora de insumos agrícolas en la ciudad de Tulancingo, Hidalgo. La elección de la variedad fue hecha en base a la recomendación del proveedor por ser la de mayor venta hacia los agricultores de la región. La selección de la especie vegetal, de alfalfa (*Medicago sativa*), se basó en que es utilizada durante todo el año para la producción de forraje, además de su fácil cultivo y manejo por los productores.

Se realizaron 4 tratamientos, utilizando una densidad de siembra de 5 Kg/ha, con diez repeticiones. La tasa de fertilización con los biosoles acondicionados que se aplicó fue con base en los requerimientos de N<sub>2</sub> del cultivo, según lo especificado por el proveedor de semilla (635 kg/ha) para obtener un rendimiento de 22 ton/ha de forraje. La tasa de aplicación de biosoles se calcula tomando en cuenta el contenido de los nutrientes que ya se encuentran en el suelo y el contenido de nutrientes que tienen los biosoles a aplicar.

Se sembraron las semillas en contenedores especiales de germinación que contenían arena esterilizada y una cantidad de cada uno de los cuatro sustratos (biosoles) obtenidos de la co-digestión, tal como se muestra en el Cuadro 2.

El ensayo se realizó durante 15 días, durante los cuales se hicieron 2 mediciones una a los 7 y la otra al final del experimento, donde se midió el tamaño de raíz, largo de hoja y tallo en centímetros.

**Cuadro 2. Contenido de nitrógeno en cada tratamiento y su aplicación al ensayo**

	<b>Tratamientos</b>			
	<b>50%</b>	<b>25%</b>	<b>12.5%</b>	<b>0%</b>
<b>Contenido de Nitrógeno (%)</b>	<b>0.712</b>	<b>0.606</b>	<b>0.638</b>	<b>0.538</b>
<b>Aplicación al bioensayo (gr. de muestra)</b>	<b>9</b>	<b>10.4</b>	<b>10</b>	<b>11.8</b>

## 6.8 Análisis de resultados

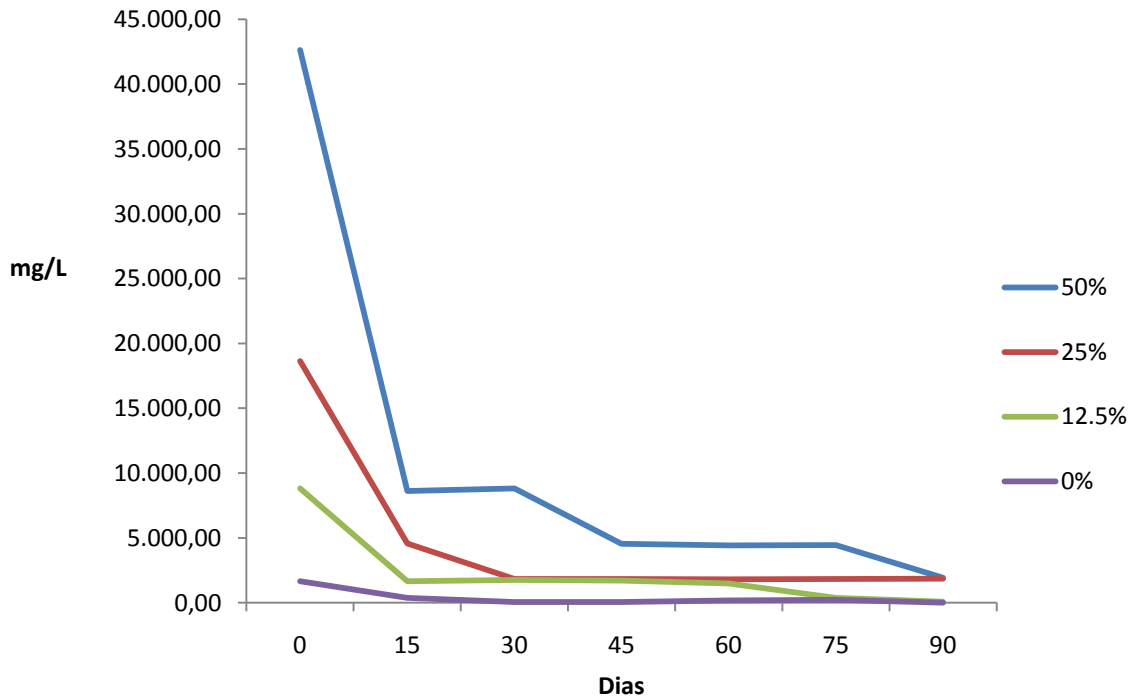
Para el análisis de resultados de los parámetros físico-químicos del proceso de biodigestión y bioensayo se utilizó un diseño completamente al azar de una sola vía utilizando un análisis por duplicado con el programa NCSS 2007, utilizando una prueba de Tukey para determinar si hubo o no diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Producción de biogás en una co-digestión de RSOPT con LA

#### 7.1.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Al inicio del experimento se cuantificó la DQO soluble encontrando en el tratamiento con 50% de LA una concentración de 45.3 g/L de DQO, mientras que en el tratamiento donde solamente hubo residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia (RSOPT) una DQO soluble de 1.2 g/L (Figura 2). No se mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos en la degradación de DQO. La reducción de DQO fue de más del 90% en todos los tratamientos al final del experimento. Estos resultados son mayores a los obtenidos por Macias-Corral y *col.* (2008), donde obtuvieron rendimientos de degradación de la DQO del 80% utilizando materia sólida orgánica municipal en co-digestión con estiércol de vaca.

