



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**“BIODIGESTIÓN DE MEZCLAS DE RESIDUOS DE
BOVINO Y PECES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Presenta:

MONTIEL BUSTOS AUREA ELIZABETH

Director:

DR. RAFAEL GERMÁN CAMPOS MONTIEL

Tulancingo de Bravo, Hgo., Febrero del 2010.

AGRADECIMIENTO

Dr. Rafael Germán Campos Montiel no tengo palabras suficientes para agradecerle el apoyo y la confianza que en mi depósito, además de brindarme su ayuda y guiarme con sus sabios consejos y experiencia. De corazón, Muchas Gracias.

Gracias a mis revisores: Dra. Diana Jaqueline Pimentel González, Dra. Rosa Haydé Alfaro Rodríguez e Ing. Aurora Quintero Lira por el tiempo y ayuda dedicados a la realización y revisión de este proyecto.

Quiero agradecer ampliamente a todos los profesores y personal que labora en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por contribuir en mi formación con sus enseñanzas y apoyo.

De forma especial quiero agradecer a la Dra. Rocío Hernández Díaz por su ayuda en la realización del ensayo de germinación.

DEDICATORIA

QUIERO AGRADECER A DIOS POR DARMME LA OPORTUNIDAD DE VIVIR Y CONOCER SERES EXTRAORDINARIOS.

A MIS PADRES POR REGALARME LA VIDA, POR EL AMOR Y APOYO INCONDICIONAL EN CADA INSTANTE Y POR ENSEÑARME QUE EL ÉXITO SOLO SE ALCANZA CON ESFUERZO PERSEVERANCIA.

GRACIAS A MIS HERMANAS DORIS Y SOFÍ POR EL CARIÑO Y AYUDA BRINDADO A LO LARGO DE MI VIDA.

A MIS SOBRINOS: JOSMAN, MICHELLE, JENY, FER Y BEKI POR SU AMOR Y POR ENSEÑARME LAS COSAS BELLAS Y SIMPLES DE LA VIDA.

ARTURO, GRACIAS POR COINCIDIR EN MI VIDA Y APOYARME INCONDICIONALMENTE EN MI SUPERACIÓN PERSONAL Y PROFESIONAL.

A MIS AMIGOS CLAU, LIDO, JOSE LUIS, RAFA, FRANCISCO, LUCERO Y ALE, QUIENES HAN ESTADO EN LOS MOMENTOS MAS IMPORTANTES DE MI VIDA, MOSTRANDOME SIEMPRE SU CARIÑO.

AUREA ELIZABETH MONTIEL BUSTOS

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos	5
III. HIPÓTESIS	6
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1 Consumo de energía	7
4.2 Fuentes de energía renovable.....	8
4.3 Residuos	8
4.4 Tratamientos	9
4.4.1 Reducción	9
4.4.2 Reciclaje.....	9
4.4.3 Composta	9
4.4.4 Combustión	10
4.4.5 Relleno sanitario.....	11
4.5 Digestión Anaerobia	12
4.5.1 Bioquímica de la Digestión Anaerobia	13
4.5.1.1 Primera etapa: Hidrólisis y Acidogénesis	13
4.5.1.2 Segunda etapa: Acetogénesis	15
4.5.1.3. Tercera etapa: Metanogénesis.....	16
4.5.2 Ventajas de la digestión anaerobia	17

4.6	Producción de Biogás	17
4.6.1	Técnicas para aumentar la producción de biogás	18
4.6.1.1	Acidez	19
4.6.1.2	Sólidos	19
4.6.1.3	Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)	19
4.6.1.4	Temperatura	20
4.6.1.5	Agitación del digestor	20
4.6.1.6	Co-digestión	21
4.7	Estiércol	21
4.8	Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia	21
4.9	Fertilizantes orgánicos	22
V.	ANTECEDENTES	24
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1	Localización del experimento	30
6.2	Descripción de la materia prima	30
6.2.1	Estiércol de bovino	30
6.2.2	Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (RSOPT)	30
6.3	Establecimiento del experimento	30
6.4	Diseño de tratamientos	31
6.5	Variables de estudio	32
6.5.1	Análisis físico-químicos	32
6.5.1.1	Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)	32
6.5.1.2	Determinación de azúcares totales (Técnica de Antrona)	33
6.5.1.3	Potencial de Hidrógeno (NMX-FF-109-SCFI-2007)	34

6.5.1.4 Determinación de ácidos grasos volátiles por Electroforesis	
Capilar	34
6.5.1.5 Determinación de concentración de metano por Cromatografía	
de gases	36
6.5.1.6 Sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV) y sólidos	
totales fijos (STF)	36
6.5.1.7 Determinación de Nitrógeno	38
6.5.1.8 Determinación de fósforo	39
6.5.1.9 Determinación de carbono orgánico	41
6.5.1.10 Determinación de la relación carbono-nitrógeno	41
6.5.2 Análisis microbiológicos	42
6.5.2.1 Determinación de bacterias coliformes	42
6.5.2.2 Determinación de <u>Salmonella</u>	44
6.5.3 Ensayo Biológico	45
6.5.3.1 Germinación	45
6.6 Análisis de resultados	47
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1 Evolución de parámetros físico-químico	48
7.1.1 Demanda Química de Oxígeno	48
7.1.2 Azúcares totales	49
7.1.3 pH	50
7.1.4 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)	52
7.1.5 Producción de metano y CO ₂	53
7.1.6 Sólidos totales, sólidos totales volátiles y sólidos totales fijos	55

7.1.7	Nitrógeno	57
7.1.8	Fósforo	59
7.1.9	Carbono orgánico	60
7.1.10	Determinación de la relación carbono-nitrógeno	61
7.2	Análisis microbiológicos	63
7.3	Ensayo Biológico	64
VIII.	CONCLUSIONES	68
IX.	BIBLIOGRAFÍA	71
X.	ANEXOS	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del biogás	18
Cuadro 2. Diseño de tratamientos	46
Cuadro 3. Evolución de DQO (mg/L) durante el proceso de biodigestión	48
Cuadro 4. Evolución del pH durante el proceso de biodigestión	51
Cuadro 5. Evolución de AGV's durante el proceso de biodigestión	53
Cuadro 6. Evolución de Sólidos Totales durante el proceso de biodigestión ..	56
Cuadro 7. Evolución de la concentración de Nitrógeno durante el proceso de biodigestión expresada en %	58
Cuadro 8. Evolución de la concentración de fósforo durante el proceso de biodigestión expresado en %	60
Cuadro 9. Carbono Orgánico (%) durante el proceso de biodigestión	61
Cuadro 10. Relación C/N durante el proceso de biodigestión	62
Cuadro 11. Evolución microbiológica del proceso de biodigestión	63
Cuadro 12. Resultados de ensayo biológico de germinación	65
Cuadro 13. Velocidad de emergencia y porcentaje de establecimiento de ensayo biológico de germinación.....	66
Cuadro 14. Peso fresco y peso seco de ensayo biológico de germinación	67
Cuadro 15. Cuadro de ANOVA de DQO (mg/L)	78
Cuadro 16. Cuadro de ANOVA del contenido de Azúcares Totales (mg/L) ...	78
Cuadro 17. Cuadro de ANOVA del pH	79

Cuadro 18. Cuadro de ANOVA del Ácido Acético	79
Cuadro 19. Cuadro de ANOVA del Ácido Propiónico	80
Cuadro 20. Cuadro de ANOVA del Ácido Butírico	80
Cuadro 21. Cuadro de ANOVA de Producción de Metano (%)	81
Cuadro 22. Cuadro de ANOVA de Producción de CO ₂ (%)	81
Cuadro 23. Cuadro de ANOVA de ST (%)	82
Cuadro 24. Cuadro de ANOVA de STF y STV (%)	82
Cuadro 25. Cuadro de ANOVA del contenido de Nitrógeno (%)	83
Cuadro 26. Cuadro de ANOVA de Fósforo (%)	83
Cuadro 27. Cuadro de ANOVA de Carbono Orgánico (%)	84
Cuadro 28. Cuadro de ANOVA de la relación C/N	84

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación esquemática de los diferentes pasos metabólicos envueltos en la degradación de materia orgánica a bióxido de carbono y metano 14
- Figura 2.** Ensayo biológico de germinación con alfalfa variedad San Miguel 45
- Figura 3.** Medición de tallo y raíz de germinado de alfalfa 47
- Figura 4.** Evolución de la degradación de los azúcares totales durante el proceso de co-digestión utilizando como sustratos estiércol (■), residuo sólido orgánico de la producción de tilapia (◆) y mezcla de ambos residuos 50:50 (▲) 50
- Figura 5.** Producción de biogás, cuantificación de (a) metano de la digestión anaerobia de estiércol (■), Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (◆) y mezcla (▲) y (b) de CO₂ de la digestión anaerobia de estiércol (■), Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (◆) y mezcla (▲) 54

RESUMEN

El proceso de digestión anaerobia es una alternativa viable para el tratamiento de residuos agroindustriales generados en el Estado de Hidalgo, ya que permite la transformación de la materia orgánica en biocombustible, además de la obtención de un fertilizante orgánico. En este estudio se determinó el efecto de codigestión de estiércol de bovino y residuo sólido orgánico de la producción de tilapia.

Se realizaron tres tratamientos en microcosmos de 75 mL, cada uno con 7 repeticiones. En el primero, se utilizó como sustrato estiércol; en el segundo, residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia (RSOPT) y finalmente el tercero fue una mezcla (50 p/p) de ambos residuos. La concentración de sólidos fue de 8 % y se mantuvieron a una temperatura constante de 35° C.

La parte experimental duro 6 meses. La cuantificación de metano y CO₂ fue semanal y cada 2 meses al efluente de los microcosmos se les cuantificó Demanda Química de Oxígeno (DQO), azúcares totales, potencial de Hidrogeno (pH), ácidos grasos volátiles (AGV's), sólidos totales (ST), sólidos fijos (STF), sólidos volátiles (STV), concentración de nitrógeno (N₂), concentración de fósforo (P), carbono orgánico (CO) relación Carbono/Nitrógeno (C/N), cuantificación de *Salmonella* y Coliformes totales.

Se observó una disminución de DQO y azucares totales en los tres tratamientos, durante los primeros 90 días; presentando una degradación de alrededor del 30 % en el caso del estiércol y la mezcla de residuos y de 75 % en el caso del RSOPT;

mientras que el consumo de azúcares fue mayor al 55 % en los tres tratamientos. El pH durante el proceso permanece en valores cercanos a la neutralidad en los tres tratamientos. Respecto a los AGV's y la relación C/N, los tres tratamientos presentaron una disminución importante al final de biodigestión, lo cual indica que con el proceso de biodegradación se transformo la materia orgánica en biogás. La cantidad de sólidos totales fue mayor en el estiércol y como consecuencia también un mayor porcentaje de sólidos volátiles (los cuales representan la materia orgánica, en su mayoría carbono) y un menor porcentaje de sólidos fijos en comparación con los otros tratamientos.

Al finalizar el proceso de co-digestión de los tres tratamientos como resultado de la estabilización de la materia orgánica se produjo un biosólido tipo "B", en el cual hubo una reducción de más del 99 % del contenido de bacterias patógenas y una mineralización de N₂ y P, no obstante, el tratamiento que utilizó como sustrato estiércol fue el que presentó mayores concentraciones de los nutrientes (N₂ y P), sin embargo la mezcla de residuos cumple con la concentración necesaria de estos dos elementos.

Finalmente, el resultado de este estudio indica que fue significativamente mejor la mezcla de residuo de bovino y tilapia (50:50) para obtener producción de biogás (con mayor concentración de metano) y biosólido tipo "B".

I. INTRODUCCIÓN

El actual estilo de vida exige altos consumos de energía, llevando a un mayor desgaste las fuentes convencionales, por lo cual, se ha generado un creciente interés por el desarrollo de nuevas tecnologías económicas y sencillas que permitan generar alternativas de energía renovable.

Estas tecnologías tienen un excelente potencial para generar economías sostenibles al transformar la materia orgánica (estiércol de ganado, residuos agrícolas, etc.) en biocombustible, conservando los recursos y protegiendo el medio ambiente (Álvarez *et al.*, 2006).

