

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



SEP

## **TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**LEBEIDA CRUZ GONZÁLEZ**

**CON EL TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LAS VINAZAS PROVENIENTES DE LA  
INDUSTRIADE LA DESTILACIÓN ALCOHÓLICA DEL AGAVE  
COMITECO COMO FUENTE DE NUTRIENTES PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

**MEDIANTE:**

**OPCIÓN I**

**(TESIS PROFESIONAL)**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS**

**AGOSTO 2013**



# RESUMEN

---

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de las vinazas provenientes de la destilación de una bebida alcohólica típica de la región del estado de Chiapas, para ser evaluadas como fuente de nutrientes para la producción de biogás. Las vinazas son aguas residuales consideradas como el producto de cola de la destilación del alcohol etílico, estas contienen una alta carga orgánica expresada en términos de demanda bioquímica de oxígeno y demanda química de oxígeno, debido a este perfil presentan un alto potencial energético. En la caracterización se emplearon las técnicas autorizadas por APHA, AWWA, WPCF-1992 para el tratamiento de aguas residuales y los métodos de la AOAC para los análisis proximales, obteniéndose una DQO de 114.650 g de O<sub>2</sub>/L, pH de 3.8, ST de 71.691 g/L, STV de 62.890 g/L, SST de 9190 mg/L y una concentración de azúcares reductores de 6.18g/L. Posteriormente para llevar a cabo la evaluación de la producción de biogás, se estandarizaron dos tipos de inóculos; estiércol de ganado vacuno y lodos anaerobios, ambos alimentados con vinazas en un reactor por lote en iguales condiciones de operación; las variables monitoreadas fueron pH, DQO y temperatura. Al final, se seleccionó el inóculo de mayor capacidad de remoción de materia orgánica y menor tiempo de adaptación, para ser inoculado en un reactor UASB modificado y evaluar la producción de biogás en función de la DQO removida.

Palabras claves: Vinazas, biogás, fermentación anaerobia, DQO.

# ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN .....	2
II.ANTECEDENTES .....	5
II.1. Biocombustibles .....	5
II.1.1. Tipos de biocombustibles .....	5
II.1.1.1. Biogás .....	6
II.1.1.2. Importancia del biogás. ....	7
II.2. Descripción general del agave .....	8
II.2.1. Etimología.....	8
II.2.2. Taxonomía .....	8
II.2.3. Descripción .....	9
II.2.4. Producción de agave en México .....	10
II.2.5. Uso del agave .....	10
II.3. Descripción general de las vinazas .....	11
II.3.1. Usos de las vinazas .....	11
II.3.2. Caracterización fisicoquímica de las vinazas.....	13
II.4. Digestión anaerobia y aerobia .....	14
II.4.1. Digestión anaerobia .....	14
II.5. Aspectos bioquímicos y microbiológicos en la digestión anaeróbica.....	16
II.5.1. Hidrólisis.....	17
II.5.2. Acidogénesis .....	18
II.5.3. Acetogénesis .....	19
II.5.4. Metanogénesis.....	20
II.6. Factores ambientales que afectan el proceso de la digestión anaeróbica .....	21
II.6.1. pH y Alcalinidad.....	21
II.6.2. Temperatura .....	22
II.6.3. Ácidos grasos volátiles .....	22
II.6.4. Nutrientes .....	23
II.6.5. Velocidad de carga orgánica y tiempo de retención .....	24

II.6.6. Tóxicos e inhibidores .....	25
II.6.7. Tipo de sustrato.....	25
II.6.8. Mezclado.....	26
III.JUSTIFICACIÓN .....	28
IV.OBJETIVOS .....	30
IV.1. Objetivo general .....	30
IV.2. Objetivos específicos .....	30
V.MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
V.1.Obtención de la materia prima .....	32
V.2. Caracterización de la materia prima .....	33
V.3. Análisis Proximales .....	33
V.3.1. Humedad .....	33
V.3.2. Cenizas .....	33
V.3.3. Nitrógeno total.....	34
V.3.4. Grasas.....	34
V.4. Análisis fisicoquímicos .....	35
V.4.1. Acidez y alcalinidad.....	35
V.4.2. Demanda bioquímica de oxígeno.....	36
V.4.3. Demanda química de oxígeno .....	37
V.4.4. Sólidos sedimentables .....	38
V.4.5. Sólidos y sales disueltas .....	38
V.4.6. Sólidos totales .....	39
V.4.7. Sólidos totales volátiles .....	39
V.4.8. Sólidos suspendidos totales .....	39
V.4.9. Sólidos suspendidos totales volátiles .....	39
V.4.10. Sales disueltas totales .....	40
V.4.11. pH.....	41
V.4.12. Factores de alcalinidad .....	41

V.4.13. Ácidos grasos volátiles .....	42
V.4.14. Azúcares reductores .....	43
V.4.15. Fenoles totales .....	44
V.4.16. Fósforo totales .....	44
V.4.17. Sulfatos totales .....	46
V.4.18. Conductividad eléctrica .....	47
V.4.19. Determinaciones en el HPLC .....	47
V.5. Elección del inóculo .....	48
V.5.1. Evaluación del inóculo en un sistema por lote alimentado.....	48
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
VI.1. Obtención de la materia prima .....	50
VI.2. Caracterización de la materia prima .....	50
VI.3. Análisis Proximales .....	50
VI.4. Análisis fisicoquímicos .....	51
VI.4.1. pH.....	52
VI.4.2. Sólidos totales .....	53
VI.4.3. DQO Y DBO <sub>5</sub> .....	53
VI.4.4. Azúcares reductores .....	54
VI.4.5. Fenoles totales.....	55
VI.4.6. Fósforo totales.....	57
VI.4.7. Sulfatos totales .....	57
VI.4.8. Conductividad eléctrica .....	58
VI.5. Elección del inóculo .....	59
VI.5.1. Adaptación del estiércol de ganado.....	60
VI.5.2. Adaptación de los lodos anaerobios .....	61
VI.5.3. Morfología de los inóculos .....	69
VI.5.3.1. Lodos anaerobios .....	69
VI.5.3.2. Lodos del estiércol de ganado vacuno .....	70
VI.5.3.3. Estratificación de gránulos anaerobios.....	71

VII.CONCLUSIONES .....	73
VIII.RECOMENDACIONES.....	75
IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
X.ANEXOS.....	93
Anexo1. Curva estándar de la DQO.....	93
Anexo 2. Curva estándar de azúcares reductores .....	94
Anexo 3. Curva estándar de sulfatos .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes del biogás en función del sustrato utilizado.....	7
<b>Tabla 2.</b> Características fisicoquímicas de vinazas mezcaleras.....	13
<b>Tabla 3.</b> Comparación de los residuos biológicos aerobios y anaerobios en el tratamiento de agua residual. ....	15
<b>Tabla 4.</b> Reacciones acetogénicas y metanogénicas .....	20
<b>Tabla 5.</b> Composición química de las vinazas .....	51
<b>Tabla 6.</b> Composición físico química de las vinazas del comiteco.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inflorescencia de una planta de <i>Agave americana</i> .....	10
<b>Figura 2.</b> Etapas de la digestión anaeróbica .....	17
<b>Figura 3.</b> Vías de la termólisis de la sacarosa y formación de las melanoidinas .....	54
<b>Figura 4.</b> Clasificación de compuestos fenólicos .....	56
<b>Figura 5.</b> Adaptación del estiércol de ganado.....	61
<b>Figura 6.</b> Adaptación de los lodos anaerobios.....	63
<b>Figura 7.</b> Seguimiento de la adaptación de los lodos anaerobios .....	64
<b>Figura 8.</b> Simplificación de la ruta metabólica de Embden-Meyer de degradación de la glucosa por las bacterias metanogénicas .....	67
<b>Figura 9.</b> Remoción de la DQO respecto al pH.....	68
<b>Figura 10.</b> Morfología granular de los lodos anaerobios .....	69
<b>Figura 11.</b> Morfología del inóculo de estiércol de ganado vacuno.....	70
<b>Figura 12.</b> Modelo estructural de un consorcio granular microbiano anaeróbico .....	70



# CAPÍTULO I

---

# I.- INTRODUCCIÓN

---

Hoy en día, existe un creciente interés en el mundo en cuanto al desarrollo de tecnologías para la producción de energías renovables a partir de biomasa.

Esta energía generada es reconocida como biocombustible y ocupa el cuarto lugar como fuente de energía, proporcionando aproximadamente el 14 % de las necesidades energéticas en el mundo (Demirbas, 2003).

Dentro de estas energías renovables se encuentra el biogás, cuya producción se lleva a cabo por una digestión anaeróbica de los desechos de la materia orgánica. De acuerdo a la ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos, considera al biogás como un gas que se produce por la conversión biológica de la biomasa como resultado de su descomposición, el cual es una mezcla de gases principalmente constituida por metano, dióxido de carbono, ácido sulfhídrico, amonio y oxígeno. En una digestión anaeróbica, un consorcio de microorganismos anaerobios convierten los compuestos orgánicos en biogás en un ambiente libre de oxígeno, el principal componente combustible es el gas metano, que es fácilmente quemado con oxígeno o aire para producir agua y dióxido de carbono así como calor. El metano es una fuente de energía limpia y de completa combustión. Mediante cálculos, se sabe que un metro cúbico de metano produce 8570 kcal (Cheng, 2009).

Dentro de los principales residuos orgánicos generados en la industria de la destilería ricos en materia orgánica, se encuentran las vinazas, las cuales son consideradas como el producto de cola de la destilación alcohólica. Estas a su vez, son aguas residuales de naturaleza recalcitrante, con un alto contenido de cargas orgánicas y nutrientes. También son denominados como los residuos que se obtienen después de haber realizado la destilación de azúcares fermentados provenientes de la caña de azúcar, piloncillo, uvas y diferentes especies de agave (Robles-González, *et al.*, 2011).

Estudios realizados a la vinaza de caña de azúcar han mostrado que es un residuo altamente corrosivo y contaminante de las aguas por presentar contenidos altos de materia orgánica (Orlando y Leme, 1984) y nutrientes como nitrógeno y fósforo. Sin embargo, la

composición química dependerá de la materia prima utilizada, de las condiciones climáticas, del suelo y del proceso de elaboración del alcohol (Rodella, *et al.*, 1981).

La vinaza presenta altos niveles de compuestos orgánicos, en términos de demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y demanda química de oxígeno (DQO) (Borja *et al.*, 1993; Vlissidis y Zouboulis 1993; Wilkie *et al.*, 2000).

Contiene principalmente materia orgánica, potasio (K), azufre (S), magnesio (Mg), nitrógeno (N) y calcio (Ca); sin embargo, esta composición es variable según provenga de melaza, jugo o la mezcla de ambos (Gloria y Orlando, 1983).

Los altos contenidos de nitrógeno en la vinaza son suficientes para producir niveles inhibitorios de amoníaco/amonio en los efluentes de las destilerías (Vlissidis y Zouboulis 1993; Wilkie *et al.*, 2000).

La concentración de materia orgánica depende en gran medida del diseño y las condiciones de funcionamiento de cada destilería y el origen de la vinaza (Wilkie *et al.* 2000). La vinaza se produce en una proporción de 13:1, es decir, por cada litro de alcohol se obtienen 13 litros de vinaza (Ferreira - Montenegro, 1987), esta proporción puede variar entre 10:1 y 15:1. Por lo tanto, las vinazas son desechos residuales difíciles de tratar, no sólo debido a sus características, sino también a su gran volumen y su fluctuación estacional considerable (Buhlert *et al.*, 1981).

Debido a lo anterior, el objetivo de este proyecto es llevar a cabo un estudio para la caracterización y evaluación de las vinazas provenientes de la destilación alcohólica de una bebida espirituosa denominada comiteco, originaria de la meseta comiteca de Chiapas, como una fuente de nutrientes para la producción de biogás a partir de una fermentación anaeróbica utilizando un reactor UASB, y con ello contribuir a la generación de fuentes alternativas de energía en el Estado.

## CAPÍTULO II

---

## II.- ANTECEDENTES

---

### II.1.Biocombustibles

Los biocombustibles son recursos energéticos procesados por el ser humano a partir de materias producidas recientemente por seres vivos, denominadas “biomasa”. Pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, cuya finalidad es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión (Maciel, 2009).

Para hacer frente a los problemas del cambio climático y seguridad energética, se necesitan sustitutos para los combustibles de transportes derivados del petróleo, además del gas y la electricidad. Los biocombustibles se están convirtiendo en una importante clase de sustitutos, hoy dominado por el etanol que se produce a partir del maíz y caña de azúcar, por ello para el futuro muchas alternativas están siendo exploradas.

#### II.1.1.Tipos de biocombustibles

Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima, y a la tecnología empleada para producirlos. Debido a los avances en la tecnología, esta clasificación según la agencia internacional de energía IEA se realiza por generaciones (Maciel, 2009).

**Biocombustibles de primera generación:** son los que en la actualidad ya han alcanzado una etapa de producción comercial. Proceden generalmente de cosechas que son cultivadas con técnicas similares a las cosechas agrícolas alimenticias convencionales.

**Biocombustibles de segunda generación:** aquellas que no compiten por la utilización de suelos agrícolas, ya que son producidos a partir de biomasa lignocelulósica como la contenida en la paja, hierba, tallos, cañas, raíces, madera, cáscaras, etc.

**Biocombustibles de tercera generación:** principalmente los aceites, procedentes de algas y el hidrógeno procedente de la biomasa.

Los biocombustibles pueden encontrarse en forma sólida, líquida y gaseosa. Los primeros biocombustibles en utilizarse fueron los sólidos, un ejemplo de ello es el uso de leñas para producir energía, hoy en día continúa su uso. Dentro de los biocombustibles en forma de gas se encuentra el biogás, que se produce cuando la biomasa es colocada en reactores en condiciones anaeróbicas y es digerida por microorganismos encargadas de degradar la materia orgánica, obteniendo como producto final el biogás. Los biocombustibles líquidos se elaboran a partir de materias primas de plantas, dentro de ellos se encuentran el etanol y biodiesel, estos a su vez pueden ser considerados sustitutos más cercanos de los combustibles fósiles. Para su obtención se utilizan procesos enzimáticos, transformaciones químicas o procesos de fermentación, estos biocombustibles pueden ser usados solos o mezclados con combustibles fósiles (Chauvet-González, 2008).

#### **II.1.1.1. Biogás**

El biogás es otra fuente de energía renovable, producido cuando la biomasa es sometida a una gasificación biológica, es un gas rico en metano obtenido de una digestión anaeróbica de compuestos orgánicos (Ofoefule, 2010). La materia prima para su producción es la biomasa, materia orgánica renovable, que generalmente son desechos en grandes cantidades, generados de industrias de diversos procesamientos (Ezeonu, 2002).

El biogás generalmente está compuesto de 50 a 70% de metano, dióxido de carbono de 30-40%, hidrógeno de 1-10% y nitrógeno de 1-3% (Hashimoto G y Varriell H, 1978). La composición también dependerá del tipo de sustrato utilizado y las condiciones de operación en las que se lleve a cabo, como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla1.** Componentes del biogás en función del sustrato utilizado.

<b>Componente</b>	<b>Residuos agrícolas</b>	<b>Lodos depuradora</b>	<b>Residuos industriales</b>	<b>Gas de vertedero</b>
Metano	50-80%	50-80%	50-70%	45-65%
Dióxido de carbono	30-50%	20-50%	30-50%	34-55%
Agua	Saturado	saturado	saturado	saturado
Hidrógeno	0-2%	0-5%	0-2%	0-1%
Sulfuro de hidrógeno	100-700 ppm	0-1%	0-8%	0.5-100 ppm
Amoníaco	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
Monóxido de carbono	0-1%	0-1%	0-1%	Trazas
Nitrógeno	0-1%	0-3%	0-1%	0-20%
Oxígeno	0-1%	0-1%	0-1%	0-5%
Compuestos orgánicos	Trazas	Trazas	Trazas	5 ppm (terpenos, ésteres etc.)

Fuente: (Coombs, 1990)

### II.1.1.2.Importancia del biogás

En el mundo millones de toneladas de residuos sólidos que se generan cada año proveniente de fuentes como la municipal, industrial y los que son utilizados en la agricultura. Estos residuos orgánicos procedentes de la agricultura, la industria y municipios se descomponen en el ambiente, lo que resulta en gran escala la contaminación de la tierra, el agua y el aire. Estos residuos no sólo representan una amenaza para la calidad del medio ambiente, sino que también poseen un valor de potencial de energía que no se utiliza por completo a pesar del hecho de que son baratos y abundantes en la mayoría de las partes del mundo. El metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) emitido como resultado de la actividad microbiana bajo condiciones incontroladas anaeróbicas, son liberados en la atmósfera y contribuye al calentamiento global (Baldasano y Soriano, 2000; Chynoweth *et al.*, 2001). México llega a la era de la producción de los agrocombustibles en circunstancias en las que no se han hecho evaluaciones críticas por parte del gobierno federal y de los sectores involucrados sobre los costos ambientales, sociales y económicos de su uso (Juárez-Sánchez, 2007).

A pesar de ello México tiene gran potencial en el aprovechamiento de los bioenergéticos para la producción de biogás utilizando residuos orgánicos provenientes de los rellenos sanitarios, residuos ganaderos y aguas residuales, y utilizarse como fuente de energía eléctrica y térmica. El adecuado aprovechamiento de los 186 rellenos sanitarios en todo el país podría generar entre 1,629 y 2,248 toneladas al año de metano, y producir entre 652 y 912 MW de energía eléctrica. México cuenta con un amplio potencial de unidades productivas susceptibles de incorporar sistemas de biodigestión en diferentes niveles (CONAGUA, 2010).

## **II.2. Descripción general del agave**

Los agaves representan un grupo de plantas suculentas originadas en América tropical y subtropical incluyendo los países del caribe (Lock, 1969; Wienk, 1976, Grayum, 2006). Su distribución abarca del sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela; incluyendo todas las islas del Caribe, desde Bahamas hasta Aruba, Curazao, Trinidad y Tobago, y frente a las costas sudamericanas. Las tierras altas de Mesoamérica parecen ser el núcleo original de los agaves cultivados (Kirchhoff, 1943).

### **II.2.1. Etimología**

Proviene del griego Agave, esposa de Kadmos y hermana de Semejen en la mitología griega y madre de Pentheus. Proviene también de la palabra Agavos, del griego ilustre y noble, pero igualmente por la ferocidad de los dientes del margen foliar.

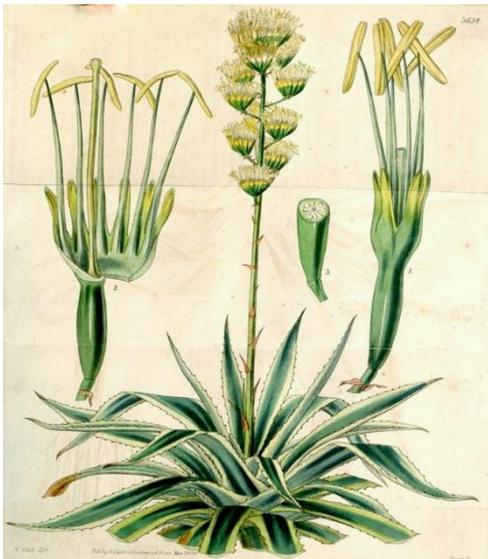
### **II.2.2. Taxonomía**

La delimitación genérica de agavey el número de especies que lo componen ha variado a lo largo del tiempo (García- Mendoza, 2003). Berger en 1915 reconocía 274 especies ubicadas en los subgéneros *manfreda*, *littaea* y *euagave*. Breitung (1968) lo considera formado por aproximadamente 110 especies de los subgéneros *littaea* y *euagave*. Irish

(2000) menciona que puede tener entre 200 y 250 especies. García–Mendoza (2003), indica que *Agave* (subgéneros *Agave* y *Littaea*) posee alrededor de 200 especies y más de 47 categorías infraespecíficas, lo que da un total de 247 taxones. Otros autores indican 197 taxones, que corresponde a 136 especies (Gentry, 1982; Castorena -Sánchez *et al.*, 1991).

### II.2.3. Descripción

Desde el punto de vista morfológico, en general poseen hojas alargadas en espiral sobre un corto y a menudo invisible tallo, formando una roseta. Esta morfología es una adaptación destinada a captar agua por las hojas que es transportada a la zona radical. Las hojas en general son duras, o al menos rígidas y muy fibrosas.. El número de hojas por roseta varía de 20 a 200, dependiendo de la especie. Las hojas son gruesas y suculentas, poseen células especializadas para el almacenamiento de agua. Pueden ser rígidas o laxas (Arizaga, *et al.*, 2000).Las hojas en general son glabras y cuentan con fibras alargadas en toda su longitud, siendo este carácter importante en especies como *A. sisalana* Perr. y *A. fourcroydes* Lem. son utilizadas para la producción de fibras (Irish y Irish, 2000).