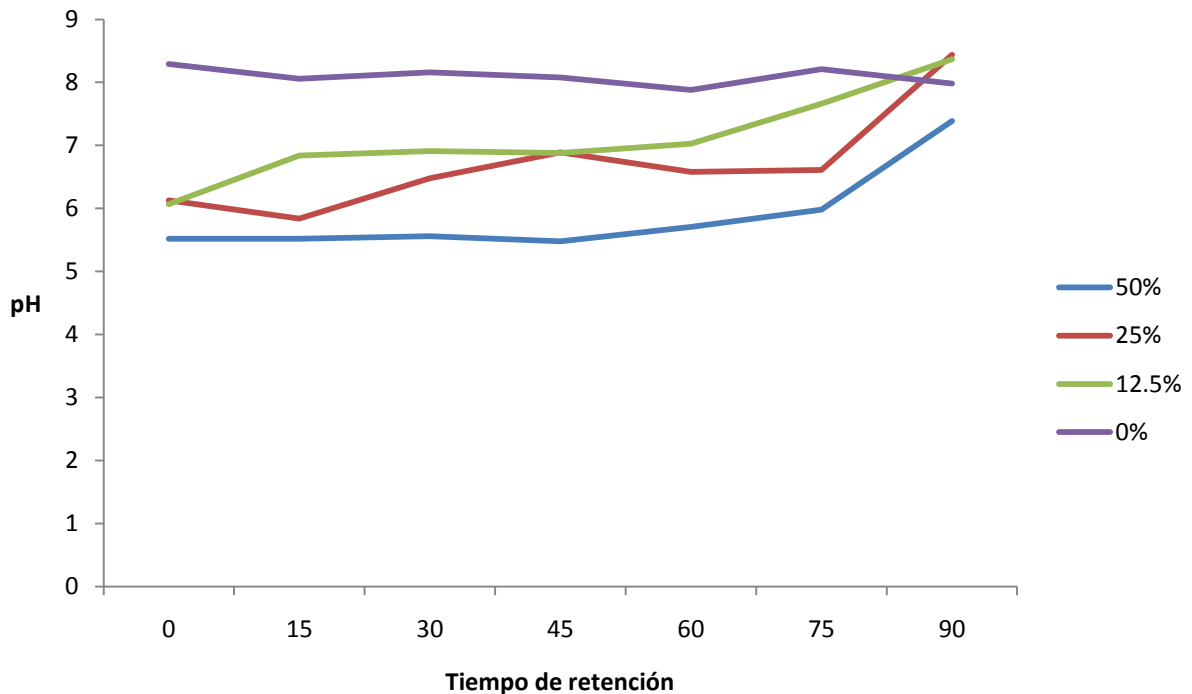


**Figura 2. Demanda Química de Oxígeno (mg/L), en una co-digestión de RSOPT y diferentes concentraciones de LA**

### **7.1.2 Evolución del pH**

Los microorganismos no metanogénicos que actúan en las etapas de hidrólisis y acidogénesis o fermentación en la digestión anaerobia se adaptan a valores de pH bajos, mientras que los responsables de la producción de metano actúan a valores neutros, es por ello que el pH es un parámetro muy importante durante la digestión (Zhang *et al.*, 2008).

Al inicio del experimento existieron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) ya que el tratamiento con 50% de LA, al inicio tuvo un pH de 5.5 mientras que con 0% de LA fue de 8.3. (Figura 3). En todos los tratamientos, el pH final fue superior a 7.4. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zhang y *col.* (2008), que trabajaron con una co-digestión de sólidos y fracciones orgánicas de residuos sólidos municipales (por sus siglas en inglés, OFMSW). Comportamiento similar reportan los datos de pH realizados por Macias-Corral *et al.* (2008), en un trabajo de co-digestión de desechos sólidos municipales, desechos de agricultura (algodón) y estiércol de vaca.



**Figura 3. Comportamiento del pH en una co-digestión de RSOPT y LA**



### 7.1.3 Azúcares totales

En el Cuadro 3 se muestra el comportamiento observado durante los 90 días del experimento, se puede notar una disminución de más del 99% en los tratamientos de 50, 25 y 12.5 % de LA y una reducción del 93% en el tratamiento de 0%. No se mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos.

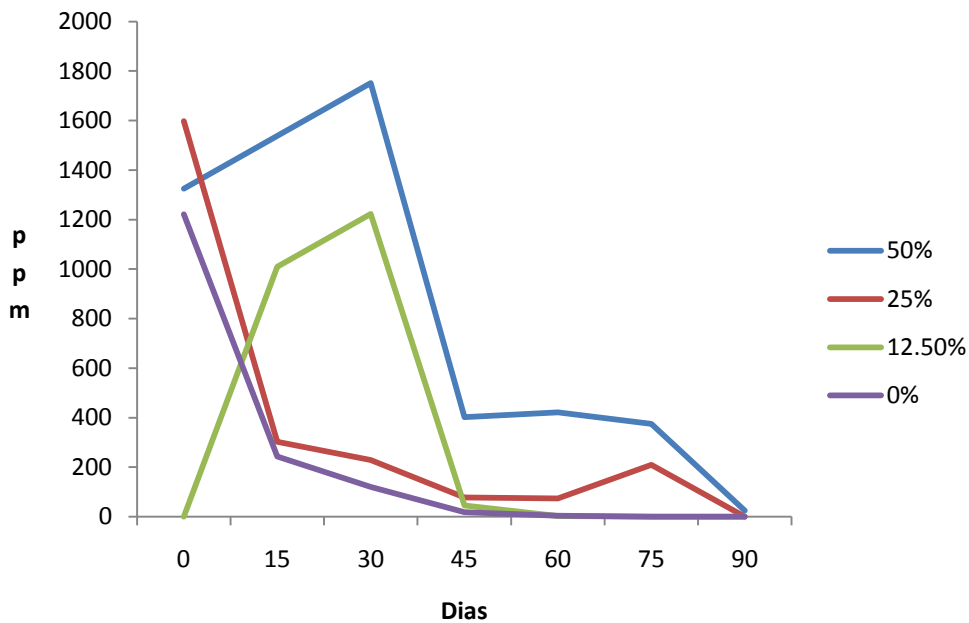
**Cuadro 3. Comportamiento del contenido de Azúcares de una co-digestión de RSOPT y LA**

Tiempo/días	Tratamiento			
	50%	25%	12.5%	0%
0	16490.50	6075.00	4506.50	263.50
15	8327.00	171.00	167.50	90.00
30	405.50	114.00	81.50	27.50
45	381.50	94.00	65.00	29.00
60	350.00	76.00	38.00	50.50
75	55.00	4.65	32.50	19.50

### 7.1.4 Ácidos Grasos Volátiles

Los datos mostrados en los análisis realizados por electroforesis, muestran una gran presencia de ácido acético, quien fue el más detectado durante los primeros

45 días como se muestra en la Figura 4, datos reportados por Capela *et al.* (2008), muestran que los máximos producidos de AGV's ocurrieron durante los primeros 10 días de su experimento en co-digestión de lodos industriales con estiércol de ganado y OFMSW. Por otro lado en la cuantificación de ácido butírico y propiónico no fueron detectados.