En países como México, los residuos orgánicos procedentes de la agricultura, ganadería y pesca, están disponibles y tienen un gran potencial para abastecer la demanda energética. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2008a) reporta una producción nacional de 36.2 millones de toneladas anuales de estiércol, mientras que el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2006), menciona que sólo en el Estado de Hidalgo hay una producción anual de 437,107 toneladas del mismo. Por otra parte, el mencionado Estado ocupa el primer lugar en la producción pesquera sin litorales, reportando una producción acuícola anual de alrededor de 2,000 toneladas; generando cantidades suficientes de desechos que frecuentemente no son procesados de forma adecuada, sin embargo, existe la posibilidad de implementar tecnologías que permitan su adecuado procesamiento sin generar daños al medio ambiente.

La digestión anaerobia de biomasa se ha convertido en una alternativa viable para solucionar los problemas causados por éstos desechos, tales como el olor, reducción del volumen, recuperación de nutrientes inherentes y disminución potencial de la contaminación (Cantrell, *et al.*, 2008).

En el proceso de digestión anaerobia, los microorganismos consumen sustrato, ya sea estiércol o algún otro material orgánico, dando como productos finales el biogás (mezcla de metano y bióxido de carbono) y un fertilizante no patógeno rico en material orgánico, humus, nitrógeno, fósforo y potasio (Amaya, 1990).

Actualmente, en Estados como Hidalgo, primer productor nacional de alfalfa verde y cebada (SAGARPA, 2008b), después de la realización a nivel piloto del proceso de digestión anaerobia, éste se visualiza como una excelente opción para procesar residuos orgánicos, ya que ofrece la producción de energéticos como el biogás, además de fertilizantes orgánicos que potencialmente pueden ser utilizados en el campo hidalguense obteniendo beneficios superiores a los que ofrecen los fertilizantes químicos.

Ante la necesidad de acciones viables y efectivas para contrarrestar el efecto invernadero del planeta, la producción de combustibles como el biogás, utilizando mezclas de residuos de ganadería y pesca es una forma limpia y renovable de energía a un menor costo, que podría sustituir a las fuentes convencionales (combustibles, aceite, etc.) que están causando graves problemas ecológico-ambientales y al mismo tiempo se están agotando; además, la generación y desarrollo de este tipo de tecnologías contribuye significativamente al desarrollo sustentable de la región.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la codigestión de estiércol de bovino con residuos sólidos orgánicos de la producción de Tilapia en una digestión anaerobia.

2.2. Objetivos Específicos

- ∞ Cuantificar la producción de metano, durante el proceso de digestión anaerobia de la mezcla de residuos de bovino y peces.
- ∞ Determinar la evolución de los siguientes parámetros: ácidos grasos volátiles (AGV's), demanda química de Oxígeno (DQO), azúcares totales, sólidos totales (ST), sólidos fijos (STF), sólidos volátiles (STV), nitrógeno (N_2), fósforo, pH y carbono orgánico en estiércol de bovino, residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia y mezcla de ambos residuos durante el proceso de biodigestión.
- ∞ Determinar el efecto del fertilizante orgánico resultante del proceso de digestión anaerobia en la producción de alfalfa.

III. HIPÓTESIS

La mezcla de residuos procedentes de la ganadería y producción de peces pueden optimizar el proceso de digestión anaerobia en cuanto a la producción de metano y la producción de un fertilizante orgánico.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Consumo de energía

El consumo de la energía mundial en los últimos años se ha incrementado considerablemente, caracterizado por las incertidumbres ligadas al cambio climático y a la vulnerabilidad derivada del paulatino agotamiento de los recursos fósiles frente a una demanda creciente de energía. La población del planeta y su producción económica continuarán acrecentándose varias décadas más. Se proyecta que el crecimiento, tanto de población como de producto nacional bruto, será mayor en países menos desarrollados en comparación con los menos desarrollados. En la actualidad, tres de cada cuatro habitantes de la tierra viven en los países menos desarrollados, y dos terceras partes de ellos dependen de la recolección de madera y desechos agrícolas y animales para proveerse de combustible para cocinar y calentarse (Henry y Heinke, 1996).

El creciente aumento en el precio mundial del petróleo y los combustibles ha producido un profundo efecto sobre las políticas energéticas de las naciones. En los países ricos, tal hecho ha provocado un desarrollo desbordante en la explotación de reservas aparentemente ilimitadas de fuentes de energía barata. Por todo ello existe una urgente necesidad de encontrar y desarrollar tecnologías de bajo costo mediante el uso inteligente de los recursos locales, para así ayudar a resolver el problema que afrontan los países pobres (Amaya, 1990).

4.2 Fuentes de energía renovable

El ingreso energético, o recursos energéticos renovables, comprenden aquellos bienes que se renuevan continuamente a causa de la presencia de fuerzas físicas como marea, viento, agua que cae, gradientes térmicos en el océano, calor geotérmico, aportación solar directa, o la generación de materia vegetal y animal (Henry y Heinke, 1996).

Normalmente se habla en forma independiente de la energía solar y eólica, subrayando su disponibilidad ilimitada. Sin embargo, estas fuentes de energía enfrentan grandes restricciones debido a su intermitencia y baja densidad, lo cual obliga que para su utilización se requiera contar con almacenamiento de energía para días nublados o de calma, y ello hace que sus costos se eleven considerablemente. Considerando lo anterior, el Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE) desarrolla un proyecto de investigación que estudia la posibilidad de integrar en un sistema, módulos, tales como; aeromotores, colectores solares, digestores de desechos orgánicos para producir biogás, máquinas hidráulicas, etc. (Félix y Sánchez, 1990).

4.3 Residuos

En su sentido más amplio, el término residuos sólidos incluye todos los materiales desechados de actividades municipales, industriales o agrícolas. De estos residuos sólidos, según Henry y Heinke (1996), el 50 % es papel, el 30 % es materia orgánica y el 20 % restante es material no combustible.

4.4 Tratamientos

Actualmente existen diversos tratamientos para eliminar o reducir el potencial de contaminación que generan los residuos, tales como: Reducción; Reciclaje; Composta; Combustión; Relleno sanitario y Digestión anaerobia.

4.4.1 Reducción

Es la disminución de la cantidad o toxicidad de los residuos. La reducción de las fuentes es una de las alternativas más utilizadas porque representa el medio más eficaz para reducir los costos económicos y los efectos ambientales asociados con el manejo de residuos (Henry y Heinke, 1996).

4.4.2 Reciclaje

La mayor parte de los desperdicios contienen gran riqueza en materias primas que pueden volver a utilizarse para elaborar nuevos productos. En general, con el reciclaje no sólo se conservan los recursos materiales, sino que también se ahorra combustible (Turk *et al.*, 1981).

4.4.3 Composta

Con la palabra composteo denominamos la degradación microbiana de sólidos orgánicos por medio de una respiración aerobia que pasa por una fase termofílica. El proceso de composteo empieza, con la colección heterogénea de material orgánico, que contiene una población grande de hongos y bacterias. Estos microorganismos se desarrollan e inician el proceso de descomposición en el

momento en que se presentan las condiciones favorables de humedad, temperatura y aereación. Esta actividad microbiana producirá un aumento en la temperatura a consecuencia de las oxidaciones biológicas exotérmicas y dado que la materia orgánica posee muy mala conductividad térmica ésta actúa como aislante térmico, causando que la mayor parte del calor producido permanezca dentro de la pila de material orgánico (Leal-Lara, 1990).

4.4.4 Combustión

La incineración consiste en cocer desechos animales, tales como la grasa, huesos, plumas y sangre, para obtener tanto un producto graso llamado sebo, que es una materia prima del jabón, como un producto no graso, que tiene un alto contenido de proteínas y puede ser un ingrediente del alimento para animales (Turk *et al.*, 1981).

El proceso de incineración presenta las siguientes ventajas a) elimina el problema de la salud inherente a la acumulación de desperdicios; b) reduce el volumen de los desechos sólidos en aproximadamente 80 % y requiere, por consiguiente, mucha menos tierra para la eliminación final de sus residuos; c) puede tratar una mezcla de basura y cascajo sin separación previa; d) puede utilizarse en ella equipo de una gran diversidad de tamaños, desde unidades de vivienda hasta grandes incineradores municipales centrales, capaces de tratar más de 1000 toneladas al día; e) los residuos son inertes e inodoros y relativamente fáciles de manipular. Sin embargo, la incineración tiene el inconveniente, exactamente lo

mismo que el montón de basura, de desperdiciar materias primas (Turk *et al.*, 2004).

En la actualidad casi todos los nuevos sistemas de incineración incorporan la recuperación de energía para reducir los costos de capital y de operación del equipo de control para la contaminación del aire (Henry y Heinke, 1996).

4.4.5 Relleno sanitario

Es un método muy ventajoso de eliminación de residuos, en el que cada capa de desechos es recubierta por una capa de tierra, arcilla o grava (Turk *et al.*, 2004).

El entierro de los residuos reducía estos problemas, pero la mejora más importante se consiguió apisonando los residuos en capas y cubriéndolos con tierra al final de las operaciones de cada día (Henry y Heinke, 1996).

Es necesario hacer una clasificación manual de los residuos que llegan, y puede haber pulverización a altas presiones y embalaje de los mismos para reducir su volumen antes de depositarlos en la tierra. El material suelto se coloca en la parte inferior de la zanja preparada y después se distribuye y se apisona por medio de una máquina en capas de alrededor de 0.5 m de espesor. Cuando la profundidad alcanza de 2 a 3 m, y al final de las operaciones de cada día, los desechos se cubren con una capa de 150 a 300 mm de tierra. Estos residuos sólidos consolidados y envueltos en tierra se conocen como una celda, la cual normalmente contiene los residuos de un día (Henry y Heinke, 1996).

4.5 Digestión Anaerobia

Se conoce como digestión anaerobia, al conjunto de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo bajo condiciones anóxicas (el nitrógeno proveniente de los nitratos se transforma, biológicamente en nitrógeno molecular en ausencia de oxígeno molecular, también llamado desnitrificación), y que desembocan en la degradación de los grandes biopolímeros complejos, hasta polímeros simples que son asimilados y utilizados por los organismos que la llevan a cabo (Sánchez, 2003).

Este tratamiento surge como una alternativa para el tratamiento de los desechos, en este proceso, microorganismos anaerobios transforman la materia orgánica a biomasa y compuestos en su mayoría volátiles: Bióxido de Carbono (CO₂), metano (CH₄), nitrógeno (N₂), hidrógeno (H₂) y ácido sulfhídrico (H₂S) (Pérez, 2007).

Parra (2005) menciona que la digestión anaerobia de residuos orgánicos es un proceso estable para la producción de biogás y eliminación de materia orgánica, ésta ha sido empleada por varios años en rangos de temperaturas mesofílica (20 – 45° C) y termofílica (45 – 60° C). La conversión de materia orgánica a biogás a bajas temperaturas (menor 20°C) es referida a digestión anaeróbica psicrófila. Esta no ha sido estudiada ampliamente porque es un proceso difícil y lento, este tratamiento biológico anaerobio de residuos es un proceso microbiológicamente complejo que envuelve a varios tipos de bacterias que trabajan en forma encadenada.

4.5.1 Bioquímica de la Digestión Anaerobia

La fermentación metanogénica se lleva a cabo mediante la acción de microorganismos que obtienen energía para crecer a través del catabolismo anaerobio de la materia orgánica, misma que es degradada hasta CO_2 y CH_4 . Las etapas de la digestión anaerobia son: Hidrólisis y acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 1).

4.5.1.1 Primera etapa: Hidrólisis y Acidogénesis

Esta etapa implica la hidrólisis de polímeros naturales de alto peso molecular tales como proteínas, carbohidratos y compuestos de menor peso molecular como son azúcares, ácidos grasos, aminoácidos y la posterior fermentación de éstos azúcares en alcoholes, ácidos grasos volátiles (ácidos entre uno y cinco átomos de carbono), bióxido de carbono e hidrógeno (Sánchez, 2003).