**Figura 1.** Inflorescencia de una planta de *Agave americana*

#### **II.2.4. Producción de agave en México**

En México las grandes casas productoras de tequila tienen sus necesidades de agave cubiertas con producción propia o contratos de aparcería celebrados con anticipación. El importe comprometido de la cosecha es de apenas el 40%. Existe un excedente de agave significativo de productores no vinculados a empresas tequileras (60% de los productores) que no encuentran mercado. En 2008, el Consejo Regulador del Tequila (CTR 2008) reportó 146 destilerías de tequila entre grandes, medianas, pequeñas y micros.

La industria tequilera es de gran importancia en la economía de México y principalmente en Jalisco, donde se localiza la mayoría de las empresas certificadas para la fabricación de este tipo de bebidas, sin embargo la creciente producción de tequila trae consigo el aumento de subproductos como el bagazo y las vinazas (Cedeño, 1995).

En México existen varias especies de agave importadas para la producción del pulque: *Agave americana*, desde Nuevo León y Durango hasta Oaxaca y Veracruz; *A. atrovirens*, en la sierra madre oriental; *A. ferox*, en Puebla y en el norte de Oaxaca; *A. mapisaga*, en Michoacán, Morelos, Aguascalientes y San Luis Potosí (Lobalto, 1984). En la actualidad el cultivo de la especie *A. mapisaga* es el más importante para la producción del pulque (Herrera, *et al.*, 1994).

La principal zona de cultivo de agave se localiza, en términos generales, por el sur desde el extremo meridional del Distrito Federal y en los puntos que se sitúan a la misma altura en los estados de México y Puebla hasta las llanuras de San Luis Potosí y Saltillo en la Mesa del Norte, y desde Tehuacán, Perote y Teziutlán por el Oriente hasta Zitácuaro y Morelia por el occidente. La zona de mayor importancia del cultivo se encuentra en los estados de Hidalgo, Tlaxcala y México, parte de Puebla, Querétaro, Michoacán y el Distrito Federal. Su cultivo es más intenso en la zona limítrofe de los estados de Hidalgo, México y Tlaxcala (Loyola 1956).

#### **II.2.5. Uso del agave**

El agave tiene múltiples usos tales como Jarabe, sustituto de la miel, aguamiel y pulque bebida muy nutritiva que, a diferencia del mezcal, tiene un porcentaje de

alcohol muy bajo. , con las fibras de las hojas, se fabrican hilaturas para tejidos, hamacas y empaques, así como obtención de papel del bagazo residual, tejas en techumbres hechas de las pencas (hojas), vigas del tallo, punzones y agujas con las espigas de las pencas, y vallas o cercas con las plantas en hilera para guardar las propiedades (García-Mendoza.2012)

### **II.3. Descripción general de la vinaza**

La vinaza es un residuo que se genera durante el proceso de destilación del alcohol. Está compuesta en su mayor parte de materia orgánica, potasio y en menor cantidad, de otros elementos (Subirós, 1995).Según Robles-González en el 2011, las vinazas contienen una variedad de sustancias orgánicas tales como ácido acético, láctico, glicerol, fenoles, polifenoles, melanoidinas, así como especies inorgánicas, tales como sulfatos y sales de fosfato(Robles-González, *et al.*, 2011). Constituyen un líquido de color oscuro, que puede variar desde pardo hasta casi negro, de olor fuerte, pH medianamente ácido y una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) que oscila entre 70 y 80 g/L. Están compuestas por un 93% de agua, 2% de compuestos inorgánicos (potasio, calcio, sulfatos, cloruros, nitrógeno, fósforo, etc.) y un 5% de compuestos orgánicos que volatilizan al ser calentados a 650°C (Luna- Bedolla *et al.*, 1990).

#### **II.3.1.Usos de las vinazas**

El tratamiento de las vinazas genera valor añadido a los productos obtenidos y reduce los costos de control sobre la contaminación, tales como la bioenergía y las enzimas, se encuentran en distintas etapas de desarrollo. La digestión anaeróbica de las vinazas es atractiva y ya es una tecnología comercial con los costos reportados de 5000-25,000 dls\m<sup>3</sup> de digestor o 0.52 dls\m<sup>3</sup> de vinaza tratada (Moletta, 2005; Lucas *et al.*, 2010).El compostaje de la vinaza con los desechos sólidos agrícolas y agroindustriales, aunque es atractivo y viable, no es una práctica común. Sin embargo, vale la pena investigar y aplicar, ya que puede proporcionar una tecnología de tratamiento de bajo costo adecuado para las regiones rurales en los países subdesarrollados donde las tecnologías más sofisticadas son difíciles de adoptar, debido a los altos costos y requerimientos de personal calificado. Por otra parte, el

producto final de compostaje, sería muy valioso para mejorar la calidad de los suelos, el aumento de rendimiento de los cultivos, y en general para lograr la sostenibilidad de las prácticas agrícolas en las regiones antes mencionadas (Díaz *et al.*, 2002). El compostaje es comúnmente utilizado para reciclar materiales orgánicos y mantener la fertilidad de los suelos (Maynard 1994, Golueke y Díaz 1996, Abdelhaimid, *et al.*, 2004).

Las vinazas pueden ser filtradas para dar dos corrientes principales: vinazas y sólidos ricos en levaduras y la biomasa microbiana. Esta última puede ser procesada para generar una fuente de proteína alternativa para animales y otros usos. La vinazas filtradas podrían ser sometidas a una variedad de procesos biotecnológicos a fin de dar diversos bioproductos (Díaz *et al.*, 2011; Nuissier *et al.*, 2008), tales como enzimas (Acharya *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2010; Kahraman y Yesilada, 2001; Pantalón y Adholeya, 2007; Singh *et al.*, 2010; Fuerte y Burgess, 2007), proteínas (levadura, algas, bacterias y hongos) (Barrocal *et al.*, 2010; Durán-Bazúa *et al.*, 1991; Morimura *et al.*, 1994; Nitayavardhana y Khanal, 2010; Tauk, 1982) y acondicionadores del suelo por el compostaje de las vinazas con residuos agroindustriales y otros (Díaz *et al.*, 2002; Madejón *et al.*, 2001).

Los efluentes procedentes de estos procesos de fermentación, podrían ser alimentados a la rama de la bioenergía (biogás, etanol, butanol y biodiesel). En paralelo, las vinazas filtradas podrían ser utilizadas para la producción de metano y biohidrógeno (Borja *et al.*, 1993; Durán-Bazúa *et al.*, 1991; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2011; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 1996; Hamoda y Kennedy, 1986; Jiménez *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 2010; Lo y Liao, 1986; Moletta, 2005; Muñoz-Páez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 1997; Shivayogimath y Ramanujam, 1999; Valdez-Vázquez *et al.*, 2006), así como la generación de bioelectricidad a través de células de combustible microbianas (Mohanakrishna *et al.*, 2010; Poggi-Varaldo *et al.*, 2009; Vázquez-Larios *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009).

### II.3.2. Caracterización fisicoquímica de la vinaza

La composición química de la vinaza es variada; está influenciada por la naturaleza y la composición de la materia prima del sistema usado en la preparación del mosto, del método de fermentación, del tipo de levadura, entre otros. En promedio, las cantidades de vinaza producidas a partir de la miel aportan cerca del doble de potasio si se compara con el obtenido a partir del jugo de caña. Por cada litro de alcohol que se produce, se obtienen entre 12 y 15 litros de vinaza, lo que representa un volumen importante (Subirós - Molina, 1992). En la tabla 2 se muestran las características físico-químicas de dos tipos de vinazas mezcaleras del estado de Oaxaca.

**Tabla2.** Características físico químicas de vinazas mezcaleras en diferentes industrias del estado de Oaxaca, México

PARÁMETROS	IM1	TIM
pH	3.7	3.8
Alcalinidad (mg de CaCO <sub>3</sub> /L)	ND	ND
Conductividad (mS/cm)	2.6 ± 0.02	4.2 ± 0.05
Color (475nm)	4.6 ± 0.3	10.6 ± 0.5
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	56,230 ± 162	122,860 ± 2270
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	26,500 ± 710	33,600 ± 2260
Fenoles (mg ácido gálico/L)	478 ± 24	542 ± 48
Fructosa (mg/L)	14.8 ± 2.3	50.0 ± 6.4
Nitrógeno Kjeldahl (mgNH <sub>3</sub> -N/L)	660 ± 37	5,650 ± 503
Sólidos Totales (mg/L)	26,830 ± 1120	94,713 ± 4055
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	3130 ± 168	8400 ± 504
Sólidos Suspendidos volátiles (mg/L)	1130 ± 88	6850 ± 411
Fosfato (mg/L)	290 ± 5	1150 ± 93
Sulfatos (mg/L)	308 ± 14	842 ± 14

IM = INDUSTRIA DEL MEZCAL; TIM = INDUSTRIA TRADICIONAL DEL MEZCAL

Fuente: (Robles-González, 2011; Durán-Bazúa *et al.*, 1991; Jiménez *et al.*, 2006; García *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1996; Benitez *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2002; Sangave *et al.*, 2007; Madejón *et al.*, 2001; Beltrán *et al.*, 1999)

Las vinazas contienen generalmente altas concentraciones de sólidos disueltos, hasta el 50% de este parámetro pueden ser azúcares reductores (Sangave *et al.*, 2007). Los compuestos no volátiles procedentes de la fermentación del caldo, compuestos fenólicos y polifenólicos (Sales *et al.*, 1987; Capasso *et al.*, 1992; Robles-González *et al.*, 2010), las concentraciones relativamente altas de sales minerales que se reflejan en una alta conductividad electrolítica ( $250-300\text{dSm}^{-1}$ ), y ceniza. Su pH oscila por lo general entre 3.5 y 5, y tiene un color oscuro (marrón, debido a la presencia de melanoidinas) (García *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2003; Coca *et al.*, 2005). La carga de contaminantes orgánicos es muy elevada, con valores de DBO de 35,000-50,000 mg O<sub>2</sub>/L, y la DQO de 70,000-150,000 mg/L. Los índices de biodegradabilidad en el rango de 0.2-0.5 mg DBO / mg DQO son muy comunes (Robles-González *et al.*, 2010; Nandy *et al.*, 2002; Sangave *et al.*, 2007; Madejón *et al.*, 2001). Debido a este perfil que presentan, las vinazas son efluentes muy agresivos y recalcitrantes, cuya descarga directa a cuerpos de agua y el suelo puede causar un impacto ambiental grave.

#### **II.4.Digestión anaeróbica y aerobia**

Los procesos de tratamientos biológicos de los materiales orgánicos se pueden clasificar en dos grupos principales; aeróbicos y anaeróbicos. La fermentación anaeróbica puede ser definida como un proceso biológico en ausencia de oxígeno, para la descomposición de materia orgánica mediante la conversión a metano, dióxido de carbono y otros gases tales como hidrógeno, monóxido de carbono, nitrógeno, oxígeno, ácido sulfúrico y un residuo casi estable (Rajeshwari, 1999).

##### **II.4.1.Digestión anaerobia**

Para asegurar el correcto diseño y aplicación de sistemas de tratamiento anaeróbicos es esencial conocer y entender el proceso y los aspectos tecnológicos, la bioquímica y la microbiología de la digestión anaerobia (Lema y Omil, 2001). La digestión anaerobia implica la degradación y estabilización de materiales orgánicos bajo condiciones

anaeróbicas por organismos microbianos y conduce a la formación de biogás (una mezcla de dióxido de carbono y metano, una renovable fuente de energía) y la biomasa microbiana (Kelleher *et al.*, 2000).

**Tabla 3.** Comparación de los residuos biológicos aerobios y anaerobios en el tratamiento de aguas residuales.

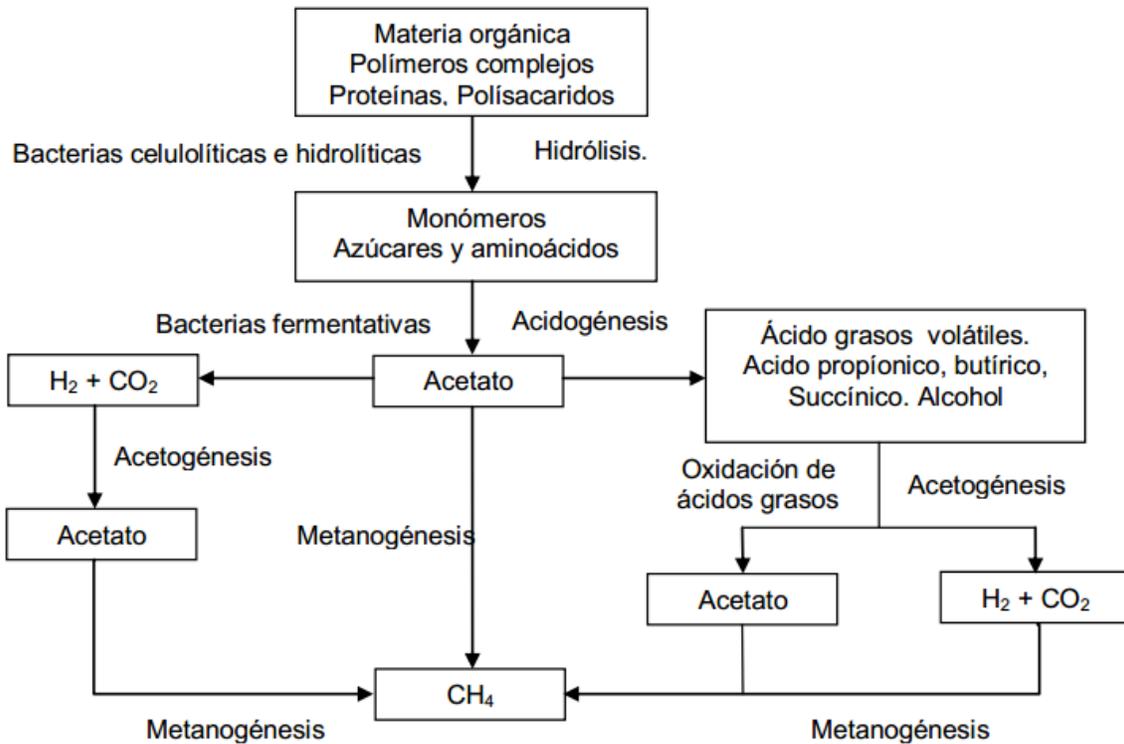
	<b>Digestión aeróbica</b>	<b>Digestión anaerobia</b>
Tiempo de arranque	Periodo corto	Periodo largo
Proceso	Eliminación de nitrógeno integrado y de fósforo. Producción en exceso de altas cantidades de lodos. Necesita volúmenes grandes del reactor. Necesidades altas de nutrientes.	No requiere la eliminación significativa de nitrógeno o de fósforo. La producción de lodos es muy pequeña (5-20%). Se utilizan volúmenes pequeños del reactor. Bajos requerimientos de nutrientes.
Balance de carbono	50-60% incorporado en CO <sub>2</sub> ; 40-50% incorporado en la biomasa.	El 95% es convertido en biogás, un 5% incorporado en biomasa microbiana.
Balance de energía	El 60% de la energía disponible se utiliza en la nueva biomasa formada, el 40% son pérdidas en forma de calor del proceso	El 90% se mantiene como CH <sub>4</sub> , el 5% se pierde en forma de calor, y de 5 -7% se utiliza para la formación de nueva biomasa.
Residuos	Hay exceso de producción de lodos. No hay necesidad de post-tratamiento	Biogás, nitrógeno mineralizado en amoníaco. Requiere un post-tratamiento para eliminación de la materia orgánica y los compuestos malolientes.
Costos	Bajos costos de inversión. Costos operativos altos para aireación, nutrientes adicionales y la eliminación de lodo, y el mantenimiento.	Costos de inversión moderados Bajos costos operativos debido a la baja potencia en el consumo de nutrientes adicionales
Estado de desarrollo	Tecnología establecida	Aún en fase de desarrollo para aplicaciones específicas

Fuente: Adaptaciones de Lepisto y Rintala, 1997; Banerjee *et al.*, 1999; Zoutberg y Eker, 1999; Gijzen, 2001; Lettinga *et al.*, 1984; Lettinga, 2001).

## **II.5. Aspectos bioquímicos y microbiológicos**

La digestión anaerobia es el proceso biológico mediante el cual la materia orgánica, susceptible de ser biodegradada, es transformada por la actividad metabólica bacteriana en ausencia de oxígeno libre, obteniéndose como productos finales: metano y dióxido de carbono, principalmente, y algunos otros gases en menor cantidad; como resultado de la actividad metabólica se obtiene también un incremento de las células microbianas. (Mejía, 1996).

Este proceso ha sido estudiado desde los puntos de vista bioquímico y microbiológico y se sabe que en él participan una amplia variedad de bacterias de tipo tanto facultativas como anaerobias estrictas. En el desarrollo del proceso se han establecido dos etapas sucesivas, conocidas como la fase no metanogénica y metanogénica; en la fase no metanogénica se inicia la transformación de las moléculas que conforman la materia orgánica, obteniéndose así compuestos más simples; en esta fase del proceso se consideran dos etapas, una de hidrólisis seguida por la acidogénesis. Los productos de estas primeras actividades bacterianas sirven de sustrato para los microorganismos que se desarrollan en la siguiente fase (metanogénica) la que se caracteriza por ser en la que se produce el metano (Mejía 1996).



**Figura 2.** Etapas de la digestión anaerobia(adaptado de Bouallagui *et al.*, 2005)

### II.5.1.Hidrólisis

La hidrólisis es el primer paso y, a menudo la etapa limitante de la velocidad (Vavilin *et al.*, 2008). En esta etapa, los compuestos poliméricos son convertidos por las enzimas extracelulares a moléculas más pequeñas solubles del sustrato. Los componentes poliméricos en el sustrato que necesitan ser hidrolizados se pueden encontrar en diferentes estados físicos, en partículas, disueltos o emulsionados. Las partículas son las más comúnmente encontradas. Saunders, *et al.*, (2000) mostraron que la tasa de hidrólisis de los sustratos de partículas está limitado por la cantidad de superficie disponible para las enzimas hidrolíticas. Reacciones hidrolíticas generalmente limitan la cantidad de metano producido durante la digestión anaerobia de la biomasa (Chynoweth, *et al.*, 1987).

Como resultado de la hidrólisis se producen compuestos solubles (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga) que son fermentados por las bacterias *acidogénicas* dando lugar, principalmente, a ácidos de cadena corta, alcoholes hidrógeno,

dióxido de carbono y otros productos intermedios. Los ácidos de cadena corta son transformados en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, mediante la acción de microorganismos *acetogénicos*. Por último los microorganismos *metanogénicos* producen metano a partir del acetato, hidrógeno y dióxido de carbono (Martí, 2006).

## II.5.2. Acidogénesis

Durante esta etapa se lleva a cabo la fermentación de las moléculas orgánicas solubles obtenidas de la etapa de la hidrólisis, en compuestos que pueden ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas (ácido acético, ácido fórmico e hidrógeno), y compuestos orgánicos más reducidos y los cuales son oxidados en la siguiente etapa del proceso (Martí, 2006).

La acidogénesis (bacterias fermentadoras) convierte la materia orgánica soluble principalmente a acetato, propionato, butirato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Algunas reacciones fermentativas proceden sólo a bajas concentraciones de H<sub>2</sub> y dependen de la eliminación de H<sub>2</sub> por bacterias oxidantes (metanogénesis). El resultado de las concentraciones bajas de H<sub>2</sub> acompaña la formación de acetato como el principal producto soluble. Cuando la remoción de H<sub>2</sub> por metanogénesis es menos eficiente, el H<sub>2</sub> bloquea la eliminación de electrones por reducción de protones, y las bacterias fermentadoras deben canalizar los electrones a otros sitios disponibles (Chynoweth, *et al.*, 1987).

La principal ruta metabólica para la degradación de la glucosa para formar ácidos orgánicos es la de Embden-Meyerhof, que tiene como principal intermediario el piruvato. La fermentación de azúcares se realiza por diversos tipos de microorganismos. En función de cada organismo, la ruta metabólica y los productos finales son diferentes, los principales microorganismos asociados a la degradación de la glucosa son el género *Clostridium* y convierten la glucosa en butírico, acético, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, la glucosa se convierte en piruvato mediante la ruta de Embden-Meyerhof, y el piruvato se desdobla a Acetil- CoA y CO<sub>2</sub>. El acetil CoA se reduce en los productos de fermentación empleando como transportador de electrones el NADH reducido, derivado de las reacciones glucolíticas de la ruta de Embden-Meyerhof (Martí, 2006).

### II.5.3. Acetogénesis

La acetogénesis se lleva a cabo por los organismos acetogénicos que son el vínculo vital entre la hidrólisis/acidogénesis y la producción de metano en la digestión anaerobia. Esta etapa proporciona los dos principales sustratos para el último paso en la conversión metanogénica del material orgánico, el hidrógeno y el acetato. Tanto la acidogénesis y acetogénesis producen los sustratos para la etapa metanogénica, el acetato y  $H_2$ - $CO_2$ . La distinción importante entre los microorganismos es que las bacterias fermentadoras tienen la posibilidad de utilizar varios aceptores de electrones para la eliminación de estos. La acetogénesis es un obligado protón-reductor y pueden utilizar protones sólo como aceptores de electrones y sólo cuando la concentración de  $H_2$  es baja. A concentraciones muy bajas de  $H_2$ , sin embargo, la metanogénesis de  $H_2$  y  $CO_2$  se vuelve desfavorable (Chynoweth, *et al.*, 1987). Las oxidaciones catalizadas por reductores de protones obligados, producen sólo pequeñas cantidades de energía, siempre que la concentración del hidrógeno producido se mantenga baja (Zehnder, 1988).

Algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos ( $H_2$  y acético), otros como el etanol, ácidos grasos volátiles valeriano, butirato, propionato, etc. y algunos compuestos aromáticos, deben ser transformados a productos más sencillos, acetato e  $H_2$ , a través de las bacterias acetogénicas, como *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolini*.

Un tipo especial de microorganismos acetogénicos, son los llamados homoacetogénicos. Este tipo de bacterias son capaces de crecer heterotróficamente en presencia de azúcares o compuestos monocarbonados (como la mezcla  $H_2/CO_2$ ) produciendo únicamente acetato. Al contrario que las bacterias acetogénicas, éstas no producen hidrógeno como resultado de su metabolismo, sino que lo consumen como sustrato, por ello el resultado neto del metabolismo homoacetogénico permite mantener bajas presiones parciales del hidrógeno y, por tanto, permite la actividad de las bacterias acidogénicas y acetogénicas, los principales microorganismos acetogénicos que han sido aislados son *Acetobacterium woodii* o *Clostridium aceticum* (Martí, 2006).

**Tabla 4.** Reacciones acetogénicas y metanogénicas: energías libres a pH 7, 1 atm más todos los reactivos y los productos a una concentración de 1 M

Reacciones Acetogénicas		Energía libre por reacción ( $\Delta G'^{\circ}$ kJ)	
Propionato		Acetato	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$	+76.1
Butirato		Acetato	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$	+48.1
Etanol		Acetato	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$	+9.6
Lactato		Acetato	
$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-4.2
<b>Reacciones metanogénicas</b>			
Acetato		Metano	
$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-31.0
Dióxido de carbono + hidrógeno		Metano	
$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$	$\longrightarrow$	$\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-135.6
<b>Reacción sintrófica</b>			
$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$4\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2$	+96.2
$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$	$\longrightarrow$	$\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-135.6
			<b>Reacción neta</b>
			-39.4

Fuente: Adaptado de Fox y Pohland, 1994; García *et al.*, 2000; Sekiguchi *et al.*, 2001

#### II.5.4. Metanogénesis.

La metanogénesis es la última etapa del proceso de la digestión. Los dos principales productos intermedios que utiliza esta etapa son el acetato y  $\text{CO}_2\text{-H}_2$ . Aproximadamente el 70% del metano proviene de la fermentación del acetato y el resto de la reducción, de emisiones de  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ . En esta etapa, los microorganismos son bacterias estrictamente anaerobias. Sin embargo, existen marcadas diferencias en la sensibilidad de oxígeno entre la producción de metano. El potencial de oxidación-reducción que se requiera para la producción de metano puede ser tan bajo como -300 mV o incluso inferior (Grande, 1983).

En presencia de aceptores de electrones tales como óxidos de metal [ $\text{Fe}(\text{OH})$ ,  $\text{MnO}_2$ ], óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ), o compuestos de azufre oxidado ( $\text{SO}_4$ ,  $\text{SO}_3$ ), la

metanogénesis puede ser inhibida y/o alterada (Zehnder, *et al.*, 1982). Las bacterias metanogénicas son más sensibles a los cambios de temperatura que otros organismos presentes en el digester. Esto es debido a la tasa de crecimiento más rápido de los otros grupos, tales como acetógenos, que pueden alcanzar catabolismo sustancial, incluso a baja temperatura. El amoníaco actúa como un potente inhibidor de la formación de metano a partir de  $H_2$  y  $CO_2$ . Sólo tiene un efecto menor en la formación de metano a partir de acetato. La inhibición de consumo de hidrógeno conduce a una inhibición de la degradación del propionato, que actúa como un inhibidor de los metanógenos que consumen acetato (Wiegant y Zeeman, 1986). Entre los cuatro tipos de microorganismos anaerobios, los metanógenos son los menos tolerantes y los más propensos a cesar el crecimiento debido a la inhibición de amoníaco (Kayhanian, 1994).

Se pueden definir dos microorganismos en función del sustrato principal que metabolizan: hidrogenotróficos, que consumen  $CO_2 / H_2O$  y ácido fórmico y acetoclásticos, que consumen etanol, metanol y algunas aminas. Se ha demostrado que un 70% del metano producido en los reactores anaerobios se forman a partir de acetato a pesar de que, todos los microorganismos metanogénicos son capaces de utilizar el  $H_2$  como aceptor de electrones, sólo dos géneros pueden utilizar el acetato. Los dos géneros que tienen especies acetotróficas son *Methanosarcina* y *Methanothrix* (Martí 2006).

## **II.6. Factores ambientales que afectan el proceso de digestión anaerobia**

La utilización de la digestión anaerobia, en la depuración de la materia orgánica contenida en las aguas residuales, es una operación que debe ser controlada para lograr óptimos resultados, ya que el proceso bioquímico, que en ella tiene lugar, está influenciado por diversos factores como son el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulica (TRH), los ácidos grasos volátiles (AGV), nutrientes, entre otros.

### **II.6.1. pH**

El pH es uno de los principales factores que indican la inhibición en los reactores anaeróbicos. El pH óptimo para la digestión anaerobia es normalmente en el intervalo de 7 -

8 (Chynoweth, *et al.*, 1987). Los bajos niveles de pH, por ejemplo, puede ser una señal de desequilibrio en el digestor. Con el aumento de la concentración de los ácidos volátiles, el pH en el digestor disminuye. A niveles de pH por debajo de 6, las condiciones ácidas producidas pueden ser tóxicas para las bacterias metanogénicas. Sin embargo, un pH alto también puede convertirse en un problema, si se generan altos niveles de amonio se genera la inhibición del crecimiento de las bacterias (Braun, 1982). El control de pH dentro del óptimo crecimiento de los microorganismos puede reducir la toxicidad del amoníaco (Bhattacharya y Parkin, 1989).

### **II.6.2. Temperatura**

La temperatura es una condición determinante para la actividad de cualquier microorganismo, y las bacterias que se desarrollan bajo condiciones anaerobias no son la excepción. Existen diferentes intervalos de temperatura en la que las bacterias anaerobias llevan a cabo sus funciones metabólicas. Se han clasificado en tres los valores óptimos en tales funciones: termofílico (50-65°C); mesofílico (20-45°C) y psicofílico (>20°C). En todos los sistemas se observa que al incrementar la temperatura, se incrementa también la actividad microbiana y esa condición también influye sobre el desarrollo de las células bacterianas. Los digestores convencionales son comúnmente diseñado para operar tanto en el rango mesofílico o termofílico (Donoso-Bravo *et al.*, 2009).

### **II.6.3. Ácidos grasos volátiles**

La concentración de ácidos grasos volátiles, productos intermedios mayoritarios del proceso anaerobio, es uno de los parámetros que más eficazmente puede indicar la evolución del proceso. De hecho este parámetro es uno de los más utilizados en los sistemas de control debido a su rápida respuesta ante variaciones del sistema. Un ejemplo de ello es la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) que tiene lugar en el sistema

cuando la velocidad de degradación de éstos, por parte de los microorganismos responsables, disminuye por alguna causa adversa. Por tanto, un aumento en la concentración de ácidos volátiles en el sistema, siempre significa una desestabilización del proceso y, en consecuencia, una disminución de la producción de biogás. (Björnsson *et al.*, 1997).

La disminución en la acumulación de pH que acompaña AGVs es la causa principal de la toxicidad y el fracaso del reactor en el proceso de digestión anaerobia (Ahring *et al.*, 1995). Los AGVs son tóxicos a valores de pH bajos, ya que estos pueden penetrar la membrana celular. Cuando están dentro de la célula, donde el pH es alrededor de 7, son ionizados y el ion hidrógeno liberado causa una disminución en el pH intracelular (Björnsson, 2000). El gradiente de pH a través de la membrana es esencial para la formación de ATP y por lo tanto el crecimiento bacteriano

#### **II.6.4. Nutrientes**

Todos los organismos necesitan ingredientes esenciales para su crecimiento macronutrientes y oligoelementos, y la falta de estos nutrientes afectaría negativamente su crecimiento (Lettinga, 1995). Nutrientes tales como nitrógeno y fósforo, y los elementos traza (azufre, potasio, calcio, magnesio, hierro, níquel, cobalto, zinc, manganeso y cobre) son necesarias para la degradación anaeróbica eficiente y estas son por lo general presente en cantidades suficientes en la mayoría de los residuos que se tratan en los digestores anaeróbicos (Rajeshwari *et al.*, 2000).

Los nutrientes más importantes para rendimientos altos en la obtención de metano son el nitrógeno y el fósforo, y la óptima C: N:P en una relación 100:3:1 (Rajeshwari *et al.*, 2000.). Si la relación C / N es alta, existe el riesgo de deficiencia de nutrientes y una capacidad de amortiguación baja dará como resultado un proceso más sensible (Nyns, 1986). Si el contenido de nitrógeno es alto, el problema de la inhibición de amoníaco pueden surgir debido a la degradación de los compuestos nitrogenados liberando amonio.

Se han reportado en varios estudios los efectos inhibidores y tóxicos de metales pesados en la etapa de digestión anaerobia acidogénica (Demirel y Yenigun, 2002). Según Lin (1993) el cobre y zinc son los más tóxicos, mientras que el plomo es menos tóxico en esta etapa. Yenigun *et al.* (1996) reportaron efectos inhibitorios de cobre y zinc en los digestores discontinuos en el intervalo de 1-10 mg/dm<sup>3</sup> para el cobre y 5-40 mg/dm<sup>3</sup> para el zinc, lo cual muestran que el cobre es más tóxico que el zinc. Los metales pesados también se han reportado como inhibidores en la degradación de los AGVs a metano en la digestión anaerobia (Lin, 1992).

#### **II.6.5. Velocidad de carga orgánica y tiempo de retención**

En el tiempo de retención, junto con la velocidad de carga orgánica determinada por el tipo de sustrato, son los principales parámetros de diseño, definiendo el volumen del digestor. En los sistemas de mezcla completa, el tiempo de retención hidráulica (TRH) coincide con el celular, por lo que el tiempo de retención deberá ser suficiente largo como para asegurar el crecimiento de la población microbiana, al aumentar el TRH, aumenta el grado de materia degradada así como la producción de metano, aunque este último valor empieza a disminuir una vez alcanzado el óptimo. El tiempo de retención usual en el rango mesofílico para lodos de depuradora está entre 15 y 20 días, aunque esto dependerá del tipo de digestor a utilizar (Martí, 2006). Este tiempo de retención se calcula dividiendo la capacidad total del tanque de la digestión por la velocidad a la que se alimenta de materia orgánica en él. Si el tiempo de retención es demasiado corto, las bacterias en el digestor se lavan más rápido de lo que pueden reproducirse, por lo que la fermentación prácticamente se paraliza. Cuanto más tiempo un sustrato se mantiene bajo condiciones de reacción adecuadas, se lleva a cabo una degradación más completa. Pero la velocidad de reacción disminuye con el tiempo de residencia en aumento. La desventaja de un tiempo de conservación más largo es el aumento de tamaño del reactor necesario para una cantidad dada de sustrato a tratar (Zhang *et al.*, 2006).

### **II.6.6. Tóxicos e inhibidores**

El proceso de digestión anaeróbica puede ser inhibido por la presencia de tóxicos en el sistema. Estas sustancias pueden ser subproductos de la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios o pueden formar parte del influente. Se ha comprobado que la magnitud del efecto tóxico de una sustancia puede ser reducida significativamente por aclimatación de la población de microorganismos al tóxico, por otra parte, muchas de estas sustancias a bajas concentraciones pueden ser estimuladoras del proceso (Ortega, 2006).

### **II.6.7. Tipo de sustrato**

La composición del sustrato es un factor importante que afecta el proceso anaeróbico, el rendimiento de metano y las tasas de producción. Las poblaciones microbianas que intervienen en la digestión anaerobia requieren nutrientes para crecer y multiplicarse. Los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos son el carbono el nitrógeno y el fósforo y una serie de elementos minerales como: S, K, Na, Ca, Mg y Fe que deben estar presentes a nivel traza. Diversos autores han estudiado la relación necesaria entre los nutrientes mayoritarios considerando una relación C:N entre 15-30:1 y C:P entre 75-113:1 (Speece,1987).

Según Weiland (2001), una relación muy importante en la composición del sustrato con respecto a los nutrientes es la de C:N:P:S ya que estos son nutrientes esenciales para que los microorganismos puedan crecer y multiplicarse, debido a esto los nutrientes suficientes se deben encontrar a una tasa de relación de 600:15:5:3, ya que las necesidades de nutrientes son muy bajas debido a la baja formación de la biomasa. Al mismo tiempo, el balance de carbono y nitrógeno en materia de alimentación es importante. A menudo se sugiere que una óptima relación entre C:N sea entre 20:1 y 30:1. Si está presente poco nitrógeno, las bacterias no serán capaces de producir las enzimas que son necesarias para utilizar el carbono. Si hay demasiado nitrógeno, entonces se puede inhibir el crecimiento de las bacterias a través de concentraciones tóxicas de  $\text{NH}_3$  (Braun, 1982).

### **II.6.8. Mezclado**

La experiencia ha demostrado que una adecuada mezcla del contenido del digestor es esencial y persigue objetivos, descritos por Noone, 1990: Poner en contacto el sustrato fresco con la población bacteriana y eliminar los metabolitos producidos por los microorganismos metanogénicos al favorecer la salida de los gases. Prevenir la formación de espacios muertos que reducirán el volumen efectivo del reactor y la formación de caminos preferenciales. Prevenir la formación de espumas y sedimentación en el reactor. Eliminar la estratificación térmica, manteniendo una temperatura uniforme en todo el reactor. El sistema de agitación puede ser: mecánico, hidráulico y neumático, la velocidad debe ser suficientemente fuerte para asegurar una correcta homogenización pero sin romper los agregados bacterianos.

## CAPÍTULO III

---

### III.- JUSTIFICACIÓN

---

El agotamiento inminente de las reservas petroleras y la contaminación ambiental generada por los combustibles fósiles ha impulsado la búsqueda de fuentes alternas de energía limpia, la cual ha despertado el interés en la producción mundial de biocombustibles (biogás, biodiesel, bioetanol y biohidrógeno) el cual se ha duplicado en los últimos años. Razón por la que en muchas partes del mundo se han venido estableciendo monocultivos a gran escala de diversas plantas para obtener fuentes alternativas de biocombustibles.

En México se está promoviendo el interés para la generación de estos, debido a la necesidad de fuentes alternativas de energía más limpias, para reducir los efectos contaminantes generados por los combustibles fósiles e incursionar en el área de la sustentabilidad. Por tal razón, se creó la nueva ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos en el país, para apoyar la generación de nuevas fuentes alternativas de energía.

En el estado de Chiapas y en particular en la región de la meseta comiteca, se encuentran grandes cultivos de agave los cuales son utilizados para obtener una bebida alcohólica típica de la región, actualmente la elaboración de esta bebida produce de 12-15 L de vinaza/L alcohol, los cuales son arrojados a los cuerpos de agua superficiales sin un tratamiento previo, generando un problema ambiental muy grave puesto que estos efluentes no cumplen con la NOM-001-ECOL-1996.

Debido a la naturaleza de su origen estos efluentes contienen grandes cantidades de biomasa, materia orgánica (disuelta, en suspensión y coloidal) e inorgánica ( $N_2$ ,  $SO_4$ , P entre otros), las cuales tienen un potencial energético muy alto para ser aprovechadas. Por ello este trabajo de investigación tiene por objetivo evaluar a las vinazas residuales del proceso de destilación del comiteco, para ser usado como sustrato eficiente en un reactor de flujo de digestión anaeróbica para la producción de biogás.

## CAPÍTULO IV

---

## IV.-OBJETIVOS

---

### **Objetivo general**

Evaluar el contenido de nutrientes presentes en las vinazas provenientes de la industria de la destilación alcohólica del comiteco para su empleo, en la generación de biogás.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar mediante pruebas fisicoquímicas a las vinazas.
- Cuantificar el contenido de nutrientes presentes en las vinazas.
- Evaluar y seleccionar un inóculo a partir de dos tipos de consorcios microbianos para la mejor remoción de DQO en vinazas.

# CAPÍTULO V

---

## V.-MATERIALES Y MÉTODOS

---

### V.I Obtención de materia prima

El proyecto de investigación se llevó a cabo en los laboratorios del polo tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla, ubicado en la Ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

La materia prima a utilizar fueron vinazas obtenidas de la destilación de la industria de agave comiteco, la cual es un desecho obtenido en la producción de una bebida alcohólica llamada comiteco, originario de la ciudad de Comitán de Domínguez. Esta materia prima se obtuvo de un solo lote, la cual proviene del proceso de estandarización de producción de esta bebida alcohólica, cuyo proceso se llevó a cabo en los laboratorios de investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4°C como lo indica la norma NMX-AA-003.

El primer complejo microbiano proveniente del estiércol de ganado vacuno fue obtenido del ganado estabulado del rancho del Tzu-Tzu municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas.

El segundo complejo microbiano se obtuvo de los lodos anaerobios de la planta de tratamientos de aguas residuales de la empresa Coca Cola® FEMSA, ubicada en el estado de Tlaxcala.

## **V.2. Caracterización de materia prima**

A las vinazas se les realizaron las siguientes determinaciones: Demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) (método de reflujo cerrado/método espectrofotométrico NMX-AA-030), (NMX-AA-028-SCFI-2001), Nitrógeno total (método de Kjeldahl NMX-AA-026-SCFI-2001), sólidos suspendidos totales (NMX-AA-034-SCFI-2001), Alcalinidad y Acidez (NMX-AA-036-SCFI-2001), sulfatos totales (Método gravimétrico NMX-AA-074-1981), pH (NMX-AA-008-SCFI-200), determinación de grasas (NMX-AA-051-SCFI-2000), iones metálicos (NMX-AA-051-SCFI-1981). También se llevaron a cabo análisis proximales para la determinación de humedad, cenizas, nitrógeno total y grasas, todos los análisis se llevaron a cabo con tres repeticiones.

## **V.3. Análisis Proximales**

### **V.3.1. Humedad**

Se pusieron a peso constante 3 cápsulas de porcelana, posteriormente en una balanza analítica se pesaron 35 g de vinaza, la cual se depositó en la cápsula de porcelana previamente a peso constante, las muestras fueron colocadas en una estufa de vacío a 70 °C, hasta peso constante; y así determinar la humedad por diferencia de pesos, considerando que la pérdida de masa es agua (AOAC, 2005.950.46b).

### **V.3.2. Cenizas**

Se depositaron 2 g de vinaza seca procedente de la determinación de humedad, en un crisol a peso constante, el crisol con la muestra se colocaron en un incinerador marca Electrothermal hasta que dejó de emitir humo, esto para la eliminación de los componentes orgánicos contenidos en la muestra, posteriormente el crisol se colocó en una mufla a 550 °C durante 2 h y finalmente las cenizas fueron determinadas por diferencia de peso (AOAC, 1990.942.05).

### **V.3.3. Grasas**

Para la determinación de grasas, la vinaza fue deshidratada en una estufa de vacío a 70 °C hasta peso constante, posteriormente se tomaron 5 g de muestra seca y se depositaron en un cartucho Whatman de 25 mm de diámetro interno por 90 mm de longitud, puesto previamente a peso constante; después fue colocado en el sifón del equipo soxhlet, añadiendo previamente 150 mL de hexano al matraz colector. Se dejó el equipo montado sobre una parrilla de calentamiento a 80°C, a partir del primer reflujo se esperaron 4 horas. Posteriormente, el cartucho fue colocado en una estufa marca Lab-Line, hasta llegar a peso constante, para finalmente determinar el porcentaje de grasa contenida en la muestra por diferencia de pesos (AOAC 960.39B).

### **V.3.4. Nitrógeno Total**

Se pesaron 0.05 g de vinaza seca procedente de la etapa V.3.3, se colocó en papel arroz y se depositó en un matraz micro Kjeldahl y se agregaron 0.5 g de mezcla catalizadora, 0.3 g de  $K_2SO_4$  y 3 mL de  $H_2SO_4$ . Posteriormente el matraz se colocó en un digestor y se dejó calentar girando el matraz ocasionalmente hasta obtener una solución azul o verde claro, al término se esperó que el matraz se enfriara en la campana de extracción. Posteriormente la muestra se vació en un matraz de destilación de 300 mL y se agregaron cuidadosamente 200 mL de agua destilada, 1 mL de  $Na_2SO_4$  al 10 %, y lentamente se adicionó 15 mL de NaOH al 40 %. El matraz se adaptó al equipo de destilación, en la salida del refrigerante se puso un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 10 mL de ácido bórico al 4 % y unas gotas de una mezcla de indicador rojo de metilo con azul de metileno (proporción 1:1). Las primeras gotas del destilado viraron el color del indicador de violeta a un verde amarillento, de lo contrario se deja enfriar el matraz de destilación y se agrega más NaOH al 40 %. La destilación se detuvo hasta que unas gotas del destilado evidenciaron alcalinidad con el papel tornasol. Se retiró el matraz receptor, apagando la fuente de calor, se lavó el refrigerante con agua destilada vaciando los residuos sobre el destilado y se tituló con HCl 0.1 N (AOAC, 2005.928.08).