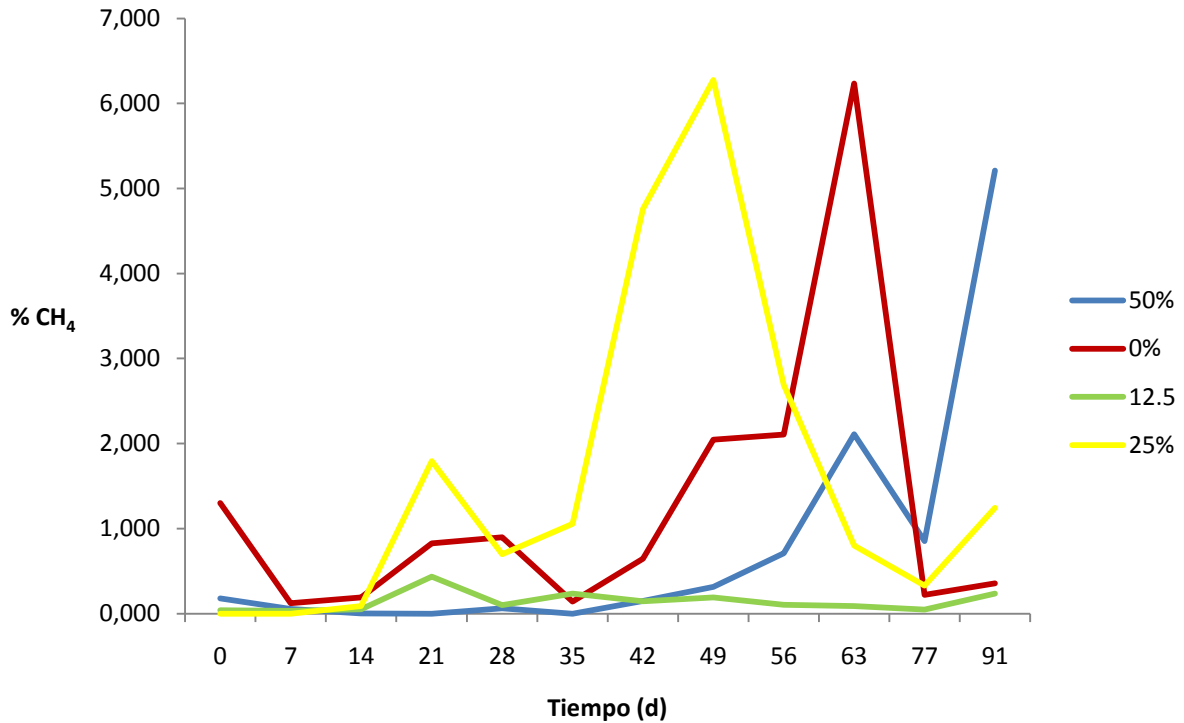
**Figura 4. Desarrollo del ácido acético de RSOPT en co-digestión con LA**

Estos datos se relacionan con la producción de metano, ya que a partir de los 45 días de haber realizado el experimento se encontraron los mayores valores, se puede notar en la figura una disminución drástica del ácido acético justo en el tiempo en que la producción de metano obtuvo sus mejores niveles.

### **7.1.5 Producción de Metano**

Como se puede observar en la Figura 5, existió un buen rendimiento en la producción de metano en tres de los tratamientos (0, 25 y 50 % LA) cuyo comportamiento es distinto, debido a la concentración de LA agregado a cada uno de los bio-reactores. El tratamiento con 25 % de LA fue el que mejores rendimientos presentó a los 49 días de iniciado el experimento. En varios trabajos está demostrado el efecto que tienen las mezclas de diferentes sustratos en la producción de metano. Mata-Álvarez y *col.* (2000), demostraron que la combinación de materia sólida orgánica municipal con lodos de aguas residuales tienen buenos resultados al igual que la combinación de desechos industriales con estiércol.

Esto se relaciona con los ácidos grasos volátiles los cuales no fueron detectados en los últimos muestreos (datos no mostrados). La concentración de LA influyó en el tiempo de mayor producción de metano. El tratamiento con 25% de LA tuvo la máxima producción de metano y ocurrió a los 49 días, esto concuerda con algunos trabajos como el de Rodríguez y *col.* (2010), que en digestión anaerobia de desechos sólidos de rastros obtuvo mayores rendimientos de metano en un tiempo de 45 días; mientras que con el 50% de LA hubo un efecto retardado de la producción de biogás el cual fue a los 91 días (Figura 5), probablemente por la concentración de sólidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sosnowsky y *col.* (2003), quienes reportaron que fue mayor la producción de biogás pero en un período de tiempo más largo en los reactores de mayor contenido de sólidos en comparación con los reactores que tenían menos.

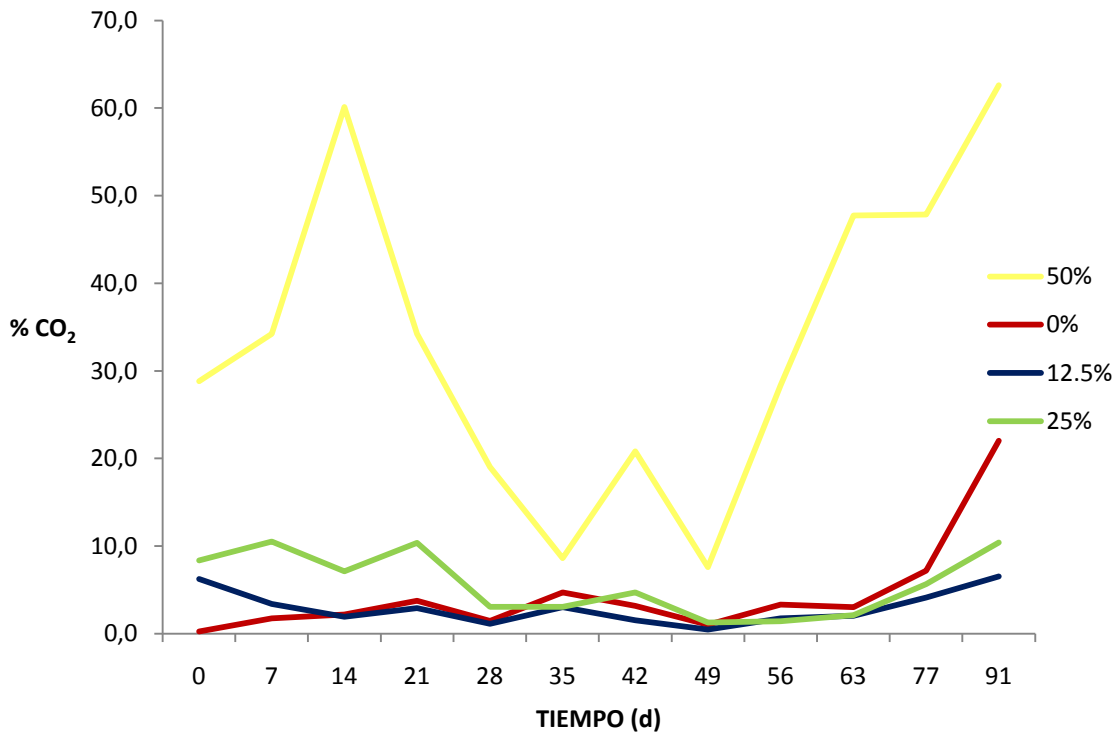


**Figura 5. Producción de metano en una co-digestión de RSOPT y LA**

Estos datos muestran que la concentración de sólidos influye en el tiempo de producción de biogás.