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

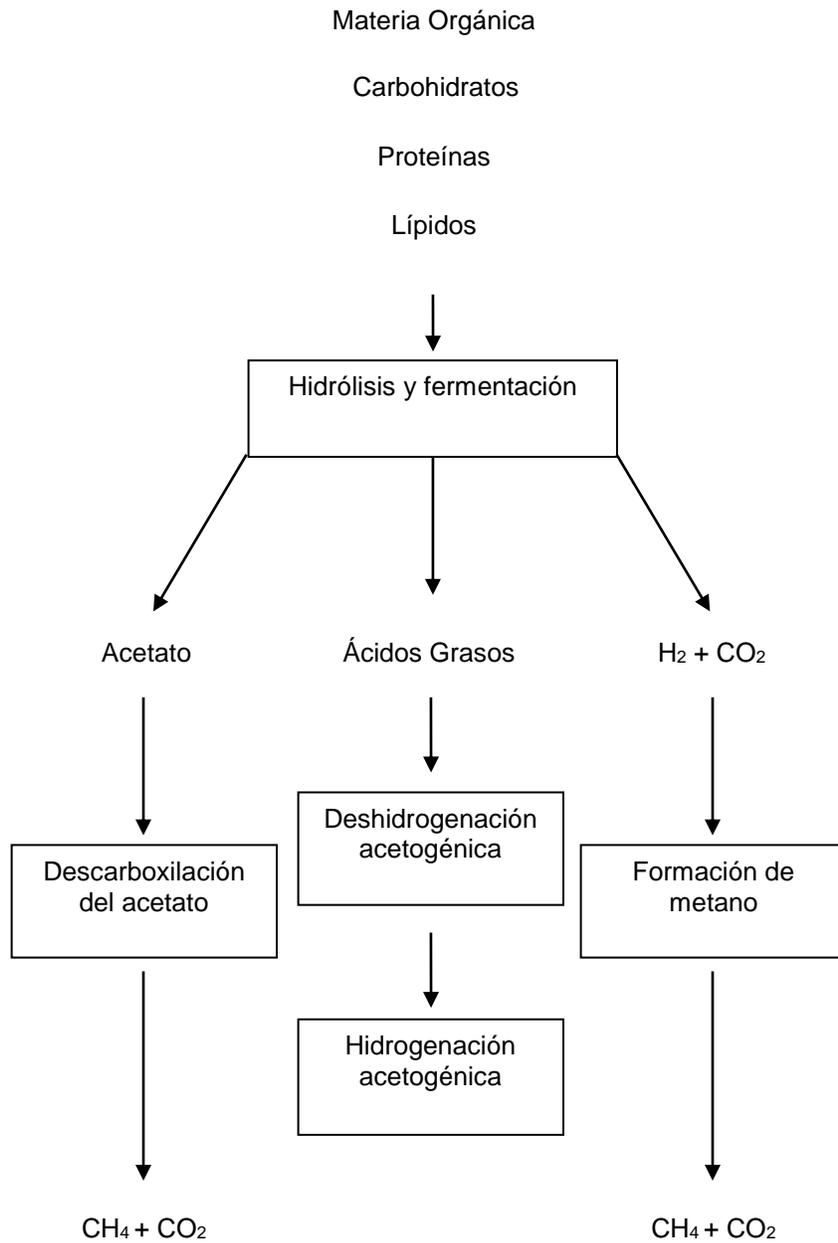


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes pasos metabólicos envueltos en la degradación de materia orgánica a bióxido de carbono y metano.

metanogénica. Es necesario hacer notar que la acidogénesis no se detiene a estos valores de pH entre 4.5 y 5.0. Es recomendable controlar un digestor por medio de la adición de un álcali cuando el pH disminuye a 6.6 (Sánchez, 2003).

Otra razón por la que debe evitarse la sobrecarga en un reactor anaerobio, es que, además de generarse una gran cantidad de ácidos, la concentración de hidrógeno aumenta en exceso. La composición de la mezcla de ácidos grasos generados durante la fermentación está determinada entre otros factores, por la concentración de hidrógeno en el medio. Cuando la concentración de hidrógeno aumenta, disminuye la proporción de ácido acético formado y se incrementa la producción de ácidos con más de dos átomos de carbono, esto es, se generan mezclas de ácidos acético, propiónico y butírico, debido al aumento en el poder reductor y por ser más exergónicas las reacciones de formación de ácido propiónico y butírico. Por el contrario, cuando la concentración de hidrógeno es muy baja (5-50 ppm), existe una preferencia por la generación de ácido acético, lo cual representa una ventaja para todo el sistema, dado que el acetato es el precursor principal de metano en los digestores anaerobios (Sánchez, 2003).

4.5.1.2 Segunda etapa: Acetogénesis

Durante la acetogénesis, etapa que puede describir como una deshidrogenación acetogénica, los productos generados en la primera etapa hidrolítica tales como el propionato, ácidos grasos de cadena larga y los ácidos aromáticos, son fermentados anaeróbicamente y degradados a acetato, bióxido de carbono e hidrógeno, productos precursores del metano.

Los principales sustratos utilizados son los alcoholes y los ácidos grasos volátiles como propionato y butirato. La acetogénesis es una etapa crítica, puesto que con ella se evita la acumulación de ácidos grasos volátiles, los cuales en concentraciones altas, pueden inhibir la metanogénesis (Sánchez, 2003).

4.5.1.3. Tercera etapa: Metanogénesis

La metanogénesis corresponde a la parte final de la digestión anaerobia de la materia orgánica. En ella, los compuestos simples que han sido generados en las dos etapas anteriores, son transformados por medio de las bacterias metanogénicas (capaces de utilizar electrones en forma de H_2 , y de romper el acetato anaeróbicamente en ausencia de luz o de aceptores de electrones como el nitrato o el sulfato) en bióxido de carbono y metano, ya que sin estas, la materia orgánica no podría degradarse y los ácidos orgánicos se acumularían en el medio ambiente.

La mayoría de las bacterias metanogénicas sólo pueden crecer en un intervalo de pH de 6.0 a 8.0. Son fisiológicamente más activas a pH entre 7.0 a 7.8, observándose mayor actividad a un valor de 7.5. Valores de pH menores de 6.0 causan disminución en la velocidad de producción de metano, hasta que ésta llega a valores cercanos a cero, cuando el pH baja a valores entre 4.75 y 4.8. Cuando el pH disminuye, la concentración de las formas no disociadas de los ácidos grasos se incrementa rápidamente, los cuales son incorporados a la célula por difusión. Una vez dentro, los ácidos se disocian, ocasionando la acidificación del citoplasma. De esta manera, el efecto inhibitorio de las formas no disociadas de

los ácidos grasos es la acidificación del citoplasma y la pérdida del gradiente de protones necesario para la generación de ATP (Sánchez, 2003).

4.5.2 Ventajas de la digestión anaerobia

Entre las ventajas de la digestión anaerobia figura la eliminación de algunos componentes indeseables del sustrato como son los ácidos en el estiércol; el gas producido en su combustión que es mucho más utilizable que el sustrato; el lodo residual que contiene biomasa y es valioso como material de retroalimentación para el digester o como fertilizante. Es importante resaltar que a diferencia de otros procesos de producción de combustible, en éste se conservan todos los nutrientes inorgánicos (Don Augenstein, 1990).

4.6 Producción de Biogás

El biogás es el producto de la degradación anaerobia de los sustratos orgánicos, es uno de los procesos más antiguos utilizados para el tratamiento de basuras industriales y la estabilización de lodos.

El biogás es incoloro, inodoro e insípido, por lo que es difícil detectarlo; pero por tener una densidad menor que la del aire su peligrosidad asfixiante y explosiva disminuye al construir locales altos y con ventilación.

En el biogás de sus principales componentes, metano y bióxido de carbono, puede deducirse su poder calórico tomando considerando que su composición (Cuadro 1) incluye de 60-70 % de metano y 40 a 40 % de bióxido de carbono, el cual será del orden de 5780 a 6230 Kcal/m³.

Cuadro 1. Composición del biogás

Componente	Concentración (%)
Metano	60 – 70
Bióxido de carbono	30 – 40
Hidrógeno	5 – 10
Nitrógeno	4 – 6
Acido sulfhídrico	Trazas

Fuente: Félix y Sánchez, 1990

4.6.1 Técnicas para aumentar la producción de biogás

En un afán por aumentar la producción de biogás, actualmente se han diversificado los métodos, éstos se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- a) Uso de aditivos biológicos y químicos como plantas, malas hierbas, residuos de cosechas, cultivos microbianos, etc.
- b) Reciclado de la biomasa digerida.
- c) Uso de la película/biofiltros fijos.
- d) Variación en parámetros operacionales.
- e) Co-digestión.

Según Amaya (1990), los principales parámetros operacionales que permiten optimizar el proceso de producción de biogás son: acidez, sólidos, relación Carbono/Nitrógeno (C/N), temperatura, agitación del digestor y co-digestión.

4.6.1.1 Acidez

Una solución demasiado ácida puede frenar bruscamente el proceso de fermentación. Si el pH aumenta, traerá como consecuencia la formación de CO₂ y el proceso de digestión disminuirá; pero si el pH baja, las bacterias no serán capaces de utilizar los materiales ácidos adecuadamente y el proceso se detendrá completamente. Debido entonces a que las condiciones de trabajo para las bacterias metanogénicas son muy estrictas y en un rango muy limitado y cercano a 8 (Amaya, 1990).

4.6.1.2 Sólidos

La fermentación anaeróbica de materia orgánica se efectúa mejor si ésta tiene un contenido de 8 % de sólidos (Amaya, 1990).

4.6.1.3 Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)

Si esta relación es alta, o sea 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 (CH₄), con la menor pérdida posible de nitrógeno (Amaya, 1990).

4.6.1.4 Temperatura

Por lo general, la digestión por bacterias tiene lugar a temperaturas que van desde 0° C a 70° C, efectuándose mejor en éstas últimas. Sin embargo, la producción de gas disminuye con rapidez a temperaturas menores de 16° C y prácticamente se detiene a 10° C. Las reacciones de producción de gas se efectúan a dos diferentes temperaturas, de 30° C a 40° C y de 50° C a 60° C, siendo la óptima de 35° C; actuando diversas bacterias en cada una de ellas (Amaya, 1990).

4.6.1.5 Agitación del digestor

La agitación es un aspecto muy importante para la velocidad de producción de gas, que puede ser elevada sustancialmente al renovar con frecuencia el contacto entre las bacterias metanogénicas y el sustrato, resultando entonces una dependencia directa entre agitación y actividad de bacterias y consecuentemente mayor cantidad de metano generado.

Dos factores corroboran la necesidad de agitar el digestor. Primero, la espuma formada por la propia fermentación y que se aloja en la superficie del material a tratar, reduce enormemente la generación de gas; y el segundo, la producción de metano depende de la descomposición de finas partículas de vegetales no digeridas presentes en el estiércol, éstas tienden a asentarse en el fondo del tanque o bien flotar en la superficie. Entonces mediante una agitación del material, se transforma una fase heterogénea en homogénea (Amaya, 1990).

4.6.1.6 Co-digestión

Una interesante opción para mejorar la producción de la digestión anaerobia de residuos sólidos es la codigestión; esto es, el uso de un co-sustrato, que en la mayoría de los casos mejora la producción de biogás debido al suministro de los nutrientes perdidos. Algunas veces el uso de un co-sustrato puede también ayudar a establecer el contenido de humedad necesario para alimentar al digestor (Mata-Alvarez, *et al.*, 2000).

La codigestión de mezclas de estiércol y residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia (RSOPT) permite tratar en forma simultánea dos residuos obtenidos de la agroindustria.

4.7 Estiércol

Es el producto que se obtiene de la fermentación anaeróbica sucedida en el intestino de los residuos alimentarios no utilizados por rumiantes. Esta fermentación sintetiza una considerable cantidad de proteína que es desperdiciada, junto con parte de la energía no utilizada.

4.8 Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia

Como su nombre lo indica, se refiere al desecho final que se obtiene de la producción de peces de la variedad Tilapia, el cual básicamente se compone de residuos de alimento y excretas de peces.

4.9 Fertilizantes orgánicos

Cuando la descomposición de desechos sólidos municipales se lleva a cabo en un medio aeróbico controlado, la degradación orgánica se acelera y el proceso se denomina formación de abono, o fertilizante orgánico. El objetivo de este proceso es formar un producto material estable rico en nutrientes que sirva para recuperar tierras o mejorar suelos. El abono comercial debe ser de tamaño constante, estar libre de vidrio, plástico y metales y no tener olores desagradables (Henry y Heinke, 1996).