## V.4. Análisis fisicoquímicos

### V.4.1. Acidez y alcalinidad

Se recolectaron por lo menos 500 mL de vinaza en frascos de vidrio, se conservó a una temperatura entre 0°C a 4 °C hasta su análisis. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 24 h.

Se prepararon las siguientes soluciones: hidróxido de sodio 0.1 N, se pesaron aproximadamente 4,0 g de hidróxido de sodio, se disolvió y aforó a 1 L con agua destilada, hidróxido de sodio 0.02 N. Se transfirieron 200 mL de la solución de NaOH 0.1 N a un matraz volumétrico de 1L y se diluyó a 1L con agua destilada.

Valoración de las disoluciones

Valoración del hidróxido de sodio (0,02 N). Se pesaron con precisión 0,102 g de biftalato de potasio secado a 105°C, se añadieron unos 25 mL de agua y unas gotas de la disolución de fenolftaleína posteriormente se tituló con la disolución de hidróxido de sodio hasta el vire del indicador (de incoloro a rosa) y se calculó la normalidad del hidróxido con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{A}{B \times 204,2} \times 1000$$

Donde:

N: es la normalidad del hidróxido de sodio, equivalentes/L

A: son los gramos de biftalato de potasio

B: son los mL de hidróxido de sodio utilizados, y 204,2: son los gramos por equivalente de biftalato de potasio.

Se transfirieron 100 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 2 gotas de disolución indicadora de fenolftaleína, y se tituló con disolución de hidróxido de sodio

valorada hasta el vire del indicador (de incoloro a rosa), y se registró el volumen empleado en la titulación (acidez total).

Cálculos

Acidez total como CaCO<sub>3</sub> en mg/L

$$CaCO_3 \text{ en mg/L} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)](50)(1000)}{100}$$

Donde:

100 es el volumen de la muestra en mL;

A es el volumen de NaOH utilizado al vire de la fenolftaleína;

B es la normalidad de la disolución de NaOH;

C son los mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizados en el tratamiento con peróxido;

D es la normalidad del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado;

50 es el factor para convertir eq/L a mg CaCO<sub>3</sub>/L, y

1 000 es el factor para convertir mL a L.

#### **V.4.2.Demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>)**

El método se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para llevar a cabo la oxidación de la materia orgánica presente en aguas residuales y se determina mediante la diferencia de oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de cinco días de incubación a 20°C.

La determinación se llevó a cabo por el método de respirometría. La respirometría es una técnica basada en la medición de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que trabajan sobre un sustrato orgánico, el cual es degradado y oxidado a CO<sub>2</sub>. Este método mide el consumo de oxígeno más o menos continuamente en el tiempo y es útil para evaluar biodegradación de sustancias químicas específicas, tratabilidad de residuos orgánicos residuales.

### V.4.3. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

(Método a reflujo cerrado/ método espectrofotométrico)

Para este proyecto se determinó la DQO por el método de reflujo cerrado, debido a la gran cantidad de carga orgánica presente en nuestras muestras. Para esta determinación se prepararon las siguientes soluciones:

Disolución de digestión A:

Se pesaron aproximadamente 10.216 g de dicromato de potasio, previamente secado a 103°C por 2 horas, y se aforaron con 500 mL de agua destilada

Disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico:

Se pesaron 15 g de sulfato de plata y se disolvió en 1 litro de ácido sulfúrico concentrado, esta solución se dejó en reposo por 2 días antes de utilizarse debido a que el sulfato de plata requiere tiempo para su completa disolución y finalmente se mantuvo en la obscuridad para evitar su descomposición. Para la curva de calibración se prepararon cinco disoluciones de biftalato de potasio de concentraciones conocidas con DQO equivalentes a una concentración de 20 mg O<sub>2</sub>/L a 900 mg O<sub>2</sub>/L, se ajustó el volumen con agua destilada. Se prepararon concentraciones de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg O<sub>2</sub>/L.

Preparación de la muestra

Se precalentó a 150°C el digestor para DQO de marca HACH modelo DRB 200

Se colocaron en los tubos de reacción 2 mL de la disolución de digestión A.

Se tomaron 2 mL de muestra, previamente diluida en una proporción de 1:100 ml de vinaza aforado con agua destilada a 100mL, y se colocaron en los tubos de reacción, después se añadieron cuidadosamente 3 mL de la disolución de digestión respectiva, para el blanco se utilizó agua destilada, posteriormente los tubos fueron colocados en el digestor a 150°C y digeridos por 2 h, una vez pasado ese tiempo se retiraron los tubos del digestor y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de la marca HACH modelo DRB 200 a una longitud de onda de 620 nanómetros, previamente calibrado.

Se calculó la DQO en la muestra en miligramos por litro (mg/L) directamente de la curva de calibración, con la ecuación:  $Y = mX + b$

Reportar los resultados en mg/L.

#### **V.4.4. Sólidos sedimentables**

Se colocaron 3 muestras bien mezcladas en conos Imhoff hasta la marca de 1 litro. Se dejaron sedimentar 24 h, una vez transcurrido este tiempo se agitaron suavemente los lados del cono con un agitador o mediante rotación, se mantuvo en reposo 15 min más y se registró el volumen de sólidos sedimentables del cono como ml/L. Si la materia sedimentable contiene bolsas de líquido y/o burbujas de aire entre partículas gruesas, evaluar el volumen de aquellas y restar del volumen de sólidos sedimentados.

#### **V.4.5. Sólidos y sales disueltas**

Se pusieron a peso constante 3 cápsulas de porcelana, y se registraron como peso G.

Preparación de crisoles Gooch

Para este método se tuvo que sustituir la fibra de vidrio por papel filtro wattman número cuatro para la filtración, debido a que los poros de la fibra eran muy pequeñas y no permitían el filtrado, debido a que los sólidos de la muestra son partículas muy finas del mismo tamaño del poro.

Se colocó el papel filtro en el crisol con la cara rugosa hacia arriba, el papel filtro se humedeció con agua para asegurar que se adhiriera al fondo del crisol.

Los crisoles se introdujeron a la mufla a una temperatura de  $550^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos como mínimo. Después se transfirieron a la estufa a  $103^{\circ}\text{C} - 105^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos aproximadamente.

Se sacaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador, posteriormente los crisoles se pesaron y se repitió el ciclo hasta alcanzar el peso constante, el cual se obtuvo hasta no haber una variación en el peso mayor a 0.5 mg, este peso se registró como peso G3.

#### **V.4.6.Sólidos totales (ST)**

Se transfirieron 35 mL de muestra homogénea a cápsulas de porcelana previamente a peso constante a una estufa de vacío a 70 °C, hasta peso constante. Se dejó enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente y hasta alcanzar peso constante. Se registró como peso G1.

#### **V.4.7.Sólidos totales volátiles (SVT)**

Se introdujeron las cápsula conteniendo el residuo de los sólidos totales a la mufla a 550°C ± 50 °C durante 15 a 20 min, se transfirieron las cápsula a la estufa a 103°C - 105°C durante 20 minutos aproximadamente, se sacaron las cápsulas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador y se determinaron sus pesos hasta alcanzar peso constante. Registrar como peso G2.

#### **V.4.8.Determinación de los sólidos suspendidos totales (SST)**

Se midieron aproximadamente 50 ml de vinazas homogeneizada y se filtró a través del crisol Gooch previamente a peso constante, se lavó el disco tres veces con 10 mL de agua, dejando que el agua drene totalmente en cada lavado.

Se suspendió el vacío, se dejó secar el crisol en la estufa a una temperatura de 103°C a 105°C durante 1 h aproximadamente. Se dejó enfriar en un desecador a temperatura ambiente y se determinó su peso hasta alcanzar peso constante, el cual se registró como peso G4.

#### **V.4.9.Determinación de sólidos suspendidos totales (SSTV)**

Se introdujeron los crisoles Gooch que contenían los SST y el disco a la mufla, a una temperatura de 550°C ± 50°C durante 20 minutos, se sacaron y se introdujeron a la estufa a una temperatura de 103°C -105°C durante 20 minutos aproximadamente. Se sacaron y

dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador y se determinaron los pesos hasta alcanzar peso constante. Se registró como peso G5.

#### V.4.10.Sales disueltas totales (SDT)

La determinación de las sales disueltas totales es por diferencia entre los sólidos totales menos sólidos suspendidos totales.

Cálculos

Calcular el contenido de sólidos totales de las muestras como sigue:

$$ST = \frac{(G1 - G) \times 1000}{V}$$

Donde:

ST son los sólidos totales, en mg/L;

G1 es el peso de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, en mg;

G es el peso de la cápsula vacía, en mg a peso constante, y

V es el volumen de muestra, en mL.

Calcular el contenido de sólidos totales volátiles de las muestras como sigue:

$$SVT = \frac{(G1 - G2) \times 1000}{V}$$

Donde:

SVT es la materia orgánica total, en mg/L;

G2 es el peso de la cápsula con el residuo, después de la calcinación, en mg, y

V es el volumen de muestra, en mL.

Calcular el contenido de sólidos suspendidos totales de las muestras como sigue:

$$SST = \frac{(G4 - G3) \times 1000}{V}$$

Donde:

SST son los sólidos suspendidos totales, en mg/L;

G3 es el peso del crisol con el disco a peso constante, en mg;

G4 es el peso del crisol con el disco y el residuo seco, en mg, y

V es el volumen de muestra, en mL.

Calcular el contenido de sólidos suspendidos totales Volátiles de las muestras como sigue:

$$SST = \frac{(G4 - G5)}{V} \times 1000$$

Donde:

SST son los sólidos suspendidos totales, en mg/L;

G5 es el peso del crisol con el residuo, después de la calcinación, en mg;

V es el volumen de muestra, en mL.

Calcular el contenido de sales disueltas totales de las muestras como sigue:

$$SDT = ST - SST$$

Donde:

SDT son las sales disueltas totales, en mg/L

ST son los sólidos totales, en mg/L

SST son los sólidos suspendidos totales, en mg/L

Reportar los resultados, en mg/L.

#### **V.4.11.Determinación de pH**

Se tomaron 3 muestras de 50 mL de vinaza a temperatura ambiente y se midió el pH con la ayuda de un potenciómetro HACH modelo SenSion 3, previamente calibradas con soluciones Buffer de pH 4,7 y 10.

#### **V.4.12.Factores de alcalinidad**

Se tomaron 10 mL de muestra y se tituló con HCl a 0.1N

Titular hasta alcanzar un pH de 5.75; este volumen titulado (V1) corresponde a la alcalinidad bicarbonática. Se siguió titulando hasta alcanzar un pH de 4.3, este segundo

volumen titulado (V2) corresponde a la alcalinidad debida a los ácidos grasos volátiles (AGV).

La alcalinidad total se calculó con la suma de V1 y V2.

El índice tampón (IB) corresponde a la relación entre la alcalinidad debida a los AGV y la alcalinidad total (Rojas, 1987), así:

$$IB = \frac{V2}{V1 + V2}$$

El índice AI / AP es la relación entre la alcalinidad debida a los AGV y la alcalinidad bicarbonática (Ripley *et al.*, 1986), así:

$$\frac{AI}{AP} = \frac{V2}{V1}$$

El índice  $\alpha$  es la relación entre la alcalinidad bicarbonática y la alcalinidad total (Jenkins *et al.*, 1983) así:

$$\alpha = \frac{V1}{V1 + V2}$$

#### **V.4.13. Ácidos grasos volátiles**

Para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) por titulación. Se tomaron 30 ml muestra de efluente y se colocaron en tubos falcón de 50 ml de capacidad y se centrifugó por 5 minutos a 4000 rpm en una centrifuga, se decantó y del sobrenadante se tomaron 25 mL y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Cuando la muestra presentó un pH mayor a 6.5 se tituló con HCl 0.1N hasta lograr el pH 6.5. Se tituló con ácido clorhídrico 0.1N hasta pH 3 (el consumo se registró como A). A este pH el bicarbonato es convertido en CO<sub>2</sub> y los ácidos grasos volátiles están presentes en solución en su forma no ionizada.

Posteriormente la muestra se colocó en un matraz balón de digestión con conexión de vidrio esmerilado, se añadieron algunas perlas de ebullición y se colocó al condensador. De

esta forma se eliminan por calentamiento el bicarbonato como CO<sub>2</sub> mientras que se preservan los AGV.

Se dejó calentar la muestra hasta ebullición por 3 minutos aproximadamente. Se interrumpió el calentamiento y se esperó 2 minutos, se tituló inmediatamente hasta que se logró un pH 6.5 con NaOH 0.1N (este consumo se registra como B), no es necesario enfriar el líquido (Field, 1987). Los meq/L de AGV se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{meq AGV} = \text{Volumen de base gastada (B)} * 0.1 \text{ meq}$$

$$\text{meq/L AGV} = \text{meq AGV} / \text{volumen de muestra(mL)} * 1000$$

#### **V.4.14. Azúcares reductores**

Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración aplicando la técnica de Miller DNS (ácido dinitrosalicílico) reactivo que tiene la capacidad de oxidar a los azúcares reductores generando resultados colorimétricos proporcionales a su concentración y medidos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

##### Preparación del DNS

Se pesó 2.65g de DNS, 4.95 de NaOH, 2.03g de fenol, 2.075g de metabisulfito de sodio, 76.5 g de acetatos para la solución reguladora y se diluyeron en 354 mL de agua destilada. Para comprobar la reactividad de la solución se tituló con HCl al 0.1N, con volúmenes de 5 a 7 ml de HCl 0.1N gastados se considera reactiva la solución de DNS.

##### Curva patrón

Se pesó 1g de glucosa y se diluyó en 1 litro de agua destilada, de esta solución se prepararon concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1g/L de glucosa.

Se prepararon 3 tubos para cada concentración de glucosa respectiva de las soluciones de la curva, se adicionaron a cada tubo 0.5 mL de solución de glucosa respectiva y un tubo con 0.5 ml de agua como blanco a cada tubo se adicionó 1.5 mL de DNS, después se agitaron todos los tubos en un vortex por 1 minuto.

Pasado este tiempo los tubos se pusieron a baño maría por 10 minutos a 100°C, posteriormente se dejó enfriar y se diluyó con 8 ml de agua, se volvió agitar en el vortex por un minuto y finalmente se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. El mismo procedimiento se empleó para las muestras problema.

#### **V.4.15. Fenoles totales.**

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Sintetizados como metabolitos secundarios con funciones de defensa, son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres (Kuskoski *et al.*, 2005). El contenido de fenoles totales se expresa en equivalentes de ácido gálico, miligramos de ácido gálico por litro de muestra.

##### Curva de calibración

Se preparó una solución de ácido gálico a 1200 ppm, a partir de esta se prepararon concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm de ácido gálico. De cada concentración se tomaron 0.1 ml y se colocaron en tubos de ensaye con 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), 1 mL de carbonato de sodio al 20%, 8.4mL de agua, para obtener un volumen final de 10 mL, posteriormente se agitó en vortex, se dejó reposar por durante 60 minutos en un lugar oscuro, pasado este tiempo se tomó lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm, el mismo procedimiento se repitió para la muestra problema.

#### **V.4.16. Fósforo total**

Se utilizó el método de molibdovanadato (HACH 19127) adaptado al método estándar para el análisis de agua y aguas residuales (NMX-AA-029-SCFI-2001).

Se prepararon las siguientes soluciones: ácido clorhídrico (1:1) se agregó cuidadosamente 100 mL de ácido clorhídrico concentrado a 100 mL de agua, lentamente. Disolución A: se pesaron 25 g de heptamolibdato de amonio y diluyó en 300 mL de agua. Disolución B: 1.25 g de metavanadato de amonio y se diluyó en 300 mL de agua destilada, se calentó hasta ebullición. Se dejó enfriar y se añadieron 330 mL de ácido clorhídrico y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Disolución reactivo vanado-molibdato: se adicionó la disolución A a la disolución B se mezcló y se aforó a un volumen final de 1 L con agua destilada.

Disolución de hidróxido de sodio (1N): se pesaron 40 g de hidróxido de sodio y se diluyó con 500 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

#### Curva de calibración

Se preparó una solución madre en un intervalo de trabajo entre 1 mg/L a 20 mg/L: se prepararon las disoluciones estándar con concentraciones de 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L y 20 mg/L en matraces volumétricos de 100 mL y se desarrolló la reacción de la siguiente manera: Se usó 50 mL de muestra y se agregó una gota de fenolftaleína. Posteriormente se adicionó 1 mL de disolución de ácido fuerte y 0.4 g de persulfato de amonio o 0.5 g persulfato de potasio. Se dejó Calentar hasta ebullición y se mantuvo sobre la placa de calentamiento, por 30 min hasta que el volumen final alcanzado fue de 10 mL. Se enfrió y diluyó a 30 mL con agua destilada, adicionando una gota de fenolftaleína, y se neutralizó hasta desvanecer a un color rosa pálido con la disolución de hidróxido de sodio. Alternativamente, se calentó por 30 min en una autoclave a 137 kPa. Se dejó enfriar, y se añadió una gota de fenolftaleína y se volvió a neutralizar hasta desvanecer a un color rosa pálido con la disolución de hidróxido de sodio. Finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada.

Para el desarrollo de color se tomó una alícuota que contenía de 0,05 mg a 1,0 mg de fósforo, en un matraz volumétrico de 50 mL. Se le Añadió 10 mL de la disolución reactivo vanado-molibdato y se diluyó hasta la marca con agua. Aparte se preparó un blanco usando una cantidad de agua equivalente a la alícuota de la muestra. se dejó reposar 10 minutos y se midió la absorbancia de la muestra contra un blanco a una longitud de onda de 420nm.

Se calculó la concentración de la muestra con la ecuación obtenida de la curva de calibración, representada en la siguiente ecuación:

$Y = mX + b$ . Dónde: m es la pendiente; b es la ordenada al origen; Y es la absorbancia, y X es la concentración (mg P/L).  $\text{mg P/L} = \text{concentración} \times \text{Factor de dilución}$

Los resultados se reportan en mg P/L.

#### **V.4.17. Sulfatos totales**

La metodología se hizo de acuerdo a la NMX-AA-074-1981. Reactivo acondicionador: Se mezclaron 50 mL de glicerol en una solución que contenía 30 ml de ácido clorhídrico concentrado, posteriormente se agregaron 300 mL de agua, 100 mL de alcohol etílico al 95% y 75 g de cloruro de sodio.

Para la preparación de la solución estándar de sulfato se pesaron 147.9 mg de sulfato de sodio anhidro y se aforó a 1 L con agua destilada.

Preparación de la curva de calibración De la solución estándar de sulfato se prepararon patrones a incrementos de 5mg/L en los límites de 0 a 40 mg/L.

Formación de turbiedad de sulfato de bario

Para la formación de la turbiedad se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL una muestra de 100 ml de vinaza, o una porción conveniente aforada con agua a 100 mL. Después se añadió exactamente 5 mL del reactivo acondicionador y se mezcló con un agitador magnético. Cuando la solución seguía en agitación se 3 g de cristales de cloruro de bario, e inmediatamente se tomó el tiempo y se agitó durante un minuto exacto a una velocidad constante.

Medición de la turbiedad del sulfato de bario

Inmediatamente después de terminar el período de agitación, se vertió la solución a una celda de absorción del fotómetro y se midió la turbiedad a 420 nm a intervalos de 30 segundos durante 4 minutos. Debido a que la turbiedad máxima se presenta generalmente dentro de los 2 minutos y que de ahí en adelante las lecturas permanecen constantes durante 3 a 10 minutos, se considera que la turbiedad, es la máxima lectura obtenida durante el intervalo de 4 minutos.

$$\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{SO}_4 = \frac{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{SO}_4 \times 1000}{\text{ml de muestra}}$$

#### V.4.18. Conductividad eléctrica

Se determinó la constante celular del multímetro de la marca Mul-040. Para la determinación de la constante celular del multímetro, se preparó una solución de KCl 0.02M. Se substituyó el valor obtenido de la solución en la siguiente ecuación, para conocer la constante.

$$C = (0.002767)(R_{\text{solución}})[1 + 0.0191(t - 25)]$$

$$C = (0.002767)(R_{\text{solución}})[1 + 0.0191(t - 25)].$$

Donde: C= constante celular R= resistividad de la muestra t= temperatura

Determinación de la resistividad de la muestra se colocaron 50 mL de muestra problema en un vaso de precipitado y se tomó lectura de la resistividad a través del multímetro, el valor obtenido se substituyó en la siguiente ecuación

$$K = \frac{(1,000,000)(C)}{(R_{\text{muestra}})[1 + 0.0191(t - 25)]} = \mu\Omega/cm$$

K= Conductividad eléctrica Conversión: 1mS/m = 10  $\mu\Omega/cm$

Este método se realizó bajo el compendio de métodos para el análisis de suelos y aguas, del ministerio del ambiente y recursos Naturales renovables (MARNR), Barcelona, 1985

#### V.4.19. Determinación de glucosa, sacarosa, etanol y ácido acético por HPLC

Para estas determinaciones se utilizó un equipo de HPLC de la marca Perkin Elmer serie 200 NCI 900 equipado con detector de arreglo de diodos, utilizando una columna Hi-plex-It, a una temperatura de 30°C y a un flujo de 0.4 ml/ min. Las muestras de vinazas fueron homogenizadas, presentando 6 grados brix y un pH de 4.26, se colocaron en tubos

ependorf y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 25°C en una centrífuga Eppendorf (centífuga 5810R). Posteriormente se hicieron diluciones, se tomaron 250 µL del sobrenadante y se diluyeron con 750 µL de agua. Se inyectaron las muestras en el cromatógrafo, previamente diluidas y filtradas con filtros de marca non-pyrogenic, Sterile-R, N°83.1826.001 de 0.20µm. Se dejaron correr las muestras en un tiempo de 50 minutos para cada una de ellas y se analizaron los resultados, con curvas estándar de glucosa, fructosa, ácido acético, etanol y sacarosa.