### **7.1.6 Producción de CO<sub>2</sub>**

Los resultados demuestran que a medida que se incrementa la producción de metano, el contenido de CO<sub>2</sub> disminuye, tal como se muestra en la Figura 6, los datos coinciden con reportados por Sosnowsky *et. al.* (2003), quienes demostraron que a medida que aumenta el contenido de metano, el CO<sub>2</sub> disminuye de 80 a valores del 20%.



**Figura 6. Contenido de CO<sub>2</sub> en una co-digestión de RSOPT y LA**

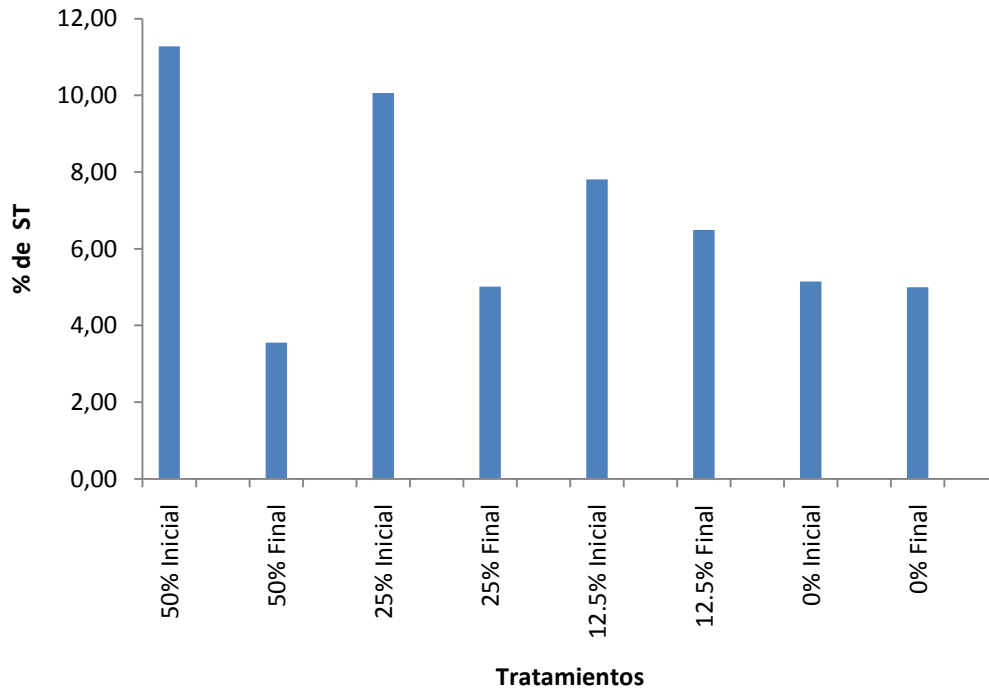
El tratamiento del 50 % de LA fue el que mayor porcentaje de CO<sub>2</sub> presentó, esto concuerda con la producción de metano, puesto que fue el que menor resultado arrojó, debido a la concentración de sólidos en el mismo.

## 7.2 Producción del biosol

### 7.2.1 Sólidos totales

En la Figura 7 se puede observar que existe un coeficiente de correlación del 0.94 entre el aumento de Sólidos Totales (ST) y el incremento de LA. Se encontró un incremento de más del doble entre el tratamiento con 0% de LA en comparación

con el tratamiento de 50% de LA. En la eliminación de los ST se observó un coeficiente de correlación de 0.97 encontrando un porcentaje mayor con el tratamiento de 50% de LA.

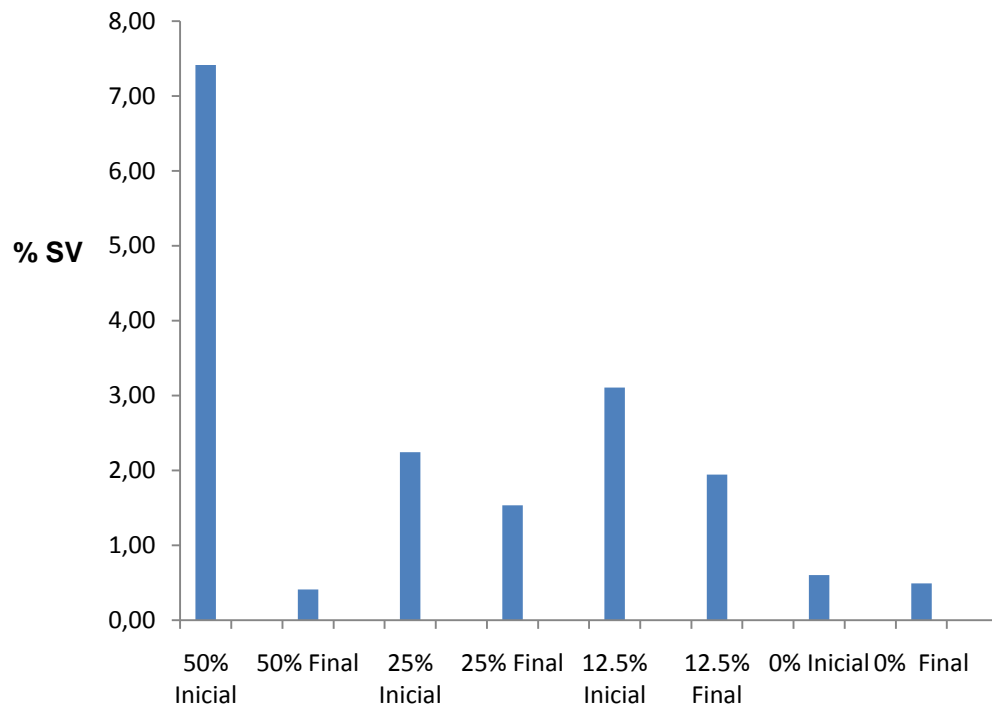


**Figura 7. Comportamiento de sólidos totales producto de la co-digestión de RSOPT y LA.**

### 7.2.2 Sólidos volátiles

En la eliminación de sólidos volátiles (SV) se encontró que existió un coeficiente de correlación de 0.96, es decir, la eliminación de los SV fue directamente proporcional al aumento de LA. Se detectó una eliminación del 90% de SV en el tratamiento con el 50% de LA. Estos datos resultaron superiores a los reportados por Poggi-Varaldo y col.(2003), en su trabajo sobre sistemas anaerobios

acoplados de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos con inoculaciones de estiércol en condiciones mesófilas. Datos similares a este experimento fueron reportados por Hartmann y Ahring (2002), quienes encontraron una reducción del 89 % de los sólidos volátiles, utilizando residuos clasificados de hogares en condiciones termófilas (figura 8).