El uso de fertilizantes orgánicos en terrenos cultivados se remonta casi al nacimiento mismo de la agricultura. El incremento en la producción y consumo de fertilizantes químicos en una agricultura intensiva disminuyó la atención hacia los abonos orgánicos en la época 1940- 1970, pero en la actualidad vuelven a cobrar gran importancia los estudios con abonos orgánicos, debido a que la creciente escasez y alto costo de los energéticos en el mundo restringirá la producción de abonos químicos, por lo que debe buscarse el aprovechamiento máximo de los orgánicos (Núñez, 1990).

Los abonos orgánicos muestran sobre los químicos, las siguientes ventajas:

1. Mayor efecto residual.
2. Aumento en la capacidad de retención de humedad del suelo a través de su efecto sobre la estructura (granulación y estabilidad de agregados), la porosidad y la densidad aparente.
3. Formación de complejos orgánicos con los nutrientes manteniendo a éstos en forma aprovechable para las plantas.

4. Reducción de la erosión de los suelos, al aumentar la resistencia de los agregados a la dispersión por el impacto de las gotas de lluvia y al reducir el escurrimiento superficial.
5. Elevación de la capacidad de intercambio catiónico del suelo, protegiendo los nutrientes de la lixiviación.
6. Liberación de CO₂ que propicia la solubilización de nutrientes.
7. Abastecimiento de carbono orgánico, como fuente de energía, a la flora microbiana heterogénea.

Los efectos benéficos generales de la adición de abonos orgánicos al suelo se traducen en una elevación de los rendimientos que muchas veces no se logra con los fertilizantes químicos (Núñez, 1990).

V. ANTECEDENTES

Existen varios métodos que permiten obtener una mayor producción de metano, tales como agregar aditivos orgánicos e inorgánicos, pre-tratamientos de los residuos, variación en los parámetros de operación, codigestión, etc.

Aditivos biológicos, incluidas diferentes plantas, maleza, residuos de cultivos, cultivos microbiológicos, etc., los cuales están disponibles naturalmente en los alrededores, pueden ser usados para el mejoramiento significativo en las plantas productoras de biogás. Las hojas de algunas plantas y legumbres como *Leucacena leucocephala*, *Acacia auriculiformis*, *Dalbergia sisoo* y *Eucalyptus tereticornis*, se ha encontrado que estimulan la producción de biogás entre un 18 y 40 %.

Las cepas de algunas bacterias y hongos también pueden aumentar la producción de biogás debido a la estimulación de la actividad enzimática. Cepas de bacterias como actinomicetos se ha demostrado que mejoran la producción de biogás en un rango de entre 8.4 – 44 % utilizando como sustrato estiércol de bovino (Tirumale y Nand, 1994; Attar *et al.*, 1998)

Wong y Cheung (1995); encontraron que la planta con un alto contenido de metales pesados (cromo, cobre, níquel y zinc) tienen una mejor producción de metano. La adición de sales en varias concentraciones [FeSO_4 (50mM), FeCl_3 (70 μM)] también aumenta la producción de gas (Wodzinski *et al.*, 1983; Patel *et al.*, 1993; Rao y Seenayya, 1994; Clark y Hillman, 1995).

Los residuos que sirven como sustrato en el reactor algunas veces requieren un pre-tratamiento para incrementar la producción de biogás en el proceso de digestión anaerobia. El pre-tratamiento degrada las estructuras orgánicas complejas en moléculas simples, las cuales son más susceptibles a la degradación microbiana. Los pre-tratamientos pueden ser:

- 1) Pre-tratamiento de los residuos con álcali o ácido.
- 2) Pre-digestión de los sustratos frescos.
- 3) Pre-tratamiento termoquímico.

Tratamiento con álcali (1 % de NaOH por 7 días) a los residuos de plantas como paja, hojas de manzana u hojas de durazno cuando son usados como suplementos del estiércol dan como resultado un incremento de hasta el doble en la producción de metano (Dar y Tandon, 1987).

Entre los métodos biológicos que ayudan a mejorar la producción de metano, Capela *et al.*, (1999), reportaron la influencia positiva de un tratamiento de pre-composta en el arranque que mejoró la digestión anaerobia utilizando como sustrato medula molida.

Otro tratamiento que al igual ayuda a mejorar la producción de metano son los pre-tratamientos mecánicos; debido a que si el sustrato tiene un alto contenido de fibra y baja degradabilidad, esto conlleva a una mayor producción de biogás; y además, la reducción del tamaño lleva a una digestión más rápida (Palmowsky y Müller, 1999 a,b).

Angelidaki y Ahring (1999) encontraron un aumento del 17 % en la producción de biogás después de realizar una maceración mecánica del contenido de fibras en el

estiércol. En general, las fibras pequeñas, aumentan el potencial de producción de biogás. El mejor resultado mostró un incremento del alrededor del 20 % con fibras menores de 0.35 mm. El pre-tratamiento de fibras con hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de Amonio (NH₄OH) o con una combinación de estos lleva a un incremento potencial de metano.

El mejoramiento de la producción de biogás puede ser controlado monitoreando la variación de los parámetros de operación, tales como: temperatura, pH, tamaño de partícula, agitación, concentración de sólidos, tiempo de retención hidráulica, etc.

Mata-Alvarez *et al.* (2000), encontraron que la producción de metano puede mejorar cuando existe un alto contenido de humedad de entre 90-96 % en el sustrato y un pH entre 6.6 - 7.8 (siendo el óptimo 6.8). Jain y Mattiasson (1998) encontraron que con pH por encima de 5.0, la eficiencia de la producción de biogás fue más de 75 %.

La temperatura es un factor determinante durante el proceso de digestión anaerobia, un incremento de temperatura en el proceso también produce un aumento en la producción de metano, de forma similar el efecto del tiempo de retención hidráulica también es directamente proporcional a la producción de biogás (Álvarez *et al.*, 2006).

Un mínimo de 0.6 % de nitrógeno es necesario para las bacterias metanogénicas, pero si por el contrario, existe un exceso de nitrógeno en el sustrato, se forma amoníaco, el cual causa inhibición en el crecimiento celular y lleva a una disminución o eliminación de la producción de metano (Álvarez *et al.*, 2006).

El proceso de digestión anaerobia puede ser mejorado con una mezcla de sustratos, también llamada codigestión. La codigestión de mezcla de residuos sólidos de aguas residuales y residuos sólidos provenientes de frutas y verduras muestra un desempeño estable. Los resultados confirman la suposición de que los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia prefieren vivir en un micro-ecosistema balanceado (Gómez *et al.*, 2006).

Otro de los objetivos perseguidos al realizar la digestión anaerobia es la producción de biosólidos, es decir, la materia orgánica sólida resultante del tratamiento que puede ser aplicada de forma benéfica en el suelo, debido a que es una excelente fuente de nitrógeno, fósforo, materia orgánica, y otros nutrientes, que pueden mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, así como el rendimiento de los cultivos.

Las tasas de de aplicación de los biosólidos son específicas y se determinan con base en las propiedades del suelo, los nutrientes y concentración de metales pesados y las necesidades nutricionales del cultivo (Kinney *et al.*, 2006).

Ming-gang *et al.* (2008), determinaron un mayor rendimiento en la producción de arroz así como una mayor acumulación de materia seca y absorción de nutrientes en el suelo, aplicando un biosólido obtenido de la mezcla de cerdaza y fertilizante químico (50:50). La aplicación de abonos orgánicos con fertilizantes químicos aumentó el rendimiento y la eficiencia en el uso del nitrógeno en el cultivo de arroz, además redujo el riesgo de contaminación del medio ambiente y mejoró la fertilidad de los suelos en gran medida.

Por otra parte, Tejada y González (2007) determinaron que la aplicación de un biosólido a partir de los residuos del desmotado del algodón, mejora las propiedades físicas (la estabilidad estructural, densidad), químicas (porcentaje de sodio intercambiable), y biológicas (biomasa microbiana, la respiración del suelo, y actividades enzimáticas) del suelo; además de aumentar el rendimiento y la calidad del trigo.

La aplicación de biosólidos a partir de gallinaza al igual que el residuo del desmotado del algodón produjo un efecto positivo en la propiedades biológicas de los suelos, aunque al final de la experimentación, la biomasa microbiana y la actividad enzimática del suelo fue más alta en el tratamiento con gallinaza (Tejada *et al.*, 2006). Sin embargo, la influencia de los biosólidos sobre las propiedades del suelo depende de la cantidad, tipo, tamaño y elemento dominante del material orgánico (Barzegar *et al.*, 2002).

La incorporación de biosólidos al suelo influye en la actividad enzimática debido a que el material añadido puede contener enzimas intra y extracelulares y también puede estimular la actividad microbiana en el suelo (Goyal *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 1998). Las enzimas son catalizadores biológicos de reacciones específicas y estas reacciones, a su vez, dependen de una variedad de factores (Burns, 1978) como la presencia o ausencia de inhibidores, el tipo de modificación, tipo de cultivo, etc. Las enzimas del suelo son buenos indicadores de la fertilidad del mismo ya que participan en el ciclo de los nutrientes más importantes. García *et al.* (1994), indicó que el efecto positivo de los biosólidos sobre la calidad biológica del suelo se debe a la estimulación de crecimiento microbiano y / o la adición de

microorganismos o enzimas que puede contrarrestar el efecto negativo producido por algunos compuestos tóxicos.

El tratamiento de los suelos con biosólidos también favorece la aparición de vegetación espontánea, que protegerá la tierra y contribuirá a su restauración. En consecuencia, la adición de estos materiales orgánicos puede considerarse una buena estrategia para recuperar zonas semiáridas (Tejada *et al.*, 2006).

Por esta razón, en la última década la aplicación de residuos orgánicos con un alto contenido de materia orgánica en los suelos, tales como el estiércol animal, lodos residuales, basura de las ciudades, compostas y residuos de las cosecha, son prácticas agrícolas y ambientales para conservar la materia orgánica del suelo, además de que permite la recuperación de suelos degradados, y el suministro de los nutrientes a las plantas. Sin embargo, el efecto que el biosólido produzca en el suelo depende de la cantidad, tipo y tamaño del material orgánico.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Localización del experimento

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) y en 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 Estiércol de bovino

Se trabajó con estiércol de bovino, el cual fue proporcionado por el Rancho Universitario de la UAEH. Éste se recolectó en estado fresco.

6.2.2 Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (RSOPT)

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

6.3 Establecimiento del experimento

El trabajo experimental consistió en determinar la producción de metano, así como la evolución de los diversos parámetros físico-químicos y microbiológicos y la

realización de un ensayo biológico de germinación al fertilizante orgánico obtenido al final de la codigestión de estiércol y RSOPT.

6.4 Diseño de tratamientos

Se realizaron tres tratamientos en microcosmos de 75 mL, cada uno con 7 repeticiones. En el primero, se utilizó como sustrato estiércol; en el segundo, RSOPT y finalmente el tercero fue una mezcla (50 p/p) de ambos residuos, el porcentaje de cada residuo en la mezcla fue determinado en base a estudios previos sobre la producción de biogás, tales como: Biogas production from llama and cow manure at high altitude (Álvarez *et al.*, 2006); Livestock waste-to-bionergy generation opportunities (Cantrell *et al.*, 2008); Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of municipal solid wastes (Gómez *et al.*, 2006) y Dynamics of pruning waste and spent horse litter co-composting as determined by chemical parameters (Benito *et al.*, 2009).

La concentración de sólidos en los microcosmos fue de 8 % y se mantuvieron a una temperatura constante de 35° C.

Los microcosmos fueron muestreados semanalmente para la cuantificación de biogás, y cada 60 días se abrieron dos microcosmos, para monitorear la evolución del proceso de biodigestión. Dichas muestras fueron congeladas para evitar cambios antes de realizar los análisis pertinentes.

6.5 Variables de estudio

6.5.1 Análisis físico-químicos

A las muestras obtenidas de los microcosmos abiertos se les determinaron los siguientes parámetros: Demanda Química de Oxígeno (DQO), azúcares totales, potencial de Hidrogeno (pH), ácidos grasos volátiles (AGV's), producción de metano, sólidos totales (ST), sólidos fijos (STF), sólidos volátiles (STV), concentración de nitrógeno (N_2), concentración de fósforo (P), carbono orgánico (CO) y relación Carbono/Nitrógeno (C/N).

6.5.1.1 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 $150^{\circ}C$ 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 blok 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).