## **V.5. Elección del inóculo**

Se utilizaron lodos anaerobios proveniente de la planta de tratamientos de agua residual de la empresa Coca Cola ® FEMSA, y el estiércol del ganado vacuno, quienes proporcionaron las comunidades microbianas encargadas de utilizar a las vinazas como sustrato. Cada complejo microbiano fue sometido a un proceso de adaptación, para ello se empleó una relación 50:50 de vinazas: complejo microbiano.

El pH y la DQO de esta mezcla fue monitoreada diariamente durante 30 días. El inóculo se consideró estandarizado cuando la desviación estándar de la DQO fuese menor o igual al 10% de la remoción promedio de los días anteriores.

### **V.5.1. Elección del inóculo en un sistema por lote alimentado**

Una vez elegido el inóculo, se continuo la alimentación con vinazas, esta vez utilizando un sistema por lote alimentado, para ello se hizo uso de un reactor con capacidad de 10 litros, inicialmente fueron inoculados con lodos anaerobios y vinazas en una relación 50:50 (V/V), ocupando así un volumen inicial de 3 litros. Después de la primera alimentación se fue monitoreando la DQO y el pH cada tercer día, hasta que la disminución de la DQO no era significativa (menos del 10%) y se iniciaba el siguiente ciclo de alimentación con 1 litro de nueva vinaza con un volumen igual, repitiendo el mismo procedimiento hasta obtener una disminución de la DQO no tan significativa y así sucesivamente.

## CAPÍTULO VI

# VI.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## VI.1. Materia prima

La materia prima (vinaza) se obtuvo de una serie de lotes del proceso de destilación de la bebida denominada “comiteco”

La temperatura de salida del residuo fue en un rango de 80-100°C, después de su enfriamiento se colocaron en recipientes herméticos y finalmente fueron almacenados a 4°C hasta su análisis como lo indica la norma NMX-AA-003.

## VI.2. Caracterización de la materia prima

En lo que se refiere a la caracterización de las vinazas se realizaron análisis proximales y fisicoquímicos. De los lotes obtenidos se realizaron las siguientes determinaciones: Demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) (método de reflujo cerrado/método espectrofotométrico NMX-AA-030), (NMX-AA-028-SCFI-2001), Nitrógeno total (método de Kjeldahl NMX-AA-026-SCFI-2001), Sólidos suspendidos totales (NMX-AA-034-SCFI-2001), alcalinidad y acidez (NMX-AA-036-SCFI-2001), sulfatos totales (Método Gravimétrico NMX-AA-074-1981), pH (NMX-AA-008-SCFI-200), determinación de grasas (NMX-AA-051-SCFI-2000), iones metálicos (NMX-AA-051-SCFI-1981). Todos los análisis se llevaron a cabo con tres repeticiones.

## VI.3. Análisis proximales

En la tabla 5 se observa la composición química correspondiente a la vinaza proveniente de los residuos en la destilación de la bebida del Comiteco, sin un tratamiento previo, a una temperatura de salida del proceso de 80°C, y después mantenida en refrigeración a 4°C hasta su análisis. En el cual destaca bajo contenido de cenizas, presentando una cantidad considerable de Nitrógeno total y un alto contenido de humedad.

La mayoría de los compuestos químicos contenidos en las vinazas son de carácter quelante por tener grupos aminos, diácidos e hidroxilos (Medina, 2000).

Respecto al valor obtenido de nitrógeno total fue relativamente alto con un valor de 2.6g/L, comparado con los 3.3 g/L de sulfato de amonio, que se le agrega al mosto como fuente de nitrógeno durante la fermentación del comiteco (Lara,2013), estas incluyen todos los productos naturales, como las proteínas, los péptidos y aminoácidos entre otros, la importancia de este parámetro se debe a la posibilidad del uso de la vinaza del agave comiteco como fuente de nutrientes para la producción de biogás.

Además de una fuente de nitrógeno los microorganismos requieren una fuente de carbono, fósforo y otros factores de crecimiento que tienen efectos complejos, los niveles de nutrientes deben de estar por encima de la concentración óptima para las metanobacterias, ya que ellas se inhiben severamente por falta de nutrientes (Contreras, 2006).

Con respecto al porcentaje de cenizas, se obtuvieron porcentajes bajos por lo que es de suponerse que las vinazas del comiteco presentan un bajo porcentaje de minerales, ya que el porcentaje de cenizas en el sustrato indica la cantidad de materia sólida no combustible.

**Tabla 5.** Composición química de la vinaza del Comiteco

Composición	Resultado
Humedad %	93.76±0.27
Nitrógeno Total mg/L	2666.67
Cenizas %	7.11 ± 0.13

#### **VI.4.Análisis fisicoquímicos**

En los análisis fisicoquímicos todos los análisis se llevaron a cabo con tres repeticiones, las muestras fueron tomadas de un lote al azar, homogenizada y mantenida en refrigeración hasta su análisis. Se ha estudiado que para obtener una digestión óptima, tienen que estar presentes todos los elementos esenciales en forma fácil de asimilar por los microorganismos presentes en el sistema, se han logrado resultados satisfactorios con

concentraciones mayores a 15% de sólidos, los requerimientos nutritivos de DBO: nitrógeno: fósforo en la digestión anaeróbica están en la relación 700:5:1, para la optimización de la digestión anaeróbica (Wheatley, 1990).

A continuación se muestran en la tabla 6 los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos. Se observa que las muestras de vinazas en general, presentan características similares a los valores de pH, fenoles totales sulfatos, DQO, Nitrógeno total y fósforo total reportados por varios autores en estudios realizados en vinazas procedentes de la destilación de caña de azúcar y la destilación de alcohol de uva (Durán-de-Bazúa *et al.*, 1991; Jiménez *et al.*, 2006; García *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1996; Benítez *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2002; Sangave *et al.*, 2007; Madejón *et al.*, 2001; Beltrán *et al.*, 1999).

#### **VI.4.1.pH**

En lo que se refiere al pH de la vinaza, estas presentaron un valor bajo (3.89), por lo que el vertido de las vinazas directamente al suelo puede ocasionar su deterioro, ya que un pH ácido puede desestabilizar el pH que presentan los suelos, por lo consiguiente se vería afectado la disponibilidad de los elementos nutritivos, al igual que en cuerpos de agua. Este pH ácido se debe a que durante la fermentación del mosto para la obtención del Comiteco, el pH se mantiene ácido, debido al ambiente óptimo que las levaduras necesitan para llevar a cabo la fermentación, debido a ello en el proceso de destilación las vinazas salen a un pH similar ya que solo sufre un tratamiento físico. El pH de la vinaza del comiteco es similar a las vinazas obtenidas de materia prima de otros tipos como caña de azúcar que presenta pH 4, (Gómez, 1996) o de remolacha con pH 5.1 (Robertiello, 1981).

Así mismo se observa que las vinazas del comiteco no presentan alcalinidad, debido a que el pH se encuentra en el límite inferior de la determinación, no obstante algunos autores reportan dicho parámetro (Durán-de-Bazúa *et al.*, 1991; 2 Jiménez *et al.*, 2006).

#### **VI.4.2. Sólidos totales**

En el caso de los sólidos totales su contenido en las vinazas puede variar de acuerdo a la materia prima que es utilizada para la elaboración de la bebida, así como el proceso utilizado para la destilación de la misma, cuando el sistema es operado a presión atmosférica las vinazas son más concentradas (Araujo, 1976). Los procesos de destilación realizados a baja presión en promedio están alrededor del 50% (Robertiello, 1981).

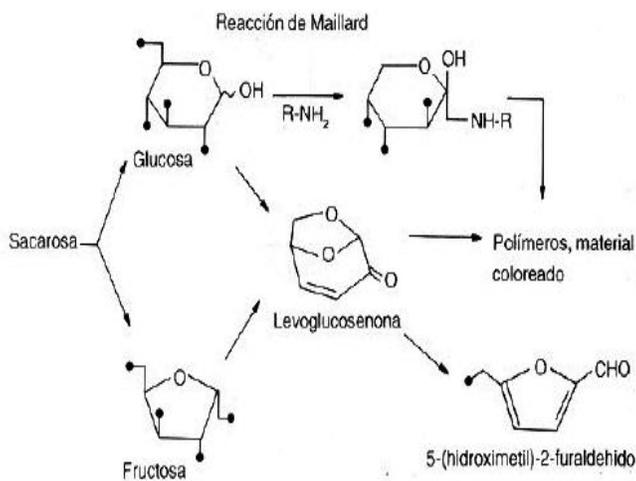
Según Underkofler y Hickey esta materia orgánica interpolando en una vinaza de 55% en sólidos podría estar distribuida, aproximadamente, de la manera siguiente: (1) Azúcares entre 6% y 7%, (2) Proteínas + aminoácidos entre 5% y 7%, (3) gomas entre 11% y 12%, (4) ligninas y compuestos de estructura fenólica entre 9% y 11% y (5) compuestos de bajo peso molecular entre 9% y 10%. No obstante, haber sido concentrada hasta un 55% contiene compuestos muy volátiles.

#### **V.4.3.DBO<sub>5</sub> Y DQO**

Respecto a la DQO, un parámetro importante para medir el grado de contaminación en aguas residuales, los resultados obtenidos muestran valores superiores, comparado con las vinazas mezcaleras (Robles-González, 2010) que oscilan entre 56230-65457 g de O<sub>2</sub>/L esto se debe probablemente al proceso de fabricación y a los insumos que se utilizan durante su fermentación. Por lo que hace de la vinaza un residuo altamente tóxico para ser desechado al medio ambiente, sin ningún tratamiento previo y de igual manera un residuo con alto potencial energético para ser llevado a un tratamiento anaeróbico y producir Biogás.

Podemos mencionar en términos generales que las muestras presentaron: alta carga orgánica medidas como DQO y DBO, son fuertemente ácidas, contienen altos valores de conductividad eléctrica, presentan un color intenso oscuro esto debido a la formación de las melanoidinas, producido cuando una molécula de hidrato de carbono y un aminoácido reaccionan la cual se forma en la fase final en las reacciones de Maillard, a pesar de que su concentración es baja, ejercen un efecto muy marcado en la apariencia del alimento. El

color se debe a una amplia absorción del espectro visible por parte de diversos cromóforos. (Rufián *et al.*, 2009).



**Figura. 3.** Vías de la termólisis de la sacarosa y formación de melanoidinas durante el procesamiento de la caña de azúcar (Shafizadek *et al.*, 1979)

#### VI.4.4. Azúcares reductores

Se determinó el contenido de azúcares reductores presentes en la vinaza del comiteco, cabe aclarar que durante la preparación del mosto se agrega miel de agave y miel de panela como sustrato para las levaduras y así propiciar una fermentación óptima de la bebida, por ello es de esperarse concentraciones de azúcares en las vinazas, para la determinación de azúcares reductores se utilizó el método de DNS (Miller 1959) el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia a 540 nm. Utilizando este método colorimétrico se obtuvo una concentración de 8.243 g/L de azúcares reductores.

Por otra parte utilizando el método de HPLC, se encontraron en las vinazas concentraciones de azúcares reductores; glucosa con 3.02 g/L, fructosa con 3.48g/L, así como también se encontró sacarosa un azúcar no reductor en una concentración de 7.44g/L. Comparando los resultados de azúcares reductores por el método de DNS (Miller) y los resultados del HPLC, se observa que las concentraciones son semejantes si se toma

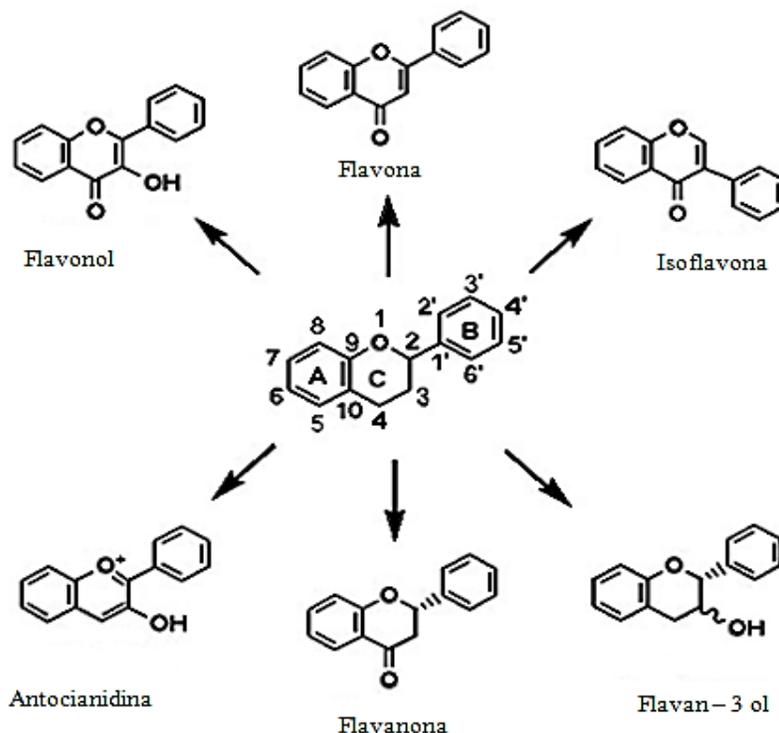
en cuenta que son métodos distintos, ya que el método de DNS es un método colorimétrico que reacciona con todos los azúcares reductores, a diferencia del método del HPLC que es más específico, en este caso para la glucosa y fructosa, tomando en cuenta esto se puede suponer que por el método del HPLC no todos los azúcares reductores fueron detectados y por ello existe una mínima diferencia en los resultados de ambos métodos. Estos azúcares representan parte de la fuente de carbono presentes en la vinaza del comiteco, para ser utilizados por los microorganismos en la digestión anaerobia y así llevar a cabo finalmente la producción de biogás.

#### **VI.4.5.Fenoles totales**

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal donde tienen funciones diversas: desde la coloración de flores y frutos hasta la impregnación de lignina de las paredes pecto-celulósicas (Champagnol, 1984; Ribéreau-Gayon, 1964). Además se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza principalmente en las hojas de los árboles, arbustos y leguminosas (McLeod, 1974), y en general en especies que se desarrollan en zonas tropicales, áridas y semiáridas. Por ello en las vinazas del comiteco la presencia de fenoles se puede justificar por la presencia del pigmento de color café oscuro, lo cual se debe a la presencia de las melanoidinas, caramelo y melanina, propios del licor de destilerías de melazas (Sirianuntapiboon *et al.* 1988, Godshall 1999, Kalavathi *et al.* 2001. Además de tener un origen vegetal ya que provienen de la miel del agave, obtenida de la penca sometida a una maduración. Según (Sales *et al.*, 1987) los fenoles son compuestos no volátiles procedentes de la fermentación del caldo, en la vinaza del comiteco se obtuvieron 356 mg de fenol representados como ácido gálico / L, los cuales son valores poco lejanos a los reportados en las vinazas de origen mezcalero, que oscila entre 478.4-541.8 mg de ácido gálico.

Estos compuestos difícilmente pueden ser degradados por los microorganismos presentes en la digestión anaerobia debido a que estos compuestos fenólicos constan de estructuras cíclicas de un anillo bencénico, que contiene uno o diversos grupos hidroxilo, en la

mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero, por ello se sugiere considerar el tipo de fenoles presentes en el efluente ya que el proceso se hace más lento cuando existen compuestos fenólicos complejos. Aunque se ha reportado que la degradación de los compuestos fenólicos puede ser llevada a cabo por organismos procariontas y eucariotas, tanto en condiciones aeróbicas (oxígeno como aceptor final de electrones) como anaeróbicas (nitrato, sulfato, iones metálicos o dióxido de carbono como aceptores finales de electrones (Ruiz *et al.*, 2001). En este sentido, algunos investigadores han demostrado que cultivos de *Pseudomonas* sp. y *Spirillum* sp., degradan fenol en ausencia de oxígeno libre. También ha sido reportada la fermentación metanogénica de fenol bajo estas condiciones de oxigenación (Colberg-Young, 1995). Según su estructura química, estos compuestos se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides figura 12, según sean o no derivados de la estructura básica de fluoroglucinol, caracterizada por un esqueleto de 2 anillos bencénicos unidas por una cadena de 3 átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado (Brunet, 1999).



**Figura 4.** Clasificación de compuestos fenólicos.

#### **VI.4.6.Fósforo total**

La vinaza al ser un residuo industrial líquido de origen vegetal contiene nutrientes, compuestos en promedio por un 93% de agua, 2% de compuestos inorgánicos (potasio, calcio, sulfatos, cloruros, nitrógeno, fósforo, etc.) y en un 5% de compuestos orgánicos que volatilizan al ser calentados a 650°C (Luna, N *et al.*, 1990). El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de organismos en una digestión anaerobia, por ello la importancia de su presencia en las vinazas ya que también son utilizadas para la síntesis de energía de los microorganismos en forma de ATP.

El contenido de fósforo total que se obtuvo de la vinaza del comiteco fue de 1033.33 mg/L una cantidad ligeramente moderada, lo cual se encuentra en los rangos obtenidos en las vinazas mezcaleras que oscilan entre 290.0-1705 mg/L.

#### **VI.4.7.Sulfatos totales**

La presencia de sulfatos en la vinaza se debe a que en la preparación del mosto se le agrega un porcentaje relativamente pequeño de sulfato de amonio, como elemento traza y fuente de nitrógeno (Lara, 2013), por lo que en el residuo es de esperarse cantidades relativamente moderadas de este compuesto inorgánico, obteniendo un valor promedio de 3772.872 mg/L, lo cual si es comparado con las vinazas mezcaleras esta presenta valores más bajos, entre 308.3 841.7 mg/L (Robles-González, 2011).

También los altos niveles de sulfatos pueden afectar aún más el tratamiento y disposición de la vinaza (Colleran *et al.* 1995; Ranade *et al.*, 1999; Wilkie *et al.*, 2000).

Se ha estudiado que la presencia de elevadas concentraciones de sulfatos puede inhibir el proceso anaerobio, especialmente en la etapa de la metanogénesis. En concentraciones altas, las bacterias metanogénicas compiten con las sulfato-reductoras por los mismos sustratos (acetato e hidrógeno), el resultado de esta competición determinará la proporción de sulfhídrico y metano en el biogás producido (Martí, 2006).

#### VI.4.8. Conductividad eléctrica.

En cuanto a los valores de conductividad eléctrica se observa que estos son relativamente altos, lo cual indica que las vinazas del comiteco presentan un porcentaje alto de sales inorgánicas disueltas, así como también de sólidos totales disueltos ya que de la misma manera la conductividad está directamente vinculada con este parámetro, esta característica podría deberse a la utilización de aguas con altos contenidos de sulfatos, en la elaboración de esta bebida en la región. Así mismo estos valores obtenidos se asemejan a los obtenidos de las vinazas del mezcal obtenidas de manera industrial y artesanal encontrándose en un rango de (2.6-4.2 mScm-1), esto reportados por Duarte *et al.*, 1997.

**Tabla 6.**Características fisicoquímica de la vinaza

Parámetro	Resultados
pH	3.89±0.01
Densidad	1.00mg/ml ±
Acidez mg CaCO <sub>3</sub>	79.333 ± 4.907
Conductividad Eléctrica μS/cm	3.605± 0.0158
ST mg/L	62500mg/L± 2500
STV mg/L	62890.47±172.68
SD ml/L	105 ±7.07
SST	9190 ± 95.786
SD	62501.09 ± 92.63
SSTV	8971.66 ± 76.37
SS	100 ± 14.14
DQO mg O <sub>2</sub> /L	114599.63 ±2045.32
DBO mg/L	102.80
IDB	0.89
Humedad %	93.76±0.27
Cenizas %	7.11 ± 0.13
Nitrógeno total mg/L	2666.67
Fenoles mg ácido Gálico/ L	356.70± 5.29
Sulfato total mg/L	3772.87 ±102.042
Fosforo total mg/L	1033.33
Azúcares Reductores g/L	8.24 ±0.956
Sacarosa g/L	7.44±0.04
Glucosa g/L	3.02± 0.02
Ácido acético g/L	30.45±0.78
Etanol g/L	6.44±0.946
Fructosa	3.48 ± 0.17

## VI.5. Elección del inóculo

Muchos factores, como el sustrato y su concentración, tipo de reactor, inóculo, pH y temperatura pueden influenciar en la fermentación anaeróbica para la producción de biogás. (Wang *et al.*, 2008). La estabilización de los inóculos dependerá del origen y tipo de consorcios microbianos presentes en ellos, así como también de la composición del sustrato y las condiciones de operaciones del reactor (López *et al.*, 2000).