**Figura 8. Valores de sólidos volátiles (SV) en la co-digestión RSOPT y LA**

### **7.2.3 Contenido de Nitrógeno y Fósforo**

Como se observa en el Cuadro 4, existe una buena mineralización del nitrógeno ya que se conserva en la digestión anaerobia. Se encontró el mayor contenido en

el tratamiento de 50% pero éste fue menor al encontrado por Araya-Castillo (2008), y también por los reportados por Buenrostro y *col.* (2000), quienes obtuvieron valores de 9 y 14 % en residuos sólidos orgánicos municipales.

En el fósforo, se encontró que existe un coeficiente de correlación del 0.98 en el incremento del fósforo en relación al aumento de lactosuero, por lo que se sugiere que el lactosuero proporciona el incremento del fósforo, aunque los datos fueron menores a los obtenidos por Araya-Castillo (2008), pero mayores a los que muestra el trabajo de Buenrostro y *col.* (2000), con promedios que van del 0.27 al 0.42 %. El mejor rendimiento lo mostró (al igual que el nitrógeno) el tratamiento con 50% de LA.

**Cuadro 4. Contenido de N<sub>2</sub> y P al inicio y al final de la co-digestión RSOPT y LA.**

Tratamiento	Nitrógeno %		Fósforo %	
	Inicial	Final	Inicial	Final
50%	0,57±0,019	0,71±0,019	0,66±0,015	0,96±0,001
25%	0,61±0,019	0,61±0,038	0,47±0,003	0,61±0,025
12.5%	0,60±0,022	0,64±0,001	0,30±0,002	0,56±0,003
0%	0,55±0,019	0,54±0,021	0,26±0,034	0,29±0,022



### 7.2.4 Sólidos fijos

El Cuadro 5 muestra los resultados obtenidos de cenizas, los datos son congruentes en cuanto a que el tratamiento con mayor cantidad de lactosuero presentó la menor cantidad de sólidos fijos, en tanto que el tratamiento con una dosis equilibrada de LA y RSOPT (tratamiento 25 %), mostraron los valores más altos.

**Cuadro 5. Comportamiento de sólidos fijos (SF) en una co-digestión de RSOPT y LA.**

	Tratamientos			
	50%	25%	12.5%	0%
Inicial	3.87	7.82	4.7	4.55
Final	3.14	7.48	4.54	4.53

### 7.2.5 Análisis microbiológicos

Como se puede observar en el Cuadro 6, al inicio de la co-digestión existían microorganismos patógenos tales como coliformes fecales en un promedio de  $29.6 \times 10^5$  UFC/g los cuales disminuyeron en más del 99% después de 90 días de la co-digestión. Estos datos son similares a los reportados por Soria-Fregoso *et al.* (2001), en su trabajo de producción de fertilizantes mediante el uso de excretas mediante digestión anaerobia. También se detectaron colonias de *salmonella sp.*, en todos los tratamientos los cuales se eliminaron después de la co-digestión al

igual que los hongos que fueron eliminados en su totalidad. La co-digestión produjo biosoles de tipo B en su contenido microbiológico según lo establecido por la NOM-004-SEMARNAT-2002 que establece los límites y especificaciones permisibles para el apartado de lodos y biosólidos, por tanto puede ser utilizado para actividades de uso agrícola, que fue la base para la realización del bioensayo.

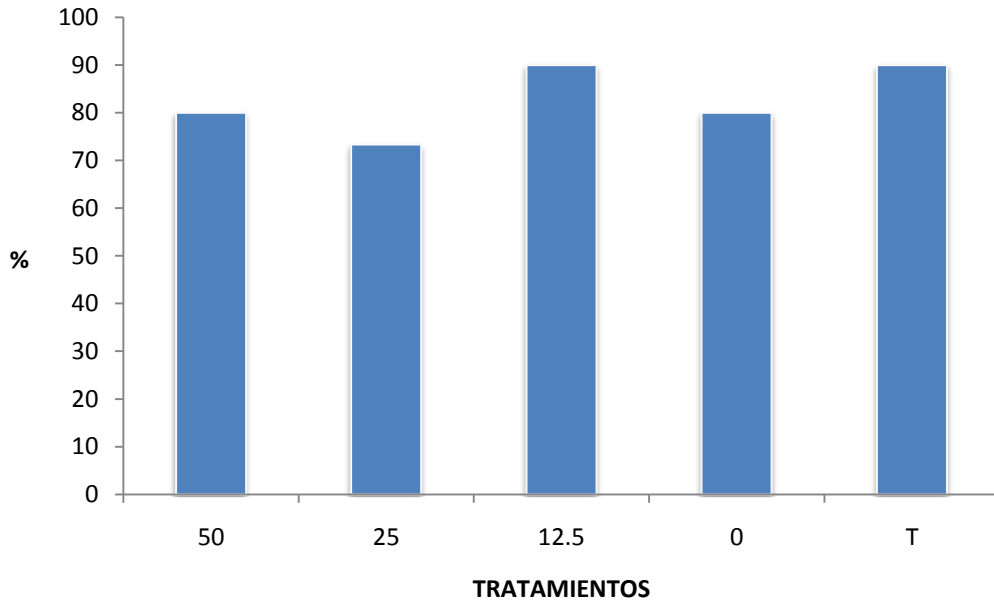
**Cuadro 6. Microorganismos contenidos al inicio y al final de la co-digestión de RSOPT y LA.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Coliformes fecales</i>		<i>Salmonella sp.</i>		<i>Hongos</i>	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
	UFC/g					
50%	$70 \times 10^5$	37	600	ND	3425	ND
25%	$43 \times 10^5$	28	111	ND	7645	ND
12.5%	$34 \times 10^4$	12	115	ND	5345	ND
0%	$23 \times 10^4$	15	168	ND	1546	ND

### 7.3 Bioensayo

La figura 9 muestra el porcentaje de germinación obtenido en el experimento, siendo el tratamiento de 12.5 % de LA el que mejor resultado mostró, también estos datos coinciden con el testigo que presentó un 90 % de germinación. Los

datos del proveedor manejan y garantizan porcentajes de germinación superiores a 90 % similares a los reportados en la investigación.