6.5.1.2 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.

6.5.1.3 Potencial de Hidrógeno (NMX-FF-109-SCFI-2007)

La evaluación electrométrica del pH 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 durante varios minutos para obtener una mezcla homogénea, se introdujo el electrodo y se registró la lectura una vez estabilizada.

6.5.1.4 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 cabo en un equipo de electroforesis capilar (marca Beckman Coulter modelo P/ACEMDQ Glycoprotein System fabricado en Estados Unidos) con un capilar de silica fundida de 47 cm X 75 μm D.I. X 375 μm D.E., 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 Benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COOH}$) 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 50ppm, propiónico 50ppm y butírico 50ppm (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 μm . Finalmente con base en los tiempos de las áreas de los cromatogramas se identificó el tipo de AGV y de acuerdo con las concentraciones de cada uno de los componentes del testigo se realizaron los cálculos.

6.5.1.5 Determinación de concentración de metano por Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es un método de separación, dicha separación de los analitos depende de las distintas fracciones de tiempo que pasen disueltos en la fase estacionaria. Los componentes mas solubles son retenidos más tiempo ya que tardan menos viajando en el gas acarreador. 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. El volumen de inyección fue de 0.5 µL. La temperatura del detector fue de 200° C, la del inyector de 150° C y la de la columna de 50° C (APHA/AWWA/WPCF., 1989).

6.5.1.6 Sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV) y sólidos totales fijos (STF)

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, y después se colocó en un desecador durante 1 hora, se registró el peso de la cápsula (P1), posteriormente se colocó la muestra en la cápsula para evaporarla a 103-105° C durante 24 horas. El aumento de peso sobre la cápsula (P2) 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, No. 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 (P3) 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 totales volátiles y sólidos totales fijos, se determinaran mediante las siguientes ecuaciones:

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

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

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

Donde: ST: Sólidos Totales

STV: Sólidos Totales Volátiles

STF: Sólidos Totales 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

6.5.1.7 Determinación de Nitrógeno

La materia nitrogenada total en el estiércol, RSOPT y en la mezcla de ambos residuos se determinó con el método Kjeldahl, para el cual fue necesario preparar las siguientes soluciones:

1. Disolución indicadora de ácido bórico (2 %). Se pesaron 20 g de ácido bórico seco y se disolvieron en 500 mL agua y 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:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(\text{mL. Problema} - \text{mL. Blanco}) (\text{meq. N}) (\text{normalidad del } H_2SO_4)}{\text{Peso de la Muestra}} * 100$$

6.5.1.8 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 el estiércol, en el RSOPT y en la mezcla de ambos residuos, fue necesario preparar las siguientes soluciones:

1. Solución patrón: Se pesaron 219.5 mg de fosfato monobásico de potasio anhidro (KH_2PO_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 a 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 e 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 0.040 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 KH_2PO_4 con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm.

6.5.1.9 Determinación de carbono orgánico

El carbono orgánico se determinó con base a la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2007 (2007), mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{CO} = \frac{\% \text{STV}}{1.724}$$

Donde: % CO= Carbono Orgánico en porcentaje

% STV = Sólidos Totales Volátiles

1.724 = Factor Van Benmelen

6.5.1.10 Determinación de la relación carbono-nitrógeno

Es necesario mantener la relación apropiada de la materia de base en el proceso de digestión anaerobia (NMX-FF-109-SCFI-2007, 2007). Esta se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C/N = \frac{CO (\%)}{NT (\%)}$$

Donde: C/N= Relación Carbono/Nitrógeno

% CO= Carbono Orgánico en porcentaje

% NT= Nitrógeno Total

6.5.2 Análisis microbiológicos

A las muestras obtenidas de los microcosmos abiertos se les realizaron análisis microbiológicos para la cuantificación de Salmonella y coliformes totales.

6.5.2.1 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°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° 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 periodo especificado para la incubación, se contaron las colonias con el contador de colonias marca Leica modelo 3327 fabricado en Estados Unidos.

6.5.2.2 Determinación de Salmonella

La Salmonella es un microorganismo patógeno perteneciente al grupo de Enterobacterias, bacilo gram negativo, aerobio, no esporulado que forman colonias típicas en medios selectivos sólidos y que presentan además las características bioquímicas y serológicas. Los miembros del género Salmonella han sido muy estudiados como patógenos. Existen diferentes protocolos para el aislamiento de Salmonella, todos ellos son esencialmente similares en principio y emplean las etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales, identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

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 60g 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-SSA1-1994).

6.5.3 Ensayo Biológico

6.5.3.1 Germinación

El biosólido (fertilizante) obtenido al finalizar el proceso de codigestión fue utilizado para la realización de un ensayo biológico de germinación, utilizando semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) variedad San Miguel (Figura 2).



Figura 2. Ensayo biológico de germinación con alfalfa variedad San Miguel

Se realizaron 12 tratamientos y un blanco, utilizando una densidad de siembra de 50Kg/ha, con doce repeticiones cada uno; variando la dosis de fertilización y el tipo de biosólido, estabilizado a un 3.74 % de ST; tal como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Diseño de tratamientos

Tipo de biosólido	Dosis de fertilización (Kg/ha)
Blanco	0
RSOPT	1, 2, 3, 4
Estiércol	1, 2, 3, 4
Mezcla	1, 2, 3, 4

RSOPT-Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia

El ensayo se realizó durante 15 días, durante los cuales cada tercer día se monitoreo la velocidad de emergencia y el porcentaje de establecimiento mediante las siguientes fórmulas:

$$V_1E_1 = \frac{C_1}{n_1} + \frac{C_2 - C_1}{n_2} \dots \dots \frac{C_x - C_y}{n_x}$$

Donde: V_1E_1 = Velocidad de emergencia

C_1 = Plántulas emergidas cada día hasta alcanzar el 100 %

n_1 = Días transcurridos desde la siembra

$$\% \text{ de establecimiento} = \frac{\text{No. de plantas a determinado periodo}}{\text{No. de semillas}}$$

En el ensayo se observó el efecto del fertilizante sobre el proceso de germinación, esto se determinó mediante la observación del número de germinados midiendo la

longitud y diámetro de la raíz, así como el peso fresco, peso seco y peso corregido por cenizas, además de la longitud y diámetro del hipocótilo (tallo), tal como se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Medición de tallo y raíz de germinado de alfalfa

6.6 Análisis de resultados

Para el análisis de resultados de los parámetros físico-químicos del proceso de biodigestión se utilizó un diseño en bloques, realizando un análisis por duplicado ($n=2$); utilizando análisis de varianza. Cuando hubo diferencias de $P<0.05$ se utilizó la Prueba de comparación de medias de Duncan.

Para el análisis de resultados del ensayo biológico de germinación se utilizó un diseño experimental completamente al azar de una sola vía, realizando un análisis por triplicado ($n=3$); utilizando análisis de varianza. Cuando hubo diferencias de $P<0.05$ se utilizó la Prueba de comparación de medias de Tukey.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evolución de parámetros físico-químico

7.1.1 Demanda Química de Oxígeno

La pérdida de la materia orgánica fue sustancial durante la etapa bio-oxidativa, encontrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. La pérdida de la materia orgánica correspondiente a la mayor degradación ocurrió durante los primeros 90 días, siendo ésta en el tratamiento 1 y 3 (estiércol y mezcla respectivamente) de 35 y 30 % respectivamente, mientras que en el caso del tratamiento 2 (RSOPT) ésta fue de aproximadamente 75 %, tal como se muestra en el Cuadro 3. Estos datos son similares a los reportados por Benito *et al.*, (2009) en un proceso de digestión anaerobia de estiércol de caballo, en dicho estudio la pérdida de materia orgánica fue de 38 % y durante la fase de maduración la pérdida fue menor, lo cual fue indicativo de la estabilidad del biosólido.

Cuadro 3. Evolución de DQO (mg/L) durante el proceso de biodigestión

Tratamiento	Días			
	0	60	120	180
Estiércol	117,166	90,007	76,079	53,795
RSOPT	22,806	7,660	5,919	696
Mezcla (50:50)	51,010	40,390	31,859	18,976

DQO-Demanda química de oxígeno RSOPT –Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

Los resultados son congruentes con la evolución del rango de CO₂. Después de la fase bio-oxidativa la concentración de CO₂ permanece estable hasta el final del proceso. Este puede ocurrir por que los compuestos de fácil biodegradación fueron metabolizados durante la primera etapa del proceso (Benito *et al.*, 2009).

7.1.2 Azúcares totales

Los microorganismos utilizan rápidamente los carbohidratos fácilmente biodegradables (hemicelulosas y celulosas) y los lípidos presentes, para posteriormente degradar compuestos complejos, tales como la lignina que es el material más resistente a la degradación (Leal, 1990).

Es por ello que en los primeros 90 días aproximadamente se observó el mayor consumo de en los 3 tratamientos (Figura 4). Existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) tanto en la cantidad de azúcares presentes al inicio del proceso en cada tratamiento como en la degradación de los mismos, el estiércol presentó una concentración de azúcares superior al inicio del proceso (3 más que en el caso de la mezcla de residuos 50:50 y 11 más que en el RSOPT) comparado con los otros residuos; mientras que la degradación en el caso de la mezcla de ambos residuos fue mayor (70 %) comparada con el 60 y 55 % en el caso del estiércol y del RSOPT respectivamente.

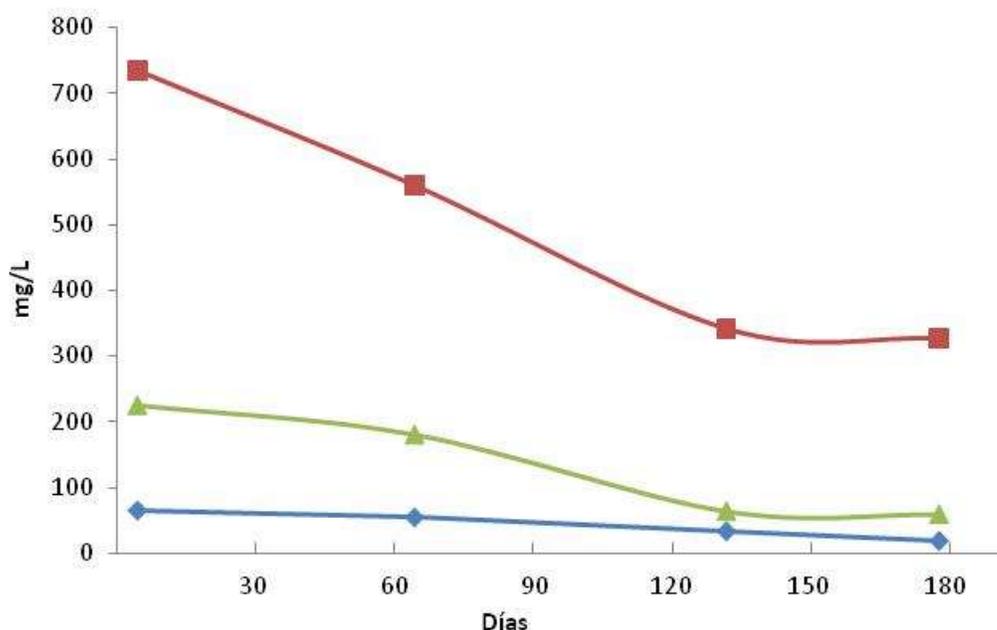


Figura 4. Evolución de la degradación de los azúcares totales durante el proceso de co-digestión utilizando como sustratos estiércol (■), residuo sólido orgánico de la producción de tilapia (◆) y mezcla de ambos residuos 50:50 (▲).

7.1.3 pH

El pH es un parámetro importante que afecta el crecimiento de microbios durante la fermentación y éste debe mantenerse dentro del digestor anaerobio en un rango ideal que se encuentra entre 6.8-7.2. Una solución demasiado ácida puede frenar bruscamente el proceso de fermentación. Si el pH aumenta, traerá como consecuencia la formación de CO_2 y el proceso de digestión disminuirá; pero si el pH baja, las bacterias no serán capaces de utilizar los materiales ácidos adecuadamente y el proceso se detendrá completamente, debido entonces a que las condiciones de trabajo para las bacterias metanogénicas son muy estrictas y en un rango muy limitado y cercano a la neutralidad (Amaya, 1990).