La identificación de las bacterias anaerobias es difícil ya que dentro de los consorcios, algunos grupos como las metanógenas hidrogenófilas y las productoras obligadas de hidrógeno, mantienen una estrecha relación fisiológica conocida como sintrofia. Por ello, su aislamiento es complicado, y se requiere de técnicas sofisticadas de la biología molecular, como es el uso de herramientas de inmunología (Macario *et al.*, 1986).

En este trabajo se utilizaron 2 tipos de inóculos; el estiércol de ganado y lodos anaerobios obtenidos de la empresa Coca Cola FEMSA, ubicada en la ciudad de Tlaxcala, México.

Para su estandarización los inóculos fueron alimentados en un reactor tipo Batch con vinaza del comiteco ajustado a pH 7 y pretratada a 70°C por 10 minutos, se midió la DQO antes de alimentar y cada tercer día después de la alimentación. Se tomó la DQO como el factor determinante. Estableciéndose como inóculo estandarizado cuando la desviación estándar de la remoción de la materia orgánica medida como DQO fue menor o igual al 10% de la remoción promedio de los días anteriores. Según Monroy (1992) menciona que para que un reactor anaerobio se considere estable es necesario que exista un ambiente que permita la mejor actividad de la biomasa y que el tiempo de retención de sólidos sea adecuado. Por ello después de alimentarse por 1 mes aproximadamente se consideró estable el reactor ya que la disminución de la DQO no era significativa (menos del 10%) y se inició el siguiente ciclo de alimentación con nuevo sustrato, hasta desplazar toda el agua residual inicial con un volumen igual, se repitió este mismo proceso hasta que la disminución de la DQO no fuera significativa y así sucesivamente.

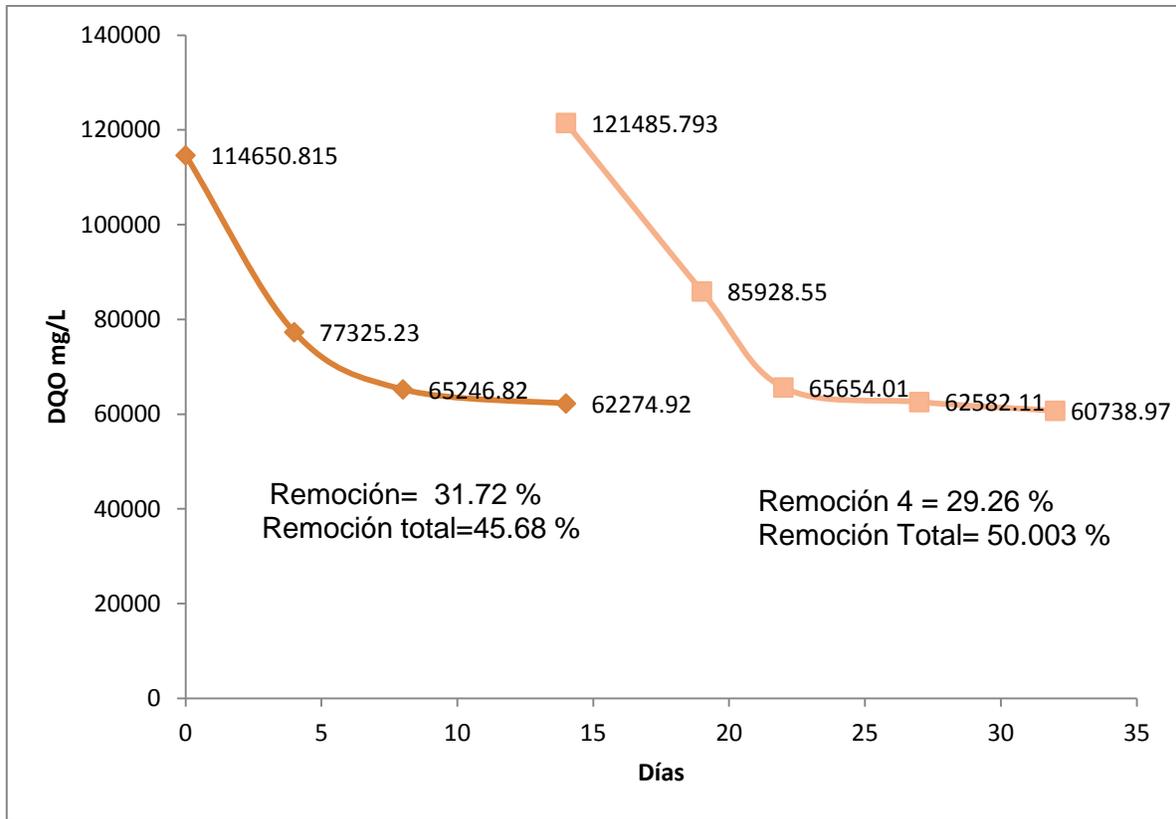
### VI.5.1. Adaptación del estiércol de ganado vacuno

En la figura 3 se observan los resultados de la DQO durante la adaptación de los lotes de estiércol de ganado alimentado con vinazas, sometidos a una digestión anaerobia en un reactor tipo batch, se logra apreciar fácilmente la disminución de la DQO en tiempos considerablemente largos, esto supone que los microorganismos difícilmente se estaban adaptando al sustrato, así también se aprecia en la figura que la mayor remoción de materia orgánica total alcanzada es del 50%, lo cual indica una deficiencia en la remoción de carga orgánica comparada con los lodos anaerobios de la planta de tratamientos de aguas residuales.

De tal manera que la adaptación resulta muy lenta y poco eficiente, esto puede deberse a que los microorganismos presentes en el rumen de ganado, no están acostumbrados al tipo de nutrientes presentes en la vinaza, estos microorganismos generalmente consumen los carbohidratos fibrosos como la celulosa y hemicelulosa que pueden representar la fuente más importante de energía para los rumiantes (Carrillo, 2003).

Dentro de los tipos de microorganismos que se encuentran en el rumen del ganado destacan las bacterias anaerobias estrictas: *Fibrobacter* y *Ruminococcus* son las bacterias celulolíticas más abundantes del rumen, que degradan xilano. *Fibrobacter* posee una celulasa periplásmica por lo que debe permanecer adherido a la fibrilla de celulosa mientras la digiere, en cambio *Ruminococcus* produce una celulasa que es secretada. Los *Ruminobacter* y *Succinomonas* amilolíticos se encuentran en minoría, así como *Lachnospira* que digiere pectinas. Los productos de fermentación de estas y otras bacterias son utilizados por otros microorganismos. El succinato se convierte en propionato y CO<sub>2</sub>, y el lactato es fermentado a acetato y otros ácidos por *Megasphaera* y *Selenomonas*. (Madigan *et al.*, 2003).

Debido a la ineficiente capacidad de remoción de la DQO, el estiércol de ganado no representó un inóculo adecuado.



**Figura 3.** Adaptación del inóculo estiércol de ganado

### VI.5.2. Adaptación de los lodos anaerobios

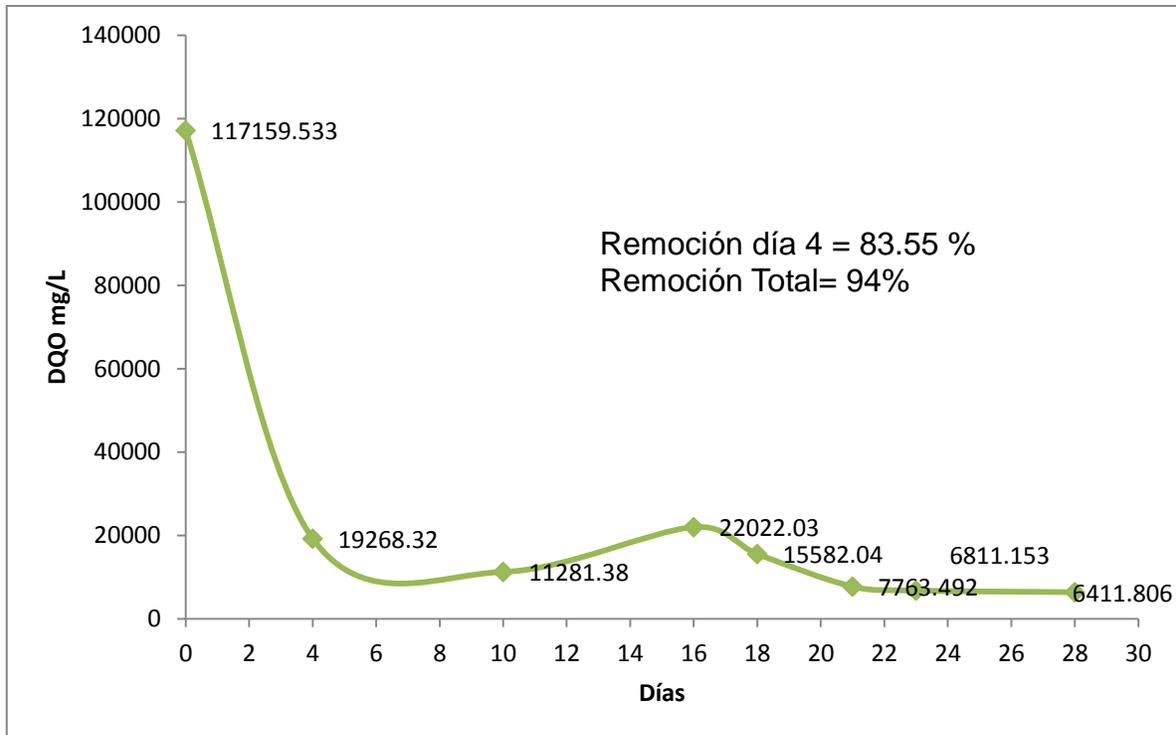
La adaptación de los lodos anaerobios, es apreciada en la figura 4, donde es notoria la eficiente remoción de la materia orgánica respecto al tiempo. En ella se aprecia que en los primeros días hay una disminución de la DQO muy drástica (83.5 % de remoción), lo que indica una remoción elevada de materia orgánica, después se aprecia un ligero incremento de la DQO indicando que el proceso se encuentra en la etapa donde se produce el ácido acético lo cual le confiere un pH bajo, para después convertirse en acetato favoreciendo la alcalinidad del sistema, y poder ser consumidas por las bacterias metanogénicas para finalmente producir metano (Borja, 1989). Es claramente apreciable que los lodos anaerobios ocasionaron una mayor remoción de materia orgánica, casi el doble de lo que removió el estiércol de ganado, en un tiempo menor y con una remoción total del 94%, por tal razón se eligieron a los lodos anaerobios como el inóculo más eficiente para la

remoción de la DQO, el cual sugiere una mayor degradación de materia orgánica y de manera indirecta probablemente mayor producción de biogás.

Una de las características que evidencia la mayor eficiencia de los lodos, es su morfología en forma de gránulos, lo cual permite adaptarse en un menor tiempo (Guiot *et al.*, 1992). En nuestro caso, los lodos presentaron morfología granular al provenir de una planta de tratamiento de una industria refresquera, estaban muy bien adaptados a aguas residuales ricas en azúcares, debido a ello la adaptación no tuvo mucha dificultad ya que nuestras vinazas presentaron concentraciones favorables de azúcares entre ellos destacó la sacarosa y la glucosa. Por ello la composición del sustrato, es uno de los factores importantes que influyen en la adaptación de un inóculo, ya que una concentración apropiada de sustrato puede incrementar la habilidad de las bacterias productoras de hidrógeno (Wang *et al.*, 2008). Por ello la importancia de contar con los nutrientes necesarios, éste último puede variar dependiendo del origen del agua residual, normalmente la concentración de éstos es muy baja, particularmente para el desarrollo de la biomasa anaerobia por lo que el crecimiento resulta excesivamente lento produciendo un arranque muy prolongado, debido a la baja producción de biomasa en relación al sustrato consumido, (López *et al.*, 2000).

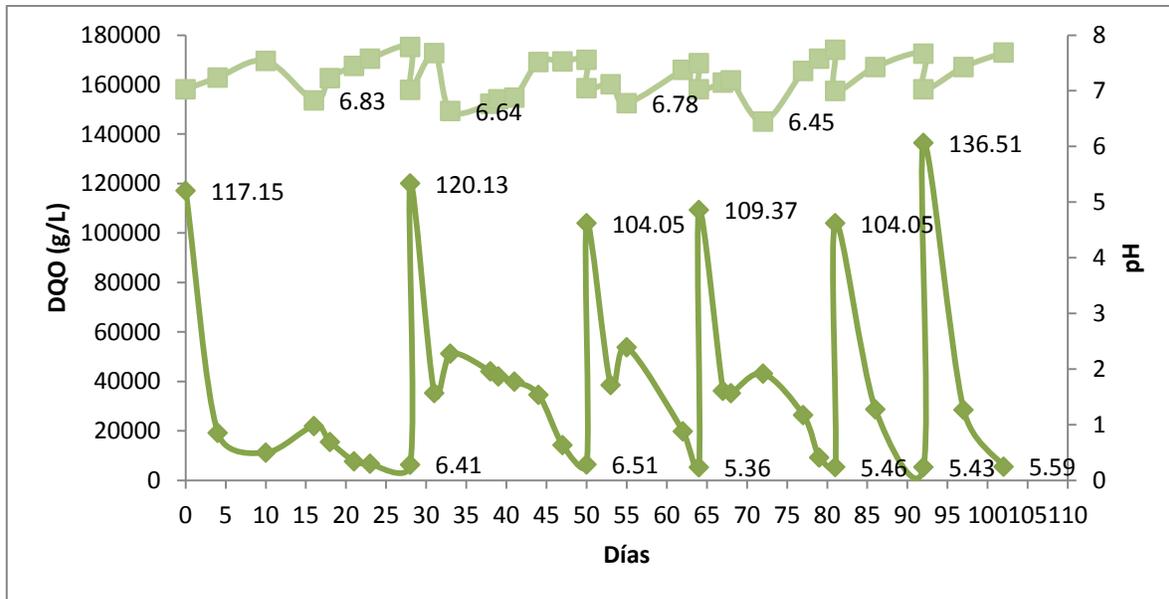
Las vinazas del comiteco utilizadas como sustrato, presentaron los nutrientes suficientes para llevarse a cabo la digestión anaerobia y garantizar la producción de biogás, medida indirectamente como DQO, dentro de los nutrientes favorables se encontraron alta carga orgánica DQO de  $114599.63 \pm 2045.32$  mgO<sub>2</sub>/L y DBO de 102800mgO<sub>2</sub>/L, son fuertemente ácidos pH  $3.89 \pm 0.01$ , contienen altas concentraciones ST  $62500$  mg/L  $\pm 2500$ , nitrógeno total  $2666.67$  mg/L y conductividad eléctrica de  $3.605 \pm 0.015$  mScm<sup>-1</sup>, fósforo total  $1033.33$  mg/L, estos valores son similares a los reportados por varios autores en estudios realizados en vinazas procedentes de la destilación de caña de azúcar y la destilación de alcohol de uva (Durán-de-Bazúa *et al.*, 1991; Jiménez *et al.*, 2006; García *et al.*, 1997).

La estabilización de los inóculos dependerá del origen y tipo de consorcios microbianos presentes en ellos, así como también de la composición del sustrato y las condiciones de operaciones del reactor. Este inóculo a su vez se utilizó para ser inoculado en un reactor UASB modificado para la producción de Biogás.



**Figura 4.** Adaptación del inóculo lodos anaerobios

En la figura 5, se presenta el seguimiento de la adaptación de los lodos anaerobios alimentados con vinazas en las condiciones ya antes mencionadas en un sistema de lote alimentado, monitoreadas durante 3 meses aproximadamente, en ella se pueden apreciar claramente las cuatro etapas que se llevan a cabo en una digestión anaerobia; durante los primeros 4 días se observa una disminución de la materia orgánica medida como DQO, lo que evidencia que la materia orgánica está siendo degradada por los microorganismos hidrolíticos presentes, a esta etapa se le conoce como hidrólisis, la primera etapa de la digestión anaeróbica, en ella los polímeros presentes como los polisacáridos, grasas y proteínas presentes en las vinazas, sufren una hidrólisis realizadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos acidogénicas o fermentativos, Autores como Hattingh *et al.*(1967), Kotzé *et al.* (1968) y Thiel *et al.* (1968) han establecido y medido la presencia de varias enzimas extracelulares como las celobiasas, las proteasas y las amilasas en digestores anaerobios.



**Figura.5.** Seguimiento de la adaptación de los lodos anaerobios

Esta primera etapa se llevó a cabo ya que la degradación anaeróbica de sustratos orgánicos complejos a materia orgánica soluble permite que los microorganismos puedan utilizarla para que fácilmente puedan a travesar la pared celular y así utilizarla para su metabolismo.

Así mismo la acidogénesis, la segunda etapa de la digestión anaeróbica, se aprecia en la en la figura 5 durante los 10 días siguientes, en ella es notorio un incremento leve de la materia orgánica medida como DQO, por lo que es de suponerse que se está incrementando la biomasa de los microorganismos y los productos obtenidos de la etapa anterior. Los productos finales de las poblaciones de bacterias en esta etapa son ácidos grasos saturados (ac. valérico), ácidos grasos volátiles (ac. propiónico, butírico y acético), lactato, etanol, formiato y bióxido de carbono. De todos los productos obtenidos el más abundante es el ácido acético y uno de los intermediarios más importantes según McCarty, *et al.*,(1963). Así también, en la misma gráfica se observa que cuando hay un incremento de materia orgánica, hay una disminución del pH, esto se le atribuyó a la producción de ácidos en esta etapa, llegando a un valor promedio de pH 6.5, lo cual puede provocar la inhibición de la digestión anaerobia si no se controla dicho parámetro (Ramírez, 1992).

En esta etapa tiene lugar el desarrollo de las bacterias metanogénicas y acetogénicas, las metanogénicas consumen el ácido acético, el fórmico y el hidrógeno, en tanto que las acetogénicas oxidan a los compuestos más reducidos (ac. propiónico, butírico, valérico,

láctico y etanol). Así mismo en esta etapa se lleva a cabo la degradación de la glucosa para formar ácidos orgánicos, la principal ruta de degradación que se lleva a cabo es la ruta de Embden-Meyerhof que tiene como principal intermediario el piruvato. En la figura 6 se observa un esquema de las rutas de Embden- Meyerhof que intervienen en la degradación de la glucosa hasta la obtención de ácido butírico, acético y ácido propiónico, la fermentación de azúcares se realiza por diversos tipos de microorganismos, en función de cada organismo, la ruta metabólica y los productos finales son diferentes, dentro de los principales microorganismos asociados a la degradación de la glucosa se encuentra el género *Clostridium*, el cual convierte la glucosa en ácido butírico, acético, dióxido de carbono e hidrógeno, durante la ruta de Embden- Meyerhof la glucosa se convierte en piruvato y el piruvato se convierte a Acetil-CoA Y CO<sub>2</sub>. El Acetil-CoA es reducido empleando como transportador de electrones el NADH derivado de la ruta de Embden-Meyerhof (Martí, 2006).

Por otra parte en el caso de la fermentación de los aminoácidos y de otras moléculas hidrogenadas se obtienen los ácidos grasos de cadena corta, dentro de las bacterias que llevan a cabo la fermentación se encuentran las proteolíticas, mayoritariamente se han identificado las del género *Clostridium*, aunque también se ha encontrado géneros como *Peptococcus* y *Bacteroides*.

En lo que se refiere a la tercera etapa (figura 5), es evidente el incremento de pH, debido a que el etanol y los ácidos grasos volátiles como valérico, butírico, propiónico y algunos compuestos aromáticos se transforman a productos más sencillos en acetato y H<sub>2</sub>, esto a través de las bacterias acetogénicas.