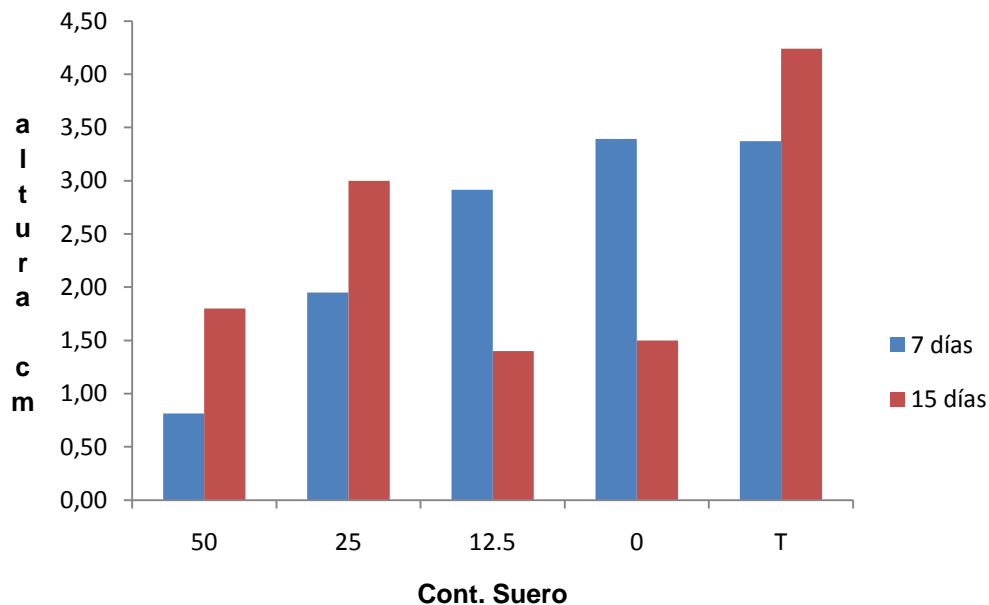
**Figura 9. Porcentaje de germinación obtenido en un biosol producto de la co-digestión RSOPT y LA**

### ***7.3.1 Generación de biomasa del cultivo vegetal***

#### ***7.3.1.1 Crecimiento radicular***

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ), las plantas que se desarrollaron en biosoles con 12.5, 25 y 50 % de LA, mostraron valores menores al tratamiento que no se le adicionó biosol, por tanto se puede decir que el biosol no influyó en el crecimiento radicular, aún presentando mayores valores de  $N_2$ .

Como se puede ver en la Figura 10, existe una pérdida en el crecimiento de la raíz, esto se debe probablemente a la falta de nutrientes, por lo tanto se sugiere que los resultados del bioensayo sean a 7 días puesto que después de este tiempo la raíz presenta problemas de marchitez. También se observa que el testigo muestra valores promedio mejores que los tratamientos con biosoles.



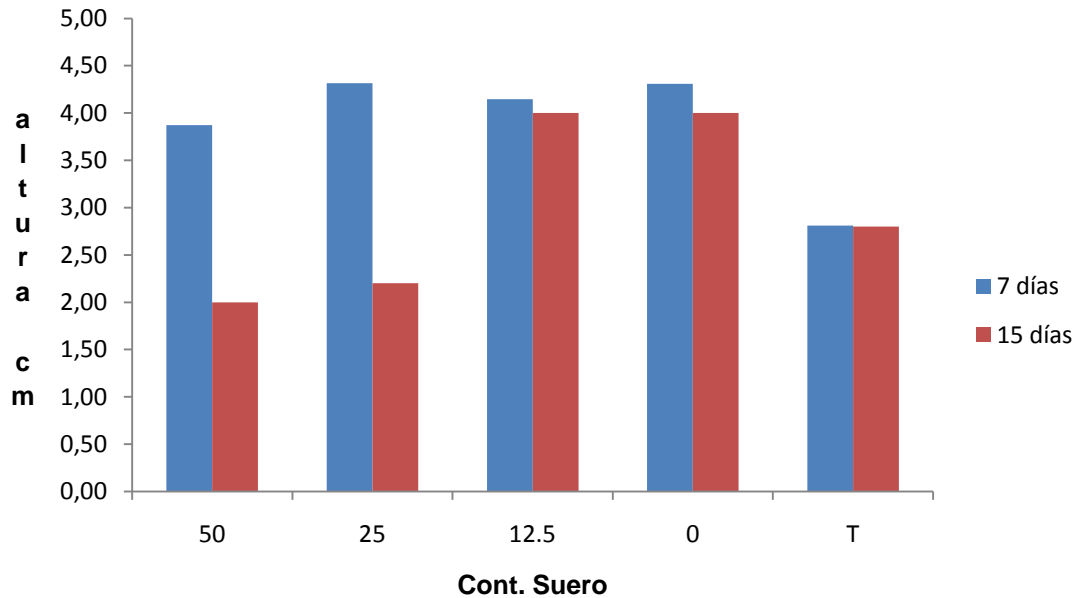
**Figura 10. Crecimiento de raíz en un biosol producto de la co-digestión de RSOPT y LA**

Guerrero-García (1998), menciona que dosis moderadas de Nitrógeno en la siembra (25 a 30 Kg/ha) aceleran el crecimiento de las plántulas y que dosis mayores reducen el número por unidad de superficie. Probablemente el contenido de nitrógeno fue excesivo ya que se hizo en base a cálculos técnicos del proveedor de la semilla que eran de 635 kg/ha para la obtención de 22 ton/ha., de forraje, con una densidad de siembra de 6 kg/ha. En promedio el número de

semillas por kilogramo de alfalfa es de 480,000, si todas las semillas germinaran y emergieran bastarían 10 kg/ha para tener una cantidad de plantas deseable. Sin embargo esto no sucede así, generalmente el porcentaje de germinación es menor al que se indica en los envases ya que ese porcentaje se determina en laboratorio, tampoco todas las semillas que germinan emergen, por ello se ha determinado que la densidad recomendable oscila entre 22 a 39 kg de semilla por hectárea. En caso de usar semilla peletizada, la densidad se debe aumentar entre un 10 a 20% (CELALA-INIFAP, 2002).