Durante el proceso de biodegradación, el valor de pH presentó un incremento como consecuencia de la degradación y mineralización de los compuestos orgánicos, encontrando que el tratamiento que utilizó como sustrato estiércol presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a los otros dos tratamientos (RSOPT y mezcla de ambos residuos) presentando el pH más bajo (5.9) al inicio del proceso; sin embargo, son valores cercanos a la neutralidad, por lo cual no afecta la producción de metano (Cuadro 4).

La cantidad del bióxido de carbono y los ácidos grasos volátiles que se producen durante el proceso anaerobio afecta el pH del digester. Yadvika *et al.* (2004), encontraron que con un pH arriba de 5.0, la eficacia de la producción de metano es mayor.

Cuadro 4. Evolución del pH durante el proceso de biodigestión

Tratamiento	Tiempo (Días)			
	0	60	120	180
Estiércol	5.90	5.92	7.30	7.35
RSOPT	7.26	7.34	7.52	7.75
Mezcla (50:50)	6.70	7.49	7.56	7.60

RSOPT- Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia

7.1.4 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

Para que un proceso de digestión anaerobia se desarrolle eficazmente debe existir una concentración de AGV's, menor de 2000 mg/L (Yadvika *et al.*, 2004). Es lógico asumir que parte de la materia orgánica hidrolizada se convierte en ácidos grasos volátiles y si la concentración de AGV's no es suficientemente alta para sobrepasar la capacidad buffer del sistema, el pH permanece sin cambios (Gómez *et al.*, 2006).

Respecto a los AGV's, éstos presentaron una disminución debido a la metanogénesis, esto ocurre en los tres tratamientos; sin embargo, el tratamiento 1 y 3 (estiércol y mezcla de ambos residuos respectivamente) presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el tratamiento que utilizó como sustrato el RSOPT, tanto en el contenido de ácidos al inicio del proceso como en el consumo de los mismos durante la biodigestión.

El tratamiento que utilizó como sustrato estiércol, es el que presentó mayor contenido de ácidos grasos volátiles, seguido de la mezcla de ambos residuos (50:50), y finalmente el RSOPT presentó la menor cantidad, sin embargo, lo ideal en el proceso de biodigestión para la producción de energéticos como el metano es que la mayor cantidad de AGV's, se convierten en biogás (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evolución de AGV's durante el proceso de biodigestión

Tiempo (días)	AGV's (ppm)		
	AA	AP	AB
Estiércol			
0	2,800.95	3,831.60	1850.10
60	2,770.00	3,236.90	1,609.30
120	2,456.55	703.40	ND
180	1,016.75	254.05	ND
RSOPT			
0	560.70	68.27	ND
60	420.16	37.77	21.24
120	109.90	25.86	ND
180	99.69	ND	ND
Mezcla (50:50)			
0	2,137.95	434.65	ND
60	1,075.55	324.55	ND
120	559.30	65.38	ND
180	318.35	ND	ND

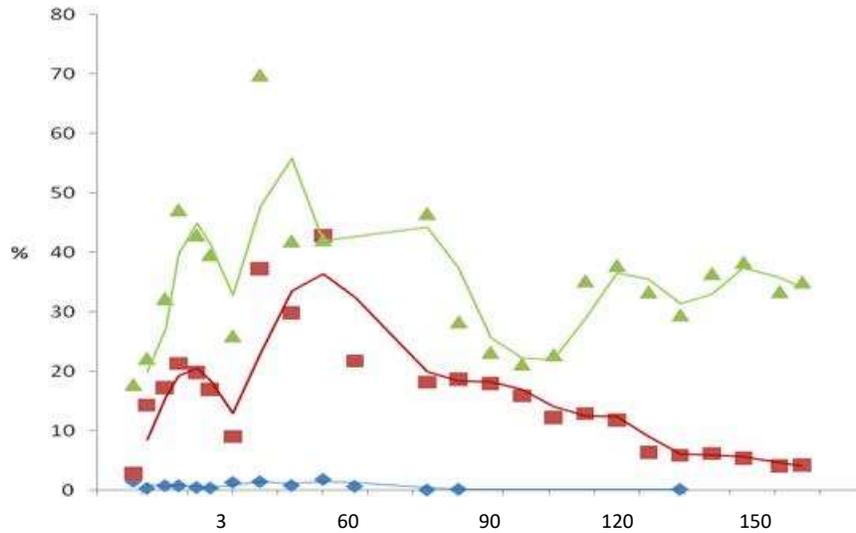
AGV's-Ácidos grasos volátiles AA-Ácido acético AP-Ácido Propiónico AB-Ácido Butírico
 ND- No detectado RSOPT –Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

7.1.5 Producción de metano y CO₂

La mayor producción de metano y menor producción de CO₂ se obtuvo en la biodigestión de la mezcla de residuos (50:50), mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$) comparado con los otros dos tratamientos (estiércol y RSOPT). La producción de metano fue de forma ascendente durante los primeros 90 días

aproximadamente con un 70 % de metano, mientras que el estiércol solo alcanzó un 43 % y el RSOPT el 2 % (Figura 5).

(a)



(b)

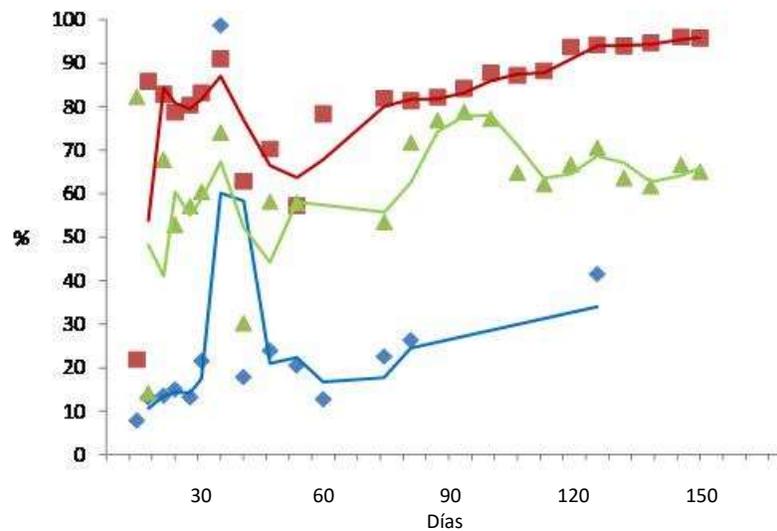


Figura 5. Producción de biogás, cuantificación de (a) metano de la digestión anaerobia de estiércol (■), Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (◆) y mezcla (▲) y (b) de CO₂ de la digestión anaerobia de estiércol (■), Residuo Sólido Orgánico de la Producción de Tilapia (◆) y mezcla (▲).

Este porcentaje fue similar al reportado por Álvarez, *et al.* (2006) quienes manejaron una producción de metano de entre 40 – 60 % utilizando como sustrato residuo de bovino y entre 20 – 57 % utilizando residuo de *Lama glama* (llama), al igual que Cantrell *et al.* (2008) que mostraron resultados de varios experimentos modificando algunos factores como el tiempo de retención hidráulica, la carga, el tipo de sustrato, entre otros, obteniendo producción de biogás con concentraciones de metano de entre 33 – 69 %.

7.1.6 Sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV) y sólidos totales fijos (STF)

Tal como se muestra en el Cuadro 6, los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la evolución de los sólidos totales, fijos y volátiles durante el proceso de biodigestión. El tratamiento que utilizó como sustrato estiércol presentó al inicio del proceso mayor concentración de ST y como consecuencia mayor concentración de STV y menor de STF, comparado con los otros tratamientos.

Alvarez *et al.*, (2006) reportaron porcentajes de ST de 15.6 % y 59.5 % en estiércol de bovino y de *Lama glama* (llama) respectivamente, de los cuales el 82.8 % y 74.4 % son STV; mientras que Amaya (1990) en un estudio realizado con estiércol de bovino y cerdo como sustrato, éstos presentaron porcentajes de ST de 17.6 % y 18.3 % respectivamente; estos datos son muy superiores a los obtenidos en este estudio, los cuales al inicio del proceso fueron de 9.32 % en el

estiércol de bovino, 4.43 % en el RSOPT y 7.89 % en el caso de la mezcla (50:50) de ambos residuos.

Cuadro 6. Evolución de Sólidos Totales durante el proceso de biodigestión

Tiempo (días)	ST (%)	STF (%)	STV (%)
Estiércol			
0	9.32	25.6	74.4
60	8.75	36.1	63.9
120	8.54	48.4	51.6
180	8.23	52.2	44.4
RSOPT			
0	4.43	85.3	14.7
60	4.15	91.2	8.8
120	4.10	93.8	6.1
180	4.05	94.2	5.7
Mezcla (50:50)			
0	7.89	51.8	48.2
60	7.01	67.7	32.3
120	6.35	75.2	24.8
180	6.02	78.6	21.4

ST-Sólidos Totales STV-Sólidos volátiles STF-Sólidos fijos RSOPT –Residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia

En forma general, podemos decir que la cantidad de ST y más concretamente de STV al final del proceso en los 3 tratamientos presenta una disminución debida a

la descomposición de la materia orgánica, la cual se transforma en metano; mientras que los STF aumentan, debido a que se concentra la materia inorgánica. Como se observa, la materia orgánica al finalizar el proceso de co-digestión debe ser superior al 50 % de los sólidos totales, lo cual hace del residuo un excelente acondicionador de suelos (Amaya, 1990).

7.1.7 Nitrógeno

El contenido de N₂ en el estiércol de bovino reportado como mínimo requerido es de 0.6 % necesario para la incorporación dentro de la estructura celular de las bacterias metanogénicas (Álvarez *et al.*, 2006), por otra parte, un exceso de nitrógeno en el sustrato conduce a la formación de amonio, el cual puede causar la inhibición y crecimiento celular y conllevar a la disminución o eliminación de la producción de metano. Las formas solubles de nitrógeno son asimiladas de inmediato, y las formas insolubles son solubilizadas antes de ser usadas por los microorganismos (Leal-Lara, 1990)

La actividad metanogénica disminuye con el incremento en la concentración de N₂ (Mata-Álvarez *et al.*, 2000). La concentración de N₂ en los 3 tratamientos presentó alta estabilidad durante todo el proceso, sin embargo, presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los mismos. La concentración de N₂, fue un 20 % mayor en el estiércol que en la mezcla (50:50) de ambos residuos y en el RSOPT (Cuadro 7), pero debido a la producción de metano que en el tratamiento del estiércol fue menor, puede deducirse que el N₂ se encontraba en forma no

disponible o en exceso para las bacterias metanogénicas, lo cual pudo ser causal de la disminución en la producción del bioenergético.

Por otra parte, en el caso de la mezcla y del RSOPT las concentraciones presentadas fueron similares a las reportadas por Álvarez *et al.* (2006) de 0.05 % y 0.14 % en estiércol de bovino y de llama respectivamente durante un proceso de biodigestión.

Cuadro 7. Evolución de la concentración de Nitrógeno durante el proceso de biodigestión expresada en %

Tratamiento	Tiempo (Días)			
	0	60	120	180
Estiércol	0.25	0.24	0.23	0.21
RSOPT	0.06	0.05	0.05	0.03
Mezcla (50:50)	0.15	0.14	0.12	0.11

RSOPT –Residuo sólido orgánico de la producción de Tilapia

En un estudio realizado por Benito *et al.*, (2009) utilizando como sustrato estiércol de caballo mezclado con residuos de jardinería encontraron que el N₂ presenta un descenso durante los primeros 120 días del proceso (de 8.9 g/Kg hasta 7.0g/Kg) para presentar un incremento al finalizar el mismo.

7.1.8 Fósforo

El fósforo es un elemento que debe conservarse hasta el final del proceso de co-digestión, debido a que éste es indispensable en cualquier fertilizante orgánico, ya que es un nutriente necesario para la tierra y los cultivos. La concentración de fósforo al inicio del proceso de biodegradación, presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los 3 tratamientos, siendo un 50 % mayor en el tratamiento con estiércol comparado con el de la mezcla (50:50) de ambos residuos y alrededor de 90 % mayor que en el caso del tratamiento de RSOPT.