### **7.3.1.2 Crecimiento del tallo**

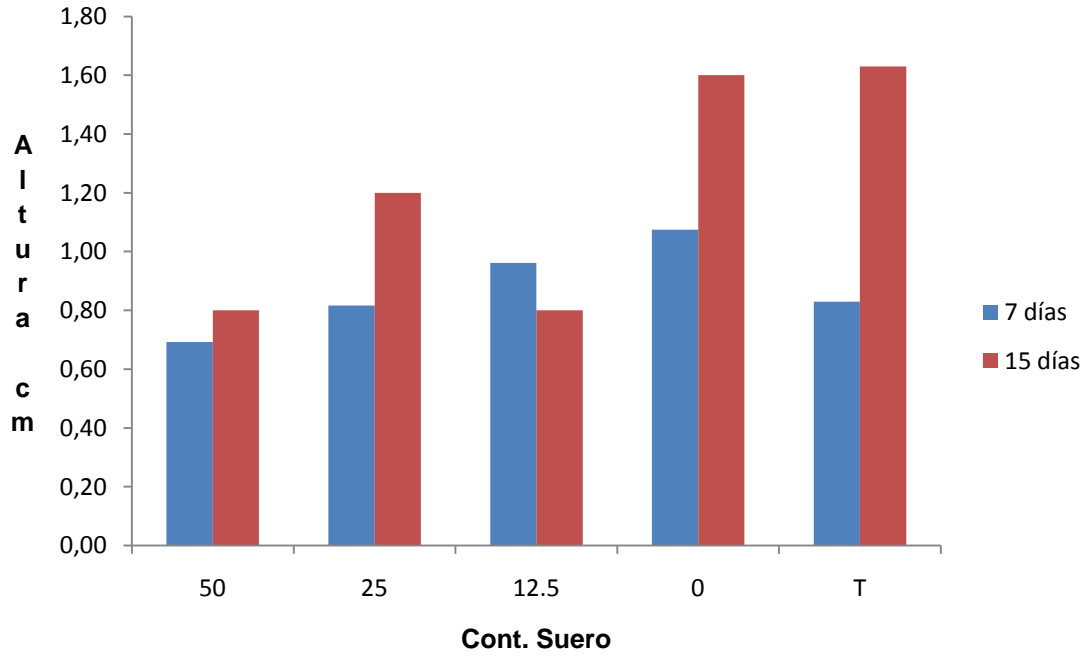
En la Figura 11 se reporta el comportamiento que presenta el crecimiento del tallo en los cuatro tratamientos, donde se puede observar que en el biosol con 0, 12.5, 25 y 50 % de LA, muestran alturas similares a los 7 días, pero con una gran disminución en los de 50% y 25 % de LA a los 15 días de finalizado el bioensayo. En ambos tiempos (7 y 15 días) existieron diferencias significativas ( $P>0.05$ ). A medida que aumentan los días, el biosol con 12.5 % de LA muestra un ligero descenso en el crecimiento del tallo similar al que presenta el biosol con 0% de LA.



**Figura 11. Crecimiento vegetal del tallo en un biosol producto de la co-digestión de RSOPT y LA.**

### **7.3.1.3 Crecimiento de hojas**

Otro de los factores que se midieron en el bioensayo fue el crecimiento de las hojas (largo), encontrando resultados favorables en el biosol que no tenía ninguna concentración de LA, tal como se muestra en la figura 12, presentando diferencias significativas en todos los tratamientos a los 7 y 15 días ( $P > 0.05$ ). Demostrando que el biosol no influyó en el crecimiento de las hojas, a diferencia de los cambios presentados en el tamaño del tallo.



**Figura 12. Crecimiento de hojas en un biosol producto de la co-digestión RSOPT y LA.**

## CONCLUSIONES

La co-digestión de RSOPT con el 25 % de lactosuero mejora la producción de metano y una menor producción de CO<sub>2</sub>, lo cual ocurre de forma ascendente alrededor de los primeros 60 días.

La DQO disminuyó hasta un 90 % y el pH final presentó valores cercanos al neutro.

En la producción del biosol, la co-digestión de RSOPT y LA, aumentaron el contenido de P y N<sub>2</sub> con el incremento del lactosuero. La disminución de ST y SV fue mayor en el tratamiento con alto contenido de LA (50%).

El contenido de microorganismos presentó una drástica disminución en todas las muestras en un 99 % al final del experimento.

El biosol presentó un buen efecto en el crecimiento del tallo y en la germinación con un contenido de 12.5 % de LA.



La co-digestión es una buena opción cuando los residuos de la agroindustria son integrados de manera gradual a otros procesos de transformación que como resultado dan productos de valor agregado como: biogás, la producción de biosoles y su uso en la agricultura orgánica. Además de evitar que estos “desechos” sean vertidos a las aguas de los ríos o arroyos cada día más contaminados.

---

## BLIBLIOGRAFÍA

- APHA/AWWAIWPCF, 1989. Standar Methods for Examination of Water and Wastewate, 20th Ed. American Public Health Association 2-59,5-17 Y 5-18.
- Amaya, R., 1990. Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. Agt editor, S.A. México. pp. 103-112.
- Arellano, M., Jomard, P., El Kaddouri, S., Roques, C., Nepveua, F., Couderc., F. 2000. Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *Journal of chromatography B.* 741, 89-100.
- Aralla-Castillo, A. 2008. Valorización de biosólidos en suelos degradados.II CONGRESO INTERAMERICANO DE RESIDUOS SÓLIDOS. Revista AIDIS de Ingeniería y ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica. Vol.1, no. 4. 2008. ISSN 0718-378X
- Bermúdez, J.J., 1988. La digestión anaerobia. Edit. Secretariado de Publicaciones. Universidad de Murcia.628:35, p.75.
- Borges, E., Escobar, I., Cabrera, J., Carbajal, E., Caballero, A. 2007. Aplicación de biosólidos en el cultivo de plántulas de tomate. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, año/vol. 16. No. 001. Universidad Agraria de la Habana, La Habana, Cuba. pp. 65-69. ISSN (versión impresa) 1010-2760
- Buekens, A. 2005. Energy Recovery from Residual Waste by Means of Anaerobic Digestion Technologies. CONFERENCE "THE FUTURE OF RESIDUAL WASTE MANAGEMENT IN EUROPE". Luxemburg, November 17-18, 2005 (consultado por última vez el 2 de enero de 2011 disponible en [www.compost.it/biblio/2005\\_luxembourg/vortraege/buekens-doc.pdf](http://www.compost.it/biblio/2005_luxembourg/vortraege/buekens-doc.pdf))
- Buenrostro, O., Cram, S., Bernache, G., Bocco, G., 2000. La digestión anaerobia como alternativa de tratamiento a los residuos sólidos orgánicos generados en los mercados municipales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 16 (1) 19-26.
- Capela, I., Rodrigues, A., Silva, F., Nadais, H., Arroka, L. 2008. Impact of industrial sludge and cattle manure on anaerobic digestion of the OFMSW under mesophilic conditions. *ScienceDirect. Biomass and Bioenergy.* 32, 245-251.
- Carucci, G., Carrasco, F., Trifoni, K., Majone, M., y Beccan, M. 2005. Anaerobic digestion of food industry wastes: Effect of codigestion on methane yield. *Journal of Environmental Engineering* 131 (7), 1037-1045.