El porcentaje de fósforo se mantiene prácticamente sin variación durante todo el proceso en los 3 tratamiento, siendo en promedio de 1.22 % en el caso del estiércol de bovino, 0.10 % en el caso del RSOPT y alrededor de 0.43 % en la mezcla de ambos residuos (50:50), datos inferiores a los reportados por Álvarez *et al.*, (2006) quienes encontraron 2.4 % y 5.2 % en estiércol de bovino y de llama respectivamente. Esta diferencia puede deberse a la diferencia climática y fisiológica de los animales, ya que el estudio realizado por Álvarez *et al.* (2006), se desarrollo en Perú, una región que presenta diferencias en altitud, clima y como consecuencia en el tipo de alimentación del ganado (Cuadro 8).

Cuadro 8. Evolución de la concentración de fósforo durante el proceso de biodigestión expresado en %

Tratamiento	Tiempo (Días)			
	0	30	60	90
Estiércol	1.25	1.31	1.24	1.08
RSOPT	0.15	0.11	0.09	0.05
Mezcla (50:50)	0.53	0.45	0.45	0.31

RSOPT –Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

7.1.9 Carbono orgánico

En la mayoría de los laboratorios se sigue usando el factor de Van Benmelen de 1.724 para estimar la materia orgánica (M.O.) a partir del carbono orgánico, el cual resulta de la suposición de que la M.O. contiene un 58 % (1/0.58) de carbono.

Los resultados de carbono orgánico obtenidos en el proceso de biodegradación, se muestran en el Cuadro 9, en el que se observa que este porcentaje presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los 3 tratamientos y se encuentra alrededor del 3 % en el tratamiento del estiércol, 0.2 % en el del RSOPT y 1.3 % en el de la mezcla de ambos residuos, lo cual corrobora los datos anteriormente mencionados en la sección de Sólidos Totales Volátiles (los cuales representan la materia orgánica, en su mayoría carbono); en donde se mencionó que el tratamiento que utiliza como sustrato el estiércol es el que presenta una mayor cantidad de compuestos orgánicos en comparación con los otros dos tratamientos; y dicho material, durante el proceso de biodigestión se convierte en biogás.

Cuadro 9. Carbono Orgánico (%) durante el proceso de biodigestión

Tratamiento	Tiempo (Días)			
	0	30	60	90
Estiércol	4.02	3.24	2.56	2.12
RSOPT	0.38	0.21	0.15	0.13
Mezcla (50:50)	2.21	1.31	0.91	0.75

RSOPT –Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

7.1.10 Determinación de la relación carbono-nitrógeno

Debe conocerse la cantidad tanto de carbono como de nitrógeno presentes, siendo ambos elementos necesarios para la supervivencia de los microorganismos. Se sabe que estas bacterias requieren de 25 a 30 veces más carbono que nitrógeno (Amaya, 1990).

Si la relación C/N es alta, o sea con poca concentración de N₂, traerá como consecuencia que algunas bacterias mueran por falta de éste, empleando las restantes el N₂ que constituyen las células de aquéllas. En el proceso de asimilación de este N₂, parte del C se oxidará a CO₂, de esta forma la concentración de carbono en el fermentador se reduce cuando las bacterias recobran el N₂ faltante. Entonces la digestión puede continuar, pero el proceso global será mucho más lento que si el material alimentado tuviera una relación más adecuada.

Si la relación es baja, por el contrario el C se terminará antes que el N₂, originando que el proceso de fermentación se detenga y posteriormente el material perderá el N₂ remanente (Amaya, 1990).

La relación C/N durante el proceso de co-digestión, mostró una disminución significativa al final del proceso, tal como lo refiere la literatura; sin embargo, en existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los 3 tratamientos, siendo esta relación mayor en el tratamiento con estiércol y menor en el del RSOPT, aunque en forma general presentan los 3 tratamientos valores semejantes a los obtenidos en otras investigaciones (Cuadro 10).

Cuadro 10. Relación C/N durante el proceso de biodigestión

Tratamiento	Tiempo (Días)			
	0	30	60	90
Estiércol	16.42	14.10	12.17	9.02
RSOPT	8.39	4.46	4.24	2.35
Mezcla (50:50)	14.71	11.42	8.46	5.34

RSOPT –Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

En un estudio realizado por Benito *et al.* (2009) utilizando como sustrato estiércol de caballo mezclado con residuos de jardinería encontraron que la relación C/N presenta un ligero incremento durante los primeros días del proceso, seguido de un descenso de 36.7 hasta 25.8 en un periodo de 190 días. Mientras que según

Amaya (1990), la relación C/N presente en estiércol de bovino es de 23.8 y en estiércol de porcino es de 18.6.

7.2 Análisis microbiológicos

Como se observa en el Cuadro 11, el residuo de Tilapia tuvo un mayor contenido de coliformes fecales (CF) en comparación con el estiércol al inicio del proceso. En la concentración de Salmonella, todos los tratamientos al inicio presentaron cantidades menores a 3.5×10^3 UFC/g. La disminución de Salmonella y coliformes en la digestión anaerobia fue mayor del 99 % en todos los tratamientos. El biosólido obtenido de los 3 tratamientos, cumple con los requerimientos de un biosólido tipo “B” según la EPA (1999), el cual debe presentar concentraciones de coliformes fecales menores a 2×10^6 UFC/g.

Cuadro 11. Evolución microbiológica del proceso de biodigestión (UFC/g)

Tiempo (días)	Estiércol		RSOPT		Mezcla (50:50)	
	<i>Salmonella</i>	Coliformes totales	<i>Salmonella</i>	Coliformes totales	<i>Salmonella</i>	Coliformes totales
0	1.1×10^3	1.8×10^5	3.2×10^3	2.1×10^7	2.3×10^3	1.1×10^5
60	4×10^2	7.4×10^4	1.6×10^3	1.1×10^5	3.1×10^2	1.9×10^4
120	3.5×10^2	3×10^4	1.2×10^2	7.7×10^4	1.1×10^2	5.4×10^3
180	ND	2.1×10^3	ND	ND	ND	3.5×10^2

UFC- unidades formadoras de colonias RSOPT –Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

7.3 Ensayo Biológico

El peso corregido por cenizas en promedio de 1.12 mg, no presentó diferencia significativa entre los diversos tratamientos y el blanco ($P < 0.05$), al igual que la longitud y el diámetro de la raíz y la longitud y el diámetro del hipocótilo, con una media de 0.90 cm, 1.65 cm, 2.85 cm y 0.02 cm respectivamente (Cuadro 12).

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de la velocidad de emergencia y el porcentaje de establecimiento que en promedio fue de 0.84 plantas/día y 62 % respectivamente, datos que indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos y el blanco ($P < 0.05$).

Se observó un efecto positivo en el peso fresco y peso seco en la interacción del biosólido obtenido de la biodigestión del RSOPT, con una dosis de fertilización de 2Kg/Ha resultando mejor que las otras interacciones y que el blanco con $P < 0.05$ (Cuadro 14), lo cual indica que el mejor fertilizante orgánico es el residuo obtenido de la biodigestión de RSOPT con una dosis de 2 Kg/Ha, no obstante los 3 biosólidos cumplen con las especificaciones mínimas requeridas.

Cuadro 12. Resultados de ensayo biológico de germinación

Tratamiento y Dosis	P. C. Cenizas (mg)	Longitud de la raíz (cm)	Diámetro de la raíz (cm)	Longitud del hipocótilo (cm)	Diámetro del hipocótilo (cm)
Blanco	1.3747	1.3122	0.0199	3.1626	0.0325
T1- 1Kg/Ha	2.3086	1.0221	0.0158	3.1604	0.0453
T1- 2Kg/Ha	3.3727	0.5928	0.0184	2.9475	0.0582
T1-3Kg/Ha	0.9308	1.0826	0.0001	2.4796	0.0018
T1-4Kg/Ha	0.2400	0.3144	0.0217	1.3362	0.0362
T2- 1Kg/Ha	0.2911	1.0513	0.0213	2.6036	0.0213
T2- 2Kg/Ha	2.1350	0.0817	1.8134	1.8134	0.0127
T2-3Kg/Ha	0.8658	0.7205	2.2270	2.2270	0.0072
T2-4Kg/Ha	0.8470	0.8609	3.5040	3.5040	0.0198
T3- 1Kg/Ha	0.5007	1.2815	4.0982	4.0982	0.0150
T3- 2Kg/Ha	0.3254	0.8744	2.1576	2.1576	0.0001
T3-3Kg/Ha	0.1803	1.2642	4.0905	4.0905	0.0104
T3-4Kg/Ha	1.1886	1.2747	3.5423	3.5423	0.0140
PROMEDIO	1.1201	0.9026	1.6562	2.8556	0.0211

T1-Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

T2-Estiercol

T3-Mezcla (50:50)

P.C. Cenizas- Peso corregido por cenizas

Cuadro 13. Velocidad de emergencia y porcentaje de establecimiento de ensayo biológico de germinación

Tratamiento y Dosis	Velocidad de emergencia (plantas por día)	Porcentaje de establecimiento (%)
Blanco	1.2439	80
T1- 1Kg/Ha	1.0927	83
T1- 2Kg/Ha	0.3538	25
T1-3Kg/Ha	0.8116	58
T1-4Kg/Ha	1.1113	70
T2- 1Kg/Ha	0.7519	60
T2- 2Kg/Ha	1.0260	84
T2-3Kg/Ha	0.4016	33
T2-4Kg/Ha	1.1466	80
T3- 1Kg/Ha	0.9724	78
T3- 2Kg/Ha	0.6125	54
T3-3Kg/Ha	0.9024	60
T3-4Kg/Ha	0.6095	42
PROMEDIO	0.8489	62

T1-Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

T2-Estiercol

T3-Mezcla (50:50)

Cuadro 14. Peso fresco y peso seco de ensayo biológico de germinación.

Tratamiento y Dosis	Peso seco (g)	Peso fresco (g)
Blanco	0.0040	0.0016
T1- 1Kg/Ha	0.0063	0.0025
T1- 2Kg/Ha	0.0097	0.0039
T1-3Kg/Ha	0.0035	0.0014
T1-4Kg/Ha	0.0021	0.0008
T2- 1Kg/Ha	0.0011	0.0004
T2- 2Kg/Ha	0.0067	0.0027
T2-3Kg/Ha	0.0030	0.0012
T2-4Kg/Ha	0.0029	0.0012
T3- 1Kg/Ha	0.0015	0.0006
T3- 2Kg/Ha	0.0018	0.0007
T3-3Kg/Ha	0.0015	0.0006
T3-4Kg/Ha	0.0036	0.0014

T1-Residuo solido orgánico de la producción de Tilapia

T2-Estiercol

T3-Mezcla

VIII. CONCLUSIONES

Se observó una disminución de DQO, en los tres tratamientos, durante los primeros 90 días; presentando una degradación de alrededor del 30 % en el caso de los tratamientos que utilizó como sustrato estiércol y la mezcla de residuos y de 75 % en el caso del RSOPT; debido a la hidrólisis de compuestos de baja degradación.

La cantidad de azúcares totales presentes al inicio del proceso en los tres tratamientos presentó diferencias significativas; siendo el estiércol el que presentó una mayor cantidad, seguido de la mezcla de residuos. Mientras que el mayor consumo de azúcares se presentó los primeros 90 días siendo éste mayor al 55 % en los tres tratamientos.

El pH durante el proceso permanece en valores cercanos a la neutralidad en los tres tratamientos, lo que es ideal para el proceso de biodigestión.

Los tres tratamientos presentaron una disminución importante en la concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) durante los primeros 90 días de la biodigestión, pero los tratamientos que utilizan como sustrato estiércol y mezcla de residuos fueron los que presentaron una mayor cantidad de estos ácidos,

conllevarlo a una mayor producción de biogás que en el tratamiento que utilizó RSOPT.

Existieron diferencias significativas entre los tres tratamientos respecto a la cantidad de sólidos totales, fijos y volátiles; obteniéndose que el estiércol fuera el tratamiento con un mayor porcentaje de sólidos totales y como consecuencia también un mayor porcentaje de sólidos volátiles (los cuales representan la materia orgánica, en su mayoría carbono) y un menor porcentaje de sólidos fijos en comparación con los otros tratamientos.

La relación C/N presentó una disminución importante al finalizar el proceso de co-digestión en los tres tratamientos, lo cual indica que con el proceso de biodegradación se está transformando la materia orgánica en biogás.

Al finalizar el proceso de co-digestión de los tres tratamientos como resultado de la estabilización de la materia orgánica se produjo un biosólido tipo "B", en el cual hubo una reducción de más del 99 % del contenido de bacterias patógenas y una mineralización de N₂ y P, no obstante, el tratamiento que utilizó como sustrato el estiércol fue el que presentó mayores concentraciones de los nutrientes (N₂ y P), sin embargo la mezcla de residuos cumple con la concentración necesaria de estos dos elementos.

El resultado de este estudio indica que fue significativamente mejor ($P < 0.05$) la mezcla de residuo de bovino y tilapia (50:50) para obtener producción de biogás con una mayor concentración de metano y una menor producción de CO_2 , lo cual ocurre de forma ascendente alrededor de los primeros 90 días.

Por todo lo anterior, la mezcla de residuos de bovino y tilapia (50:50) es el mejor sustrato para la producción de biogás (con mayor concentración de metano) y biosólido tipo "B".

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R., Villca, S., Lidén, G. 2006. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. *Biomass and Bioenergy* 30 (2006) 66-75.
- Amaya, R., 1990. *Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos*. Agt editor, S.A. México. pp. 103-112.
- Angelidaki, I., Ahring, B. 1999. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. In: Mata-Alvarez, J., Tilche, A., Cecchi, F. (Eds.), *Proceedings of Solid Wastes*, Barcelona, vol. 1. Gráficas 92, 15-18 June, pp. 375-380.
- APHA/AWWAWPCF.,1989. *Standar Methods for Examination of Water and Wastewater*, 20th Ed. American Public Health Association 2-59, 5-17 y 5-18.
- 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.
- Attar, Y., Mhetre, S.T., Shawale, M.D., 1998. Biogas production enhancement by cellulytic strains of Actinomycetes. *Biogas Forum I* (72), 11-15.
- Barzegar, A.R., A. Yousefi, and A. Daryashenas. 2002. The effect of addition of different amounts and types of organic materials on soil physical properties and yield of wheat. *Plant Soil* 247:295–301.

- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., Hontoria, C. Almorox, J., 2009. Dynamics of pruning waste and spent horse litter co-composting as determined by chemical parameters. *Bioresouerce Technology* 100:497-500.
- Burns, R.G. 1978. Enzyme activity in soil. Some theoretical and practical considerations. In R.G. Burns (ed.) *Soil enzymes*. Academic Press, New York. pp. 295–340.
- Cantrell, B., Keri, Ducey, Thomas, Ro, S. Kyoung., Hunt, G. Patrick. 2008. Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. *Bioresource Technology* 99 (2008) 7941-7953.
- Capela, I.F., Azeiteiro, C., Arroja, L., Duarte, A.C., 1999. Effects of pre-treatment (composting) on the anaerobic digestion of primary sludges from a bleached kraft pulp mil. In: Mata-Alvarez, J., Tilche, A., Cecchi, F. (Eds.), *Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes*, Barcelona, vol. 1. Gràfiques 92, 15-18 June, pp.113-120.
- Clark, P.B., Hillman, P.F., 1995. Enhancement of anaerobic digestion using duckweed (*Lemna minor*) enriched with iron. *Water Environ. Manage. J.* 10 (2), 92-95.
- Dar, H.G., Tandon, S.M., 1987. Biogas production from pretreated wheat straw, lantana residue, apple and peach leaf litter with cattle dung. *Biol. Wastes* 21, 75-83.
- Environmental Protection Agency-EPA. 1999. EPA 530-R-99-009. *Biosolids generation, use and disposal in The United States*. 81 p.p. E.U.

- Félix, A., Sánchez, S. 1990. Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. Agt editor, S.A. México. pp. 113-122.
- García, C., T. Hernández, F. Costa, and B. Ceccanti. 1994. Biochemical parameters in soils regenerated by the addition of organic wastes. *Waste Manage. Res.* 12:457–466.
- Gómez, X., Cuetos, M.J., Cara, J., Morán, A. García, A.I. 2006. Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes. Conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. *Renewable Energy* 31:2017-2024.
- Goyal, S., M.M. Mishra, S.S. Dhankar, K.K. Kapoor, and R. Batra. 1993. Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term applications. *Biol. Fertil. Soils* 15:60–64.
- Henry, J., Heinke, G., 1996. *Ingeniería Ambiental*. Segunda edición. Prentice Hall. México. pp. 49, 50, 272, 567-600.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática-INEGI. 2006 Anuario Estadístico del Estado de Hidalgo. Edición 2006. [Consultado por última vez el 30 de marzo del 2009 en http://www.inegi.gob.mx:80/est/contenidos/espanol/sistemas/aee06/info/hgo/c13_11.xls]
- Jain, S.R., Mattiasson, B. 1998. Acclimatization of methanogenic consortia for low pH biomethanation process. *Biotech. Lett.* 20 (8), 771-775.

- Kinney, C., Furlong, E., Zaugg, S., Burkhardt, M., Werner, S., Cahill, J., Jorgensen, G. 2006. Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7207-7215.
- Leal-Lara, H. 1990. *Biología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos*. Agt editor, s.a. México. pp. 95-99
- Mata-Alvarez, J, Macé S, Llabrés P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid waste. An overview of research achievements and perspective. *Bioresourcer Technology* 74 (2000) 3-16.
- Ming-gang, X., Dong-chu, L., Ju-mei, L., Dao-zhu, Q., Yagi, K., Yasukazu, H. 2008. Effects of Organic Manure Application with Chemical Fertilizers on Nutrient Absorption and Yield of Rice in Hunan of Southern China. *Agricultural Sciences in China*, vol. 7. pp. 1245-1252
- 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-SSA1-1994. 1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- NOM-114-SSA1-1994. 1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.

- Núñez, R. 1990. Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. Agt editor, s.a. México. pp. 57-64.
- Parra, R. 2005. Efecto de altas descargas puntuales de lactosuero en un sistema de depuración anaerobio. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Pascual, J.A., T. Hernandez, C. Garcia, and M. Ayuso. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresour. Technol.* 64:131–138.
- Patel, V., Desai, M., Madamwar, D., 1993. Thermochemical pretreatment of water hyacinth for improved biomethanation. *Appl. Microbiol, Biotechnol.* 42 (1), 67-74.
- Pérez, R. 2007. Filtración a nivel piloto para depurar el efluente de un reactor UASB que trata agua residual con lactosuero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Rao, P., Seenayya, G., 1994. Improvement of methanogenesis from cow dung and poultry litter waste digesters by addition of iron. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (2), 211-214.
- Rubinson, Judith., Rubinson, Kenneth. 2000. Química analítica contemporánea. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana. México. pp. 301-305.
- Sánchez, M. 2003. Puesta en operación de un reactor anaerobio para el tratamiento de aguas residuales del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación –SAGARPA. 2008a. El Sol de Hidalgo. [Consultado por última vez el 30 de marzo del 2009 en <http://www.oem.com.mx/elsoldehidalgo/notas/n734396.htm>]
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación –SAGARPA. 2008b. Monitor Agroeconómico 2009 del Estado de Hidalgo. [Consultado por última vez el 30 de marzo del 2009 en <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/monitores/HIDALGO%20MAE%202009.pdf>]
- Tejada, M., Gonzalez, J., 2007. Application of Different Organic Wastes on Soil Properties and Wheat Yield. *Agro. J.* 99:1597-1606.
- Tejada, M., Hernández, M., García, C., 2006. Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effects on the Soil Biological Properties *Environ. Qual.* 35:1010-1017.
- Tirumale, S., Nand, K., 1994. Influence of Anaerobic cellulolytic bacterial consortia en the anaerobic digester on biogás production. *Biogas Forum III* (58), 12-15.
- Trevelyan, W.E., Harrison, J.S. 1952. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Journal of Biochemistry.* 50, 298.
- Turk, A., Turk, J., Wittes, T., Wittes, R., 1981. Tratado de ecología. Nueva Editorial Latinoamericana, S.A. de C.V. México. pp. 459-469.
- Turk, A., Turk, J., Wittes, T., 2004. Ecología-Contaminación-Medio Ambiente. Nueva Editorial Mc Graw Hill. México. pp. 141-151.

Wodzinski, R.J., Himes, M.E., Gennaro, R.N., 1983. Effect of addition of Fe³⁺ and Co²⁺ to dairy manure on methane production. Abstr. Annu. Meet. Am.Soc. Microbiol., 83 Meeting, pp.243.

Wong, M.H., Cheung, Y.H., 1995. Gas production and digestion efficiency of sewage sludge containing elevated toxic metals. Bioresour. Technol. 54 (3), 261-268.

Yadvika., Santosh., Sreekrishnan, T.R., Kohli, Sangeeta., Rana, Vineet. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques. Bioresource technology 95:1-10.

X. ANEXOS

Cuadro 15. Cuadro de ANOVA de DQO (mg/L)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	2.31×10^{10}	1.15×10^{10}	1.84×10^{16}
Bloque	3	4.83×10^9	1.61×10^9	2.56×10^{15}
Error	18	1.13×10^9	6.27×10^7	
Total	23	2.91×10^{10}		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 16. Cuadro de ANOVA del contenido de Azucares Totales (mg/L)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	901,102.36	450,551.18	84.98
Bloque	3	175,578.78	58,526.26	11.03
Error	18	95,432.97	5,30.83	
Total	23	1,172,114.12		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 17. Cuadro de ANOVA del pH

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	3.35	1.67	17.26
Bloque	3	3.63	1.21	12.47
Error	18	1.74	0.09	
Total	23	8.72		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-“f” calculada

Cuadro 18. Cuadro de ANOVA del Ácido Acético

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	15,771,593.77	7,885,796.88	55.00
Bloque	3	5,975,538.79	1,991,846.26	13.89
Error	18	2,580,640.10	143,368.89	
Total	23	24,327,772.66		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-“f” calculada

Cuadro 19. Cuadro de ANOVA del Ácido Propiónico

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	19,112,176.51	9,556,088.25	14.96
Bloque	3	8,176,478.87	2,725,492.95	4.26
Error	18	11,490,811.49	638,378.41	
Total	23	38,779,466.87		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 20. Cuadro de ANOVA del Ácido Butírico

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	3,964,812.97	1,982,406.48	8.88
Bloque	3	2,042,024.11	680,674.70	3.05
Error	18	4,014,692.10	223,038.45	
Total	23	10,021,529.19		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 21. Cuadro de ANOVA de Producción de Metano (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	23,351.14	11,675.57	130.23
Bloque	22	6,177.35	280.78	3.13
Error	113	10,130.28	89.64	
Total	137	39,658.78		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 22. Cuadro de ANOVA de Producción de CO₂ (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	110,752.56	55,376.28	192.49
Bloque	22	18,809.22	854.96	2.97
Error	113	32,507.07	287.67	
Total	137	162,068.85		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 23. Cuadro de ANOVA de ST (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	82.86	41.43	206.43
Bloque	3	4.18	1.39	6.95
Error	18	3.61	0.20	
Total	23	90.66		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-“f” calculada

Cuadro 24. Cuadro de ANOVA de STF y STV (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	14,542.63	7,271.31	858.74
Bloque	3	368.94	122.98	14.52
Error	18	152.41	8.46	
Total	23	15,063.99		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-“f” calculada

Cuadro 25. Cuadro de ANOVA del contenido de Nitrógeno (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	0.1373	0.0686	428.75
Bloque	3	0.0039	0.0013	8.12
Error	18	0.0030	0.00016	
Total	23	0.1442		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-“f”

Cuadro 26. Cuadro de ANOVA de Fósforo (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	5.2779	2.6389	2399.00
Bloque	3	0.1071	0.0357	32.45
Error	18	0.1098	0.0011	
Total	23	5.4048		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-“f” calculada

Cuadro 27. Cuadro de ANOVA de Carbono Orgánico (%)

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	42.56	21.28	434.34
Bloque	3	1.72	0.57	11.75
Error	18	0.89	0.04	
Total	23	45.18		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada

Cuadro 28. Cuadro de ANOVA de la relación C/N

	GL	SC	CM	f
Tratamiento	2	465.56	232.78	141.42
Bloque	3	35.16	11.72	7.12
Error	18	29.64	1.64	
Total	23	530.36		

ANOVA-Análisis de Varianza GL-Grados de Libertad CM-Cuadrado Medio f-"f" calculada