- CELALA-CIRNO-INIFAP. 2002. Caracterización de la Cadena de Alfalfa en el Estado de Hidalgo. Manual. Elaborado con información directa de campo y entrevistas con productores.
- Cho, S.K., Kim, D.H., and Shin H.S. 2010. The study on Efficient Combination of Various Pretreatments for Sewage Sludge Solubilization. 12<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, International Water Association. October 31 – November 4 , 2010. Guadalajara Jalisco, México.
- FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. 1997. Depósito de documentos de la FAO. Consultado por última vez el 8 de enero de 2011. (Disponible en <http://www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s12.htm>)
- Hartmann, H., Angelidaki, I. and Ahring, B. K. 2002. Co-digestion of the organic fraction of municipal waste with other waste types. In: Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes (Ed. Mata-Alvarez, J.), chapter 7, pp. 181-200. IWA Publishing 2002. ISBN 1 900222 14 0
- Hartmann, H. and Ahring, B. K. 2005. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste – An overview Conference Proceedings. 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. Copenhagen, Denmark, August 31 – September 2, 2005, 34-51
- Herrán-Félix, J.A., Sañudo-Torres, R.R., Rojo-Martínez, G.E., Martínez-Ruiz, R., y Olalde-Portugal, V. 2008. Importancia de los abonos orgánicos. Ra Ximhai, Vol. 4. Número 1, pp.57-67
- Lehtomäki, A., Huttunen, S., and Rintala, S.J. 2006. Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. ScienceDirect. Resources, Conservation and Recycling.1914. Documento impreso. Número de pag. 9
- Macias-Corral, M., Samani, Z., Hanson, A., Smith, G., Funk, P., Yu, H., Longworth, J. 2008. Anaerobic digestion of municipal solid waste and agricultural waste and the effect of co-digestion with dairy cow manure. *Bioresource Technology* 99, 8288-8293.
- Mata-Álvarez, J., Macé, S., Llabrés, P. 2000. Anaerobic digestion. of organic solid waste. An overview of research achievements and perspective. *Bioresource Technology* 74, 3-16.
- Montiel-Bustos, A.E. 2010. Biodigestión de mezclas de residuos de bovino y peces. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

- NOM-004-SEMARNAT-2002. 2002. Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.
- NMX-AA-026-SCFI-2001. 2001. Análisis de aguas. - Determinación de Nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- NMX-AA-029-SCFI-2001. 2001. Análisis de aguas - Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- NMX-FF-109-SCFI-2007. 2007. Humus de lombriz (Lombricomposta) - Especificaciones y Métodos de Prueba.
- NOM-112-SSA 1-1994. 1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- NOM-114-SSA 1-1994. 1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
- Padín-González, C., y Díaz-Fernández, M. 2009. Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009; 29:110-116
- Poggi-Varaldo, H.M., Oleszkiewicz, J. 1992 Anaerobic co-composting of municipal solid waste and waste sludge at high total solids levels. *Environmental Technology* 13, 409-421
- Ríos del Águila, O. 1992. Bioabono en suelos degradados y su efecto en la producción de hortalizas en Pucallpa, Pucallpa, Perú, Universidad Nacional de Ucayali. p.14 ( consultado el 10 de enero de 2011 en <http://orton.catie.ac.cr/default.htm>).
- Rodríguez, A., Cárdenas, J., Medina, M., y Montoya, L., 2010. Anaerobic digestion of slaughterhouse solid waste in order to maximize the production of biogas. 12<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, International Water Association. October 31 – November 4 , 2010. Guadalajara Jalisco, México
- Rubinson, Judith., Rubinson, Kenneth. 2000. Química analítica contemporánea. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana. México. pp. 301-305.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2009. Monitor Agroeconómico del Estado de Hidalgo. (Consultado por última vez el 17 de enero del 2011 en <http://www.sagarpa.gob.mx/lagronegocios/monitores/HIDALGO%20MAE%20%2009.pdf>)

- Sedláček, S., Kubaská, M., Lehotská, S., and Bodík, I. 2010. Food waste – the source of biogas production increase in the municipal WWTPs. 12<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, International Water Association. October 31 – November 4. Guadalajara Jalisco, México
- Sosnowski, P., Wieczorek, A., Ledakowicz, S. 2003. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Environmental Research* 7, 609–616
- Sørensen, Bent. 2004. *Renewable Energy. Physics, engineering, use, environmental impacts, economy and planning aspects.* Third Edition. Elsevier Academic Press. pp.24-28. ISBN: 0-12-656153-2
- Soria Fregoso, M., Ferrera-Cerrato, R., Etchevers Barra, J., Alcántar González, G., Trinidad Santos, J., Borges Gómez, L., y Pereyda Pérez G. 2001. PRODUCCION DE BIOFERTILIZANTES MEDIANTE BIODIGESTION DE EXCRETA LIQUIDA DE CERDO. *TERRA Latinoamericana*, octubre-diciembre, año/vol.19, número 004 Universidad Autónoma Chapingo. pp. 353-362. (consultado por última vez el 20 de diciembre de 2010, disponible en: [www.chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art353-362.pdf](http://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art353-362.pdf))
- Suárez-Vargas, A., Cisneros-Ortiz, M.E. y Campos-Montiel, R.G. 2008. Capítulo VI Efecto Del Lactosuero En La Biodigestion Del Estiércol En: Campos-Montiel R. G. (ed.) *Experiencias para el bio-procesamiento del lactosuero en el valle de Tulancingo*. UAEH. ISBN: 978-607-482-002-7.
- Takashima M. y Tanaka Y. 2010. Evidence of enhanced phosphate release from anaerobically digested sludge through sulfate reduction. 12<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, International Water Association. October 31 – November 4 , 2010. Guadalajara Jalisco, México
- Trevelyan, W.E., Harrison, J.S. 1952. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Journal of Biochemistry*. 50, 298.
- Utria-Borges, E.; Cabrera-Rodríguez, J. A.; Reynaldo-Escobar, I. M.; Morales-Guevara, D.; Fernández, A. M.; Toledo Toledo, E. 2008. Utilización agraria de los biosólidos y su influencia en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 14:1:2008,pp. 33-39. (consultado por última vez el 28 de diciembre de 2010, disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=60914104>)

- Varnero M.T., Claudia Rojas C., Orellana R. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal, Vol. 7:1:2007. (consultado por última vez el 10 de enero de 2011, disponible en [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s071827912007000100003&lng=es&nr\\_m=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s071827912007000100003&lng=es&nr_m=iso))
- Villegas Cardenaz R., Cisneros Ortiz M.E., García Tolentino J., Hernández Fuentes A.D., Aguirre Alvarez G. y Campos Montiel R. G. 2010. Effect of blood concentration in the anaerobic digestion of fish solid wastes for biogas production. 12<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, International Water Association. October 31 – November 4 , 2010. Guadalajara Jalisco, México.
- Zaher U., Cheong D.Y., Wu B., y Shulin Chen S., 2007. Producing Energy and Fertilizer From Organic Municipal Solid Waste. Project Deliverable # 1. Department of Biological Systems Engineering Washington State University. Ecology Publication No. 07-07-024. (consultado por última vez el 19 de diciembre de 2010, disponible en: <http://www.ecy.wa.gov/programs/swfa/solidwastedata/>)
- Zhang P., Zeng G., Zhang G., Li Y., Zhang B., Fan M. 2008. Anaerobic co-digestion of biosolids and organic fraction of municipal solid waste by sequencing batch process. Fuel Processing Technology. 89, 485-489.