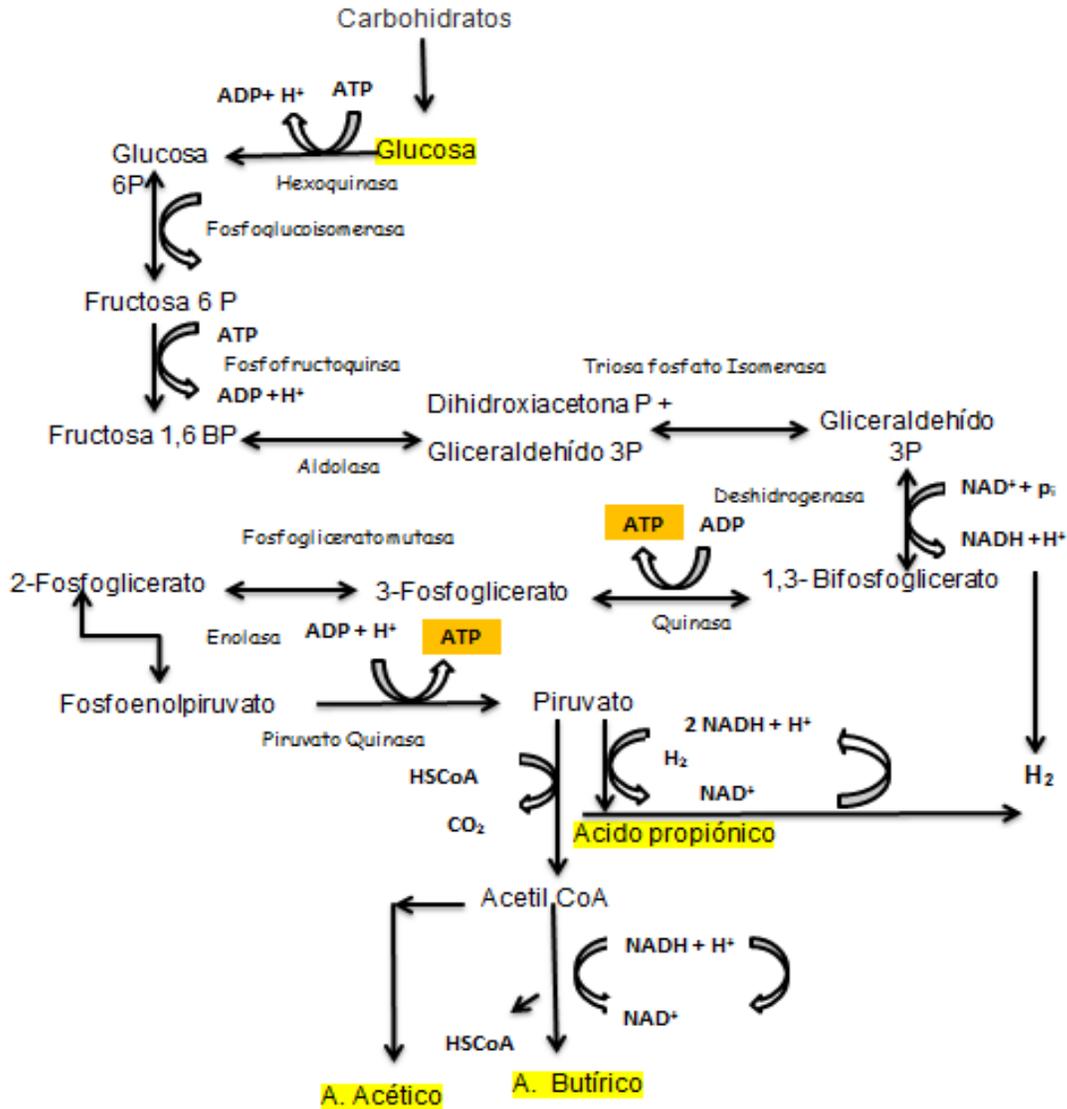
La acumulación de receptores de electrones tales como ácido láctico, propiónico, butírico, etanol y otros ácidos grasos volátiles (AGV) es la respuesta de las bacterias al incremento de la producción de hidrógeno en el sustrato. Estos productos pueden o no ser utilizados directamente por los microorganismos metanogénicos y deben ser degradados por las bacterias productoras de hidrógeno en el proceso denominado acetogénesis (Álvarez *et al.*, 1992; Bouallagui *et al.*, 2005).

Las bacterias acetogénicas son las responsables por lo tanto de la conversión de los compuestos receptores de electrones producidos en la etapa acidogénica, esta conversión es de mucha importancia para la exitosa producción de metano, debido a que los

microorganismos metanogénicos no lo pueden usar directamente, según Robles(2005), durante esta etapa se distinguen 3 tipos diferentes de poblaciones microbianas: A) Bacterias fermentativas, en un cultivo puro estas bacterias producen alcohol, acetato e hidrógeno y se caracterizan también en orientar su metabolismo hacia la producción privilegiada de acetato cuando la presión parcial de hidrógeno es baja. Estas poblaciones de igual manera participan en la etapa de la hidrólisis. B) Bacterias productoras de hidrógeno si la presión parcial de hidrógeno es baja, degrada a los AGV y los alcoholes a acetato, los principales géneros *Syntrophomonas* y *Syntrophobacter*, los cuales degradan primeramente el butirato, valerato y posteriormente degradan el propionato; el desarrollo de estas bacterias es lento. C) Bacterias homoacetogénicas, estas bacterias producen acetato como único metabolito, esto puede ser a partir de azúcares o a partir de la mezcla  $H_2/CO_2$ . Debido a la existencia de microambientes en el seno del medio de fermentación, los organismos formadores y consumidores de hidrógeno pueden coexistir.

En la figura 6, se observa que en esta etapa, se forma el acetato, el cual tiende a estabilizar el pH del sistema, además se nota claramente, a medida que se iba alimentando, la disminución de la DQO no presentaba valores significativos en tiempos cada vez más cortos, es decir la adaptación se estaba llevando de manera más rápida.

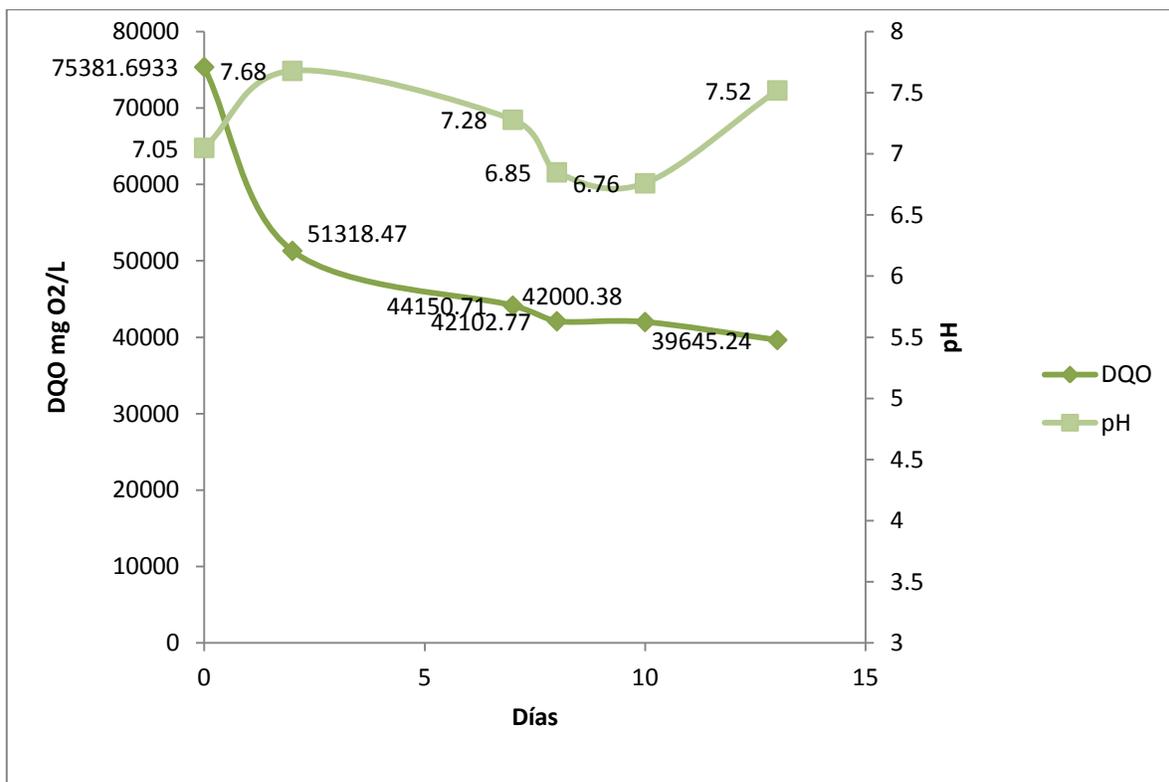
Estas cuatro etapas de la digestión anaeróbica se observan en las 6 alimentaciones que se realizaron, durante tres meses aproximadamente. Así mismo cabe mencionar que el  $CO_2$  es soluble en agua y reacciona con los iones hidroxilo para formar bicarbonato, los cuales actúan como sustancias amortiguadoras del sistema. La concentración de  $HCO_3$  es afectada por la temperatura, el pH y la presencia de otros materiales en la fase líquida (Bostid, 1977).



**Figura 6.** Simplificación de la ruta metabólica de Embden -Meyer de degradación de la glucosa por las bacterias metanogénicas (Martí, 2006).

Finalmente se encuentra la etapa de la metanogénesis, donde se lleva a cabo la producción de metano y dióxido de carbono a partir de un limitado número de compuestos (acético, metanol,  $H_2/CO_2$  y ácido fórmico) que actúan como sustrato para los microorganismos metanogénico (Archeas). En esta etapa final alrededor del 70% del metano es obtenido vía reacción de acético y el restante es a partir de la reacción de  $H_2/CO_2$ , los microorganismos metanogénicos consumen hidrógeno (Álvarez *et al.*, 1992; Bouallagui *et al.*, 2005).

En la figura 7 se presenta detalladamente el seguimiento de la DQO y el pH en la primera alimentación del reactor por lote alimentado utilizando los lodos anaerobios seleccionados y alimentados con vinazas, las cuales fueron monitoreadas cada tercer día, en ella se observa que a medida que la DQO disminuye, el pH aumenta ligeramente y disminuye cuando hay un incremento ligero de DQO, lo cual sugiere un incremento de biomasa por parte de los microorganismos que intervienen en la degradación de la materia orgánica compleja, permitiendo la formación de los ácido grasos volátiles. La disminución del pH en esta etapa es atribuida a la formación de los ácidos grasos volátiles que son los productos intermediarios mayoritarios del proceso anaerobio (Björnson *et al.*, 1997).



**Figura 7.** Remoción de la DQO respecto al pH

### VI.5.3. Morfología de los inóculos

#### VI.5.3.1. Lodos anaerobios

En la figura 8 se aprecia la morfología que presentaron los lodos anaerobios, estos presentaron una morfología globular con colores oscuros, lo cual genera un efecto de protección sobre las bacterias metanogénicas. Así mismo las bacterias fermentativas y acidogénicas facultativas que se encuentran en las primeras capas de los gránulos consumen el  $O_2$  presente, los anaerobios que se encuentran en el interior, como consorcio presentan gran resistencia a la presencia de  $O_2$  disuelto, en la figura 10, se aprecia de manera más detallada la estructura interna que presentan generalmente los lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales, producto de la concentración de sólidos contenidos en el efluente (lodos primarios), o de la formación de nuevos sólidos suspendidos (lodos activados) resultantes de los sólidos disueltos de las aguas residuales (Morales, 2005). Por otra parte estos lodos son compuestos orgánicos sólidos, semisólidos o líquidos producidos durante el proceso de tratamiento mecánico, biológico y/o químico de purificación de las aguas residuales (Marambio -Ortega, 2003).

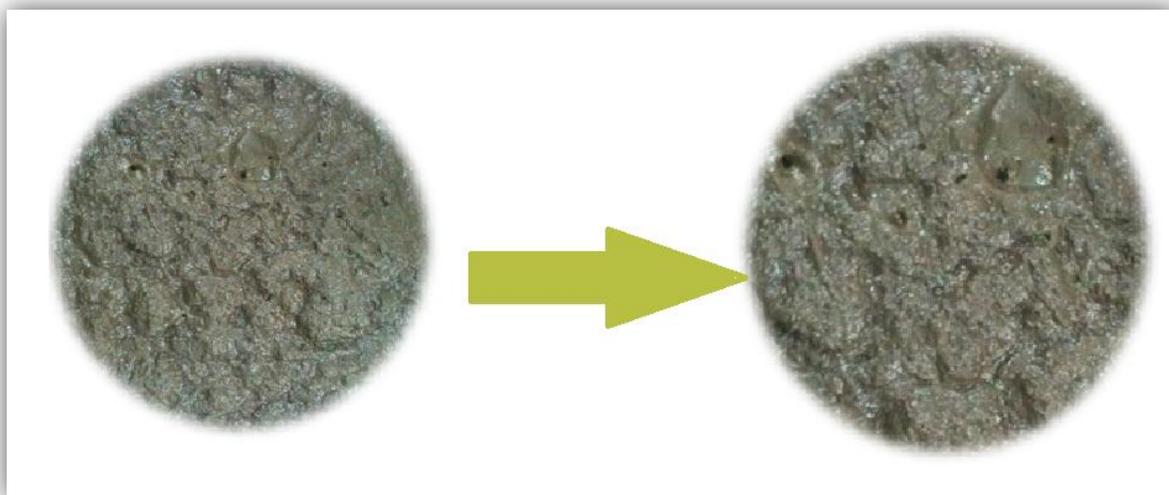


**Figura 8.** Morfología de los lodos anaerobios

### VI.5.3.2.Lodos del estiércol

En la figura 9 se observa la morfología que presentaron los lodos del estiércol de ganado vacuno, en ella se observó una morfología dispersa y flóculos dispersos, así mismo sus propias características físicas impidieron una fácil manipulación, el olor fue muy desagradable en los primeros días de muestreo, llegando incluso a contaminarse con gusanos y hongos en la parte superficial; características no favorables para ser seleccionado como inóculo en la remoción de la materia orgánica, medida como DQO.

Un aspecto deseable durante la estabilización de los lodos anaerobios, es la formación de gránulos o “pellets” con tamaños ideales entre 1 y 3 mm de diámetro. La formación de estos gránulos es una característica que distingue a los sistemas de fermentación metanogénica de flujo ascendente, de los otros sistemas anaerobios (Castro *et al*, 1999; López *et al* 2000). Sin embargo estas características no fueron observadas en dichos lodos, por lo anterior y tomando en cuenta su poca eficiencia de remoción de materia orgánica (medida como DQO), este lodo no fue elegido como inóculo.



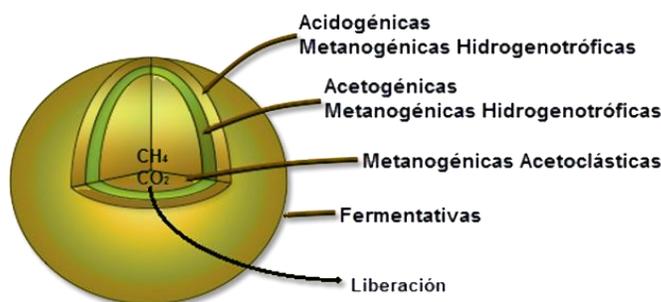
**Figura9.** Morfología de los lodos del estiércol

### VII.5.3.3. Estratificación de gránulos anaerobios

Con respecto a la estratificación de los gránulo anaerobios, Guiot *et al.* (1992) propusieron un modelo (figura 10) de la organización de poblaciones en los granos anaeróbicos estructurado en multicapas. En él, las asociaciones de bacterias sintróficas, incluyendo a las consumidoras de hidrógeno, deben estar localizadas en una capa externa en donde predominan las acidogénicas y en el centro se sitúan a las metanogénicas acetoclásticas.

La teoría de Guiot *et al.* (1992) se debió a observaciones bajo el microscopio electrónico, de granos fragmentados; así como también del análisis de actividades específicas de granos gastados gradualmente y por los cambios en la actividad específica metabólica con el tamaño de distribución y extensión del grano. Los granos pueden ser de 1 ó 2 milímetros de diámetro y pueden acumularse en el reactor en grandes cantidades, con una apariencia bien definida. Es posible que esto sea debido a la velocidad ascendente en los reactores UASB la cual crea una presión constante de selección para los organismos, los cuales pueden ser adheridos a otros o formar granos con buena sedimentación. La configuración granular presenta varias ventajas desde el punto de vista de la ingeniería de reactores como por ejemplo, los microorganismos.

Por lo general están densamente empacados; no hay espacio perdido en los soportes inertes; la esfericidad provee un máximo en la relación microorganismo y espacio; aunque la enorme densidad granular es equivalente a la densidad de cada célula bacteriana, estos muestran excelentes propiedades de sedimentación por su gran tamaño (Hulshoff Pol *et al.*; 1986).



**Figura 10.** Modelo estructural de un consorcio granular anaeróbico

## CAPÍTULO VII

---

## VII.- CONCLUSIONES

---

1.- La vinaza del comiteco es una fuente de nutrientes muy apta para ser tratada en una digestión anaerobia y producir biogás, ya que presenta un alto contenido de materia orgánica medida como DQO Y DBO<sub>5</sub>, esta relación da como resultado un índice de biodegradabilidad superior a 0,4, obteniendo un valor de 0.89, valor muy satisfactorio para su posible uso en la producción de Biogás.

2.- Los lodos anaerobios presentaron un porcentaje alto de remoción de materia orgánica del (94 %) y un tiempo de adaptación considerablemente inferior respecto al estiércol de ganado.

3.- Los lodos anaerobios adaptados a la vinaza, representan un inóculo eficiente debido a la a su morfología granular y a su capacidad de alta remoción de materia orgánica medida como DQO, por ello presenta un gran potencial para la producción de metano.

## CAPÍTULO VIII

---

## VIII.- RECOMENDACIONES

---

Para el aprovechamiento total de nutrientes en la digestión anaerobia se recomienda el estudio de los efluentes ya que podrían ser utilizados como fuente de nutrientes para los suelos agrícolas, debido a que presentan un menor porcentaje de materia orgánica y son aguas tratadas lo cual puede ser utilizado para este tipo de usos.

## CAPÍTULO IX

---

## IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

**Abdelhamid M.T., Horiuchi T. y Oba. S (2004).** Composting of rice straw with oilseed rape cake and poultry manure and its effects on faba bean (*vicia faba* L.) growth and soil properties. *Biores. Technol.* 93, 183-189.

**Acharya, B.K.; Mohana, S.; Jog, R.; Divecha, J.; Madamwar, D. (2010)** Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. *J. Environ. Manag.* **91**: 2019–2027.

**Ahring, B.K., Sandberg, M. and Angelidaki, I. 1995** Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, 559-565.

**Arizaga, S., Ezcurra, E., Peters, F., Ramirez & E. Vega (2000).** Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical Desert. *Flora Biology and Pollination Mechanisms. American Journal of Botany*, 1004-1010.

**AOAC (1990).** *Official methods of analysis*. 15a. ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, EUA. 11-18 pp.

**APHA (1992).** *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18a. ed. American Public Health Association, Washington, EUA. Secciones 5-8, 5 9.

**Baldasano, J.M. and Soriano, C. 2000** Emission of greenhouse gases from anaerobic digestion processes: comparison with other municipal solid waste treatments. *Water Science and Technology*, **41**, 275-282.

**Barrocal, V.; García-Cubero, M., González-Benito, G.; Coca, M. (2010)** Production of biomass by *Spirulina máxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnol.* **27** (6): 851–856

**Berger, A. (1915)** *Die Agaven*. Jena. PP 18

**Benitez, F.J., Real, F.J., Acero, J.L., Garcia, J., Sanchez, M., 2003.** Kinetics of the ozonation and aerobic biodegradation of wine vinasses in discontinuous and continuous processes. *J. Hazard. Mater.* 101 (2), 203–218

**Beltrán, F.J., García, J.F., Álvarez, P.M., 1999b.** b. Wine distillery wastewater degradation. 2. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (Ozone)-biological treatment. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3919–3929.

**Bhattacharya, S.K., Parkin, G.F., 1989.** The effect of ammonia on methane fermentation process. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61 (1), 55–59

**Björnsson, L., Mattiasson, B. and Henrysson, T. 1997** Effects of support material on the pattern of volatile fatty acid accumulation at overload in anaerobic digestion of semi-solid waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 640-644.

**Björnsson, L., Murto, M. and Mattiasson, B. 2000** Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 844-849.

**Borja, R.; Martín, A.; Maestro, R.; Luque, M.; Durán, M. (1993)** Improvement of the kinetics of anaerobic digestion of molasses by the removal of phenolic compounds. *Biotechnol. Lett.* 15: 311–316.

**Bouallagui H, Tauhami Y, Ben Cheikh R, Hamdi M. 2005.** Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetables wastes. *Process Biochem.* 40; 989-995.

**Bostid Report.** Methane Generation from Human, Animal, and Agricultural Wastes. National Academy of Sciences, Washington, 1977

**(Buhlert *et al.*, 1981).** Energy from cull fruit. Published by the American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan.

**Braun, B., Huber, P., Meyrath, J., 1981.** Ammonia toxicity in liquid piggy manure digestion. *Biotechnol. Lett.* 3, 159–164.

**Braun, R. (1982)** Anaerobic filter treatment of molasses distillery slops. *Water Res.* 16 (7), 1167–1171.

**Breitung, A.J. (1968).** The Agaves. The Cactus and Succulent Journal. Yearbook. PP 18

**Brunet M.J. 1999.** “Identificació i transport plasmàtic de les procianidines del vi”. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España.

**Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A. (1992)** Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewaters. *Phytochemistry*. **31**: 4125–4128.

**Castorena S.I., Escobedo R.M. y Quiroz A. (1991).** New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Can. J. Bot.* **69**, 1257-1264

**Cedeño C. M. (1995).** Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**, 1-11.

**Colleran, E., Finnegan, S. & Lens, P. 1995** Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**, 29–46.

**Champagnol F. 1984.** *Elements de physiologie de la vigne et de viticulture general*. Ed. Auteur, Montpellier, France

**Chauvet M y González R.L. 2008.** Biocombustibles y cultivos biofarmacéuticos: ¿oportunidades o amenazas?, *Cotidiano-Revista de la realidad Mexicana*. p.p.52-55.

**Cheng, J.J. 2009** *Biomass to Renewable Energy Processes*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.

**Chynoweth DP, Fannin KF, Srivastava VJ (1987)** Biological gasification of marine algae. In: Bird KT, Benson PH (eds), *seaweed cultivation for Renewable Resources* Elvieser Press, Amsterdam, 285-304.

**Colberg P., Young L. 1995.** *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Anaerobic degradation of nonhalogenated homocyclic aromatic compounds coupled with nitrate, iron, or sulfate reduction (Eds. Young L., Cerniglia, C.) Chapter 8, Wiley-Liss, Inc. (USA), pp. 307-330.

**Coombs J. (1900).** “The present and future of anaerobic digestion”. In *anaerobic digestion: a waste treatment technology*. Editado por wheatley, a critical reports on applied Chemistry. **31**, 93-138. Elsevier applied science LTD.

**Contreras, L. (2006)** Producción de biogás con fines energéticos. De lo histórico a lo estratégico. [Revista](#) futuros Volumen VI.

**CRT (2008)**. Consejo Regulador del Tequila. <http://www.crt.org.mx>. 06/11/2008.

**Demirbas, A, Demirbas, MF. 2003** Biomass and wastes: upgrading alternative fuels. *Energy Sources* 25, 317–29.

**Demirel, B. and Yenigun, O. 2002** Two-phase anaerobic digestion processes: A Review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **77**, 743-755. di Berardino, S., Costa, S., and Converti, A. 2000 Semi-continuous anaerobic digestion of a foodindustry wastewater in an anaerobic filter. *Bioresource Technology*, **71**, 261-266.

**Díaz, B.; Gomes, A.; Freitas, M.; Fernandes, E.; Nogueira, D.; González, J.; Moure, A.; Levoso, A.; Vinardell, M.P.; Mitjans, M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C.; 2011** Valuable polyphenolic antioxidants from wine vinasses. *Food Bioprocess Technol.* **1**:133–144.

**Díaz, M.J., Madejón, E., López, F., López, R., 2002.** Composting of vinasse and cotton gin waste by using two different systems. *Resour. Conserv. Recycl.* **34**, 235–248.

**Donoso, B., Carballa, M., Ruíz, G. 2009** Treatment of low strength sewage with high suspended organic matter content in an anaerobic sequencing batch reactor and modeling application, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol 12, núm 3, Julio, 2009, 1-10.

**Duran-de-bazua C., Zámamo-Pére A.H. y Zedillo-Ponce-de-León L.E. (1991a).** Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria alcoholera. Informe Técnico VIN-01-91. Facultad de Química UNAM.

**Duran-de-bazua C., Noyola A., Poggi-varaldo H. Y Zedillo-Ponce-de-León L.E. (1991b).** Biodegradation of process industry wastewater. Case problem: sugarcane industry. In *Biological process of wastes*. (A.M. Martin, ed.) Elsevier Appl. Sci. Londres, Inglaterra.

**Duarte, E., Martins, M., Carvalho, E., Costa, S., Spranger, I. 1997.** An integrated approach for overcoming the environmental impacts of wineries wastewaters a Portuguese case study. In: *Proceedings of International Symposium of the vine and wine*, 07-10 October, Yangling, China, 1-5.

**Escamilla-Alvarado, C.; Vazquéz-Barragan, J.; Ponce-Noyola, M.; Poggi-Varaldo, H. (2011)** A novel biorefinery approach for biofuels and holocellolytic enzymes production

from organic wastes. Battelle International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. Reno NV, USA, June 27-31.

**Espinoza-Escalante, F.; Pelayo-Ortíz, C.; Navarro-Corona, J.; González-García, Y.; Bories, A.; Gutiérrez-Pulido, H. 2000** Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: the effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass Bioenergy* **33**: 14–20.

**Ezeonu FC, 2002** Nigerian journal of Energy, 53 – 57.

**Ferreira, L.; Aguiar, M.; Pompeu, G.; Messias, T.; Monteiro, R. 2010** Selection of vinasse degrading microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1613–1621.

**Ferreira, S. E.; Montenegro, O. A. 1987.** Efeitos da aplicacao da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. *Boletín Técnico COPERSUCAR (Brasil)*, **36**, 1-7.

**Fox, P. y Pohland, F.G. 1994** Anaerobic treatment applications and fundamentals: substrate specificity during phase separation. *Water Environment Research*, **66**, 716-724.

**García- Mendoza, A. 2003** Distribución del género Agave (Agavaceae) en México. *Boletín Amaranto Mayo/ Agosto* n°2.

**García-Mendoza, A. J. 2012** México, país de magueyes. Suplemento "La Jornada del campo". *La Jornada*, sábado 18 de febrero del 2012, **53**, 4. Versión electrónica

**García, J.L., Patel, B.K.C. and Ollivier, B. 2000** Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*, *Anaerobe*, **6**, 205-226.

**García M.A. y Chiang F. 2003** The confusion of Agave<sup>54</sup> vivipara L. and A. angustifolia Haw, *Brittonia*. **55**, 82-87.

**García, G.I., Bonilla, J.L., Jiménez, P.R., Ramos, E., 1997.** Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Water Res.* **31** (8), 2005–2011.

**Gentry, H.S. 1972** The Agave family in Sonora. *Agriculture Handbook* n° 399, Washington D.C.

**Gentry, H.S. 1982** Agave of Continental North America, Univ. Arizona press. Tucson.

**Gijzen, H.J. 2001** Anaerobes, aerobes and phototrophs, a winning team for wastewater management. *Water Science and Technology*, 44, 123-132.

**Golueke C.G. y Díaz L.F. 1996** Historical Review Of Composting and its role in municipal waste management. En: *The science of composting, part 1.* (M. de Bertoldi, P. Sequi, B. Lemmes T. Papi, Eds.) Blackie Glasgow, pp. 3-14.

**Godshall M.A. 1999** Removal of colorants and polysaccharides and the quality of white sugar. En: *Proceedings of the 6th International Symposium of the Association Andrew van Hook (AvH).* Marzo 25, 1999. Reims, Francia, pp. 28–35.

**Gloria, N.A. DA; Orlando Filho, J. 1983.** Aplicacao da vinhaça como fertilizante. *Boletín Técnico PLANALSUCAR (Brasil)* v.5 no.1, p.5-38.

**Grayum,M.H. 2006** Manual de plantas de Costa Rica.  
<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/treal/agave.shtml>

**Guiot, SR; Pauss, A y Costerton JW. 1992** A structured model of the anaerobic granule consortium. *Wat. Sci. Tech.* 25, 7, 1-10.

**Hamoda, M.; Kennedy, K. 1986** Anaerobic treatment of beet waste in a stationary fixed-film reactor. *Agric. Wastes.* 17 (3), 175–187.

**Harada, H.; Uemura, S.; Chen, A.C.; Jayadevan, J. 1996** Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by thermophilic UASB reactor. *Bioresour. Technol.* 55:215–221.

**Hashimoto G, Varriell H,** Factors affecting methane yield and production rate. American Society of Agricultural Engineers (ASAE). St Joseph, ML:49085. <http://www.usaid.gov/stores/Srilanka/biogas.Htm>, 1978, 68.

**Hattingh, WHJ; Kotzé, JP; Thiel, PG; Toerien, DF y Sieberie, MI. (1967).** Biological changes during the adaption of an anaerobic digester to a synthetic substrate. *Water Research*, 1, 255.

**Herrera, N. y Díaz, I.,**“Los residuales de la industria alcoholera como fuente de sustrato para la producción de proteína unicelular.” *Centro Azúcar*, N° 3, 16-19. (1994)

**Hulshoff Pol;L; van de Worp, JJM; Lettinga, G y Beverloo, WA. (1986)** Physical characterization of anaerobic granular sludge. In: Proc. Of the NVA-EWPCA Conf On Water Treatment: Anaerobic Treatment, a Grown-up Technology. The Netherlands 89-101.

**Irish, M.& G.Irish. 2000** Agaves, Yuccas & Related plants. A gardener's guide. Timber press. Portland. Oregon

**Jiménez, A.; Borja, R.; Martín, A.; 2003** Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. *Process Biochem.* 38:1275–1284.

**Jiménez, A.M., Borja, R., Marín, A., Raposo, F., 2006.** Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. *J. Environ. Manag.* 80 (4), 303–310.

**Juárez-Sánchez, L. 2007** “¿Cómo llega México a la era de los agrocombustibles?” en *Trabajadores*. [En línea] número 62, noviembre-diciembre 2007, pp. 2-9, disponible en: [http://www.uom.edu.mx/rev\\_trabajadores/pdf/63/63\\_Laura\\_juarez.pdf](http://www.uom.edu.mx/rev_trabajadores/pdf/63/63_Laura_juarez.pdf).

**Kahraman, S.; Yesilada, O.; 2001** Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi. *Folia Microbiol.* 46(2):133–136.

**Kalavathi D.F., Uma L. y Subramaniam G. 2001** Degradation and metabolization of the pigment–melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme Microb. Tech.* 29, 246–251.

**Kayhanian, M., 1994.** Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59, 349–352.

76

**Kelleher, B.P., Leahy, J.J., Henihan, A.M., O'Dwyer, T.F., Sutton, D., Leahy, M.J., 2000** Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Bioresour. Technol.* 83, 27–36.

**Kirchoff, P. 1943** Mesoamérica. *Acta Americana*, 1:92-107.

**Kotze, JP; Thiel, PG; Toerien, DF; Hattingh, WHJ y Silbert, ML. 1968.** A biological-chemical study of several anaerobic digesters *Water Research*, 2, 195.

**Kuskoski E., Asuro A, Troncoso A., Fett R., Mancini-Filho J. 2005** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Sevilla, ES.

**Lara.C. 2013** Diseño de una bebida espirituosa utilizando mieles de Agave americana L. y una cepa de levadura autóctona. 75.

**Lay, C.; Wu, J.; Hsiao, C.; Chang, J.; Chen, C.; Lin, C. 2010** Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*. 35(24): 13445–13451.

**Lema, J.M. and Omil, F. 2001** Anaerobic treatment: a key technology for sustainable management of wastes in Europe. *Water Science and Technology*, 44,

**Lepistö, S. S. and Rintala, J. A. 1997**, Start-up and Operation of Laboratory-Scale Thermophilic Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors Treating Vegetable Processing Wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68: 331–339

**Lettinga G. 2001** Digestion and degradation, air for life. *Water Science and Technology* 44 (8), 157-176.

**Lettinga, G. 1995** Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3-28.

**Lettinga, G., Hulshoff Pol, L.W., Koster, I.W., Wiegant, W.M., De Zeeuw, W.J., Rinzema, A., Grin, P.C., Roersma, R.E. and Homba, S.W. 1984** High-rate anaerobic wastewater treatment using UASB reactor under a wide range of temperature conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2, 253-284.

**Lin, C.Y. 1993** Effect of heavy metals on acidogenesis in anaerobic digestion. *Water Research*, 27, 147-152.

**Lin, C.Y. 1992** Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Water Research*, 26, 177-183

**Lo, K.V., Liao, P.H., 1985.** High-rate anaerobic digestion of screened dairy manure. *Journal of Agricultural Engineering Resources*, 349.

**Lobalto, José G.,** *Estudio químico industrial de varios productos del maguey mexicano y análisis químico del aguamiel y el pulque*, Oficina tipográfica de la secretaría de fomento, México, 1984.

**Lock, G.W.**, (1969) *Sisal*. Tanganyica Sisal Growers Assoc. London 2<sup>nd</sup> Ed.

**López, J.; Morgan, J.; y A. Noyola. (2000)** Arranque de reactores anaerobios industriales dos casos de estudio. En: “Memorias de XII Congreso de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias.

Ambientales” (FEMISCA).

**Loyola Montemayor, Elías, La industria del pulque**, Banco de México, México, 1956.

**Luna, N., Bedolla, E. y Valdés, Z.**, “Constituyentes y propiedades químico físicas de las vinazas de destilerías cubanas.” Informe interno. (1990).

**Lucas, M.; Peres, J.; Puma, G. 2010** Treatment of winery wastewater by ozonebased advanced oxidation processes (O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/UV and O<sub>3</sub>/UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in a pilotscale bubble column reactor and process economics. *Sep. Purif. Technol.* 72: 235–241.

**Macario, A. J. L., Conway De M. E. 1985** Monoclonal antibodies of predefined molecular specificity for identification and classification of methanogens and for probing their ecologic niches. In: *Monoclonal Antibodies Against Bacteria*. Vol. I. Academic Press, USA.

**Maciel Álvarez I. Carlos, 2009.** Biocombustibles: desarrollo Histórico –Tecnológico, mercados actuales y comercio internacional.

**Madejón, E.; López, R.; Murillo, J.; Cabrera, F.; 2001** Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agric. Ecosyst. Environ.* 84:55–65.

**Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003** *Brock Biology of Microorganisms*. 10<sup>o</sup> ed. Prentice Hall, Upper Saddle River,

**Marambio, C. Y Ortega, R. 2003** Uso potencial de lodos derivados del tratamiento de aguas servidas en la producción de cultivos en Chile. *Revista Agronomía y Forestal UC* 20.

**Martí O.N. 2006** Phosphorus precipitation in anaerobic Digestion Process. Boca Raton, Florida. USA.

**Martín, M.A., Raposo, F., Borja, R., Martín, A., 2002.** Kinetic study of anaerobic digestion of vinasse pretreated with ozone, ozone plus ultraviolet light, and ozone plus ultraviolet light in presence of titanium dioxide. *Process Biochem.* 37, 699–706.

**Marchain, U., and Cride, J. 1992** En: (D.L. Wise, ea) Fuel gas production from biomass, Vol 1, CRC Press, boca Raton, FL.,pp. 95-120.

**Mata –Alvarez J, Cechi F, Llabrés P. 1992.** Anaerobic digestion of the Barcelona central food market organic wastes: experimental study. *Bioresour Technol.*; 86; 85-89.

**Maynard A.A. 1994** Seventy years of research on waste composting and utilization at the Connecticut Agricultural Experimental Station. *Compost Sci. Utilizat.* 2, 213-221.

**McCarty, PL; Jerk, JS y Murdoch W. 1963** Individual volatile acids in anaerobic treatment. *J. Wd. Polluf. Control Fed* 35: 150 1.

**McLeod M.N. 1974.**Plants tannins; their role in forage quality.*Nutrition Abstracts and Reviews*, 44: 803-815.

**Mejia Sánchez G,M. 1996.**Digestión anaerobia. Primera Edición, Universidad Autónoma de Yucatán, 49

**Moletta, R. (2005)** Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 51 (1): 137–144.

**Morimura, S.; Kida, K.; Nakagawa, M.; Sonoda, Y. 1994** Production of fungal protein by *Aspergillus awamori* var. kawachi grown in Shochu distillery wastewater. *J. Ferment. Bioeng.* 78 (2): 160–163.

**Mohanakrishna, G.; Mohan, S.; Sarma, P. 2010** Bio-electrochemical treatment of distillery wastewater in microbial fuel cell facilitating discoloration and desalination along with power generation. *J. Hazard. Mater.* 177: 487–494.

**Morales Rojo Paola Mariel 2005.** Digestión Anaerobia de Lodos de Plantas de Tratamiento de Aguas y su aprovechamiento. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Química con área en Ingeniería Ambiental. Universidad de las Américas Puebla.

**Muñoz-Páez, K.; Ríos-Leal, E.; Valdez-Vazquez, I.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H. 2011** Re-fermentation of washed spent solids from batch hydrogenogenic fermentation for additional production of biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *J. Environ. Manage.*, in press.

**Nandy, T., Shastry, S., Kaul, S.N., 2002.** Wastewater management in cane molasses distillery involving bioresource recovery. *J. Environ. Manage.* 65, 25–38

**Nitayavardhana, S.; Khanal, S.K. 2010** Innovative biorefinery concept for sugarbased ethanol industries: production of protein-rich fungal biomass on

Nandy, T.; Shastry, S.; Kaul, S.N. (2002) Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. *J. Environ. Manage.* 65 (1): 25–38. vinasse as an aquaculture feed ingredient. *Bioresour. Technol.* 101 (23): 9078–9085.

**Nonn, Alain. (1990).** “Purification of 4,4'-dihydroxybiphenyl via its diacetate”. *Eur. Pat. Appl* 4

**Nuissier O., Ducrocq V., Ricard D., Lebeaupin C., Anquetin S., 2008.** A numerical study of three catastrophic precipitating events over southern France. I: Numerical framework and synoptic ingredients. *Q. J. R. Meteorol. Soc.*, 134: 111-130.

**Nyns, E.J. 1986** Biomethanation processes. In: Schonborn W. (ed), *Microbial Degradations*, 18, 207-267.

**Ofoefule, Akuzuo U et al Adv. Appl. Sci. Res.**, 2010, 1 (2):1-8

**Orlando, F.J.; Leme E.J. 1984** Utilizacao agrícola dos residuos da agroindustria canavieira. Simposio sobre Fertilizantes na Agricultura Brasileira. En simposio sobre fertilizantes na Agricultura Brasileira. Brasil, 451-475.

**Pant, D. & Adholeya, A. 2007** Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresource Technol.* 98, 2321–2334.

**Pérez, M.; Romero, L.I.; Sales, D.; 1997** Thermophilic anaerobic degradation of distillery wastewater in continuous-flow fluidized bed bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 13: 33–38.

**Poggi-Varaldo, H.; Carmona-Martínez, A.; Vázquez-Larios, A.; Solorza-Feria, O. 2009** Effect of inoculum type on the performance of a microbial fuel cell fed with spent organic extracts from hydrogenogenic fermentation of organic solid wastes. *J. New Mater. Electrochem. Syst.* 12: 49–54.

**Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Kusum Lata, and Kishore, V.V.N. 2000** State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 135-156.

**Ramírez, F. (1992). Degradación anaerobia de acetamida.** Tesis de Maestría en Biología Experimental. UAM-Iztapalapa.

**Ribéreau-Gayon R. 1964.** Les composés phenoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides. *Annales de Physiologie Vegetale*, 6: 211-242.

**Robertiello, A. 1981** Upgrading of Agricultural and Agroindustrial Waste: The treatment of distillery effluents (vinasse) in Italy. *Agriculture Waste* 4:387-395.

**Robles-González V., Villalobos-Castillejos F. 2011** Vinazas Mezcaleras: Un problema de contaminación ambiental Robles

**Robles-González, V.; López-López, E.; Martínez-Jerónimo, F.; Ortega-Clemente, A.; Ruiz-Ordaz, N.; Galíndez-Mayer, J.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H. 2010** Combined treatment of mezcal vinasses by ozonation and aerobic biological post-treatment. *Proceedings of 14th International Biotechnology Symposium*. Rimini, Italy, 14–18, September 2010 in CD ROM.

**Robles-González, V. 2011** Integrated treatment of mezcal vinasses for depuration and discharge. Doctoral Thesis. ENCB del IPN. México D.F., México.

**Rodella, A.; Ferrari S. 1977** A composição da vinhança e efeitos de sua aplicação como fertilizante na cana-de-açúcar. *Brasil Açucareiro* 90 (1): 6-13.

**Rodella, A.; Parazzi, C.; Cardoso, A. 1981** A composição da Vinhaca. *Brasil Açucareiro* 97(1): 25-33.

**Ruiz, C.; Torrijos, M.; Sousbie, P.; Martinez, J.L. and Moletta, R.** The anaerobic SBR process: basic principles for design and automation. *Water Science and Technology*, 2001, vol. 43, no. 3, p. 201-208.

**Ruiz N., Ruiz J., Castañón J., Hernández E., Cristiane E., Galíndez J.** *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43: 19-25, 2001.

**Rufián-Henares, J.A.\*; Morales F.J. 2007** Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40, 995-1002.

**Sales, D.; Valcárcel, M.; Martínez de la Osa, E.; Pérez, L. 1987** A depurative process for wine distilleries wastes. *Process Biochem.* 22: 85–99.

**Sangave, P.C.; Gogatea, P.R.; Pandit, A.B.; 2007** Ultrasound and ozone assisted biological degradation of thermally pretreated and anaerobically pretreated distillery wastewater. *Chemosphere* 68 (1): 42–50.

**Saunders, M., Lewis, P. and Thornhill, A. (2000)** Research methods for business students. 2nd edition. Harlow: Pearson Education

**Sekiguchi, Y., Kamagata, Y. and Harada, H. 2001** Recent advances in methane fermentation technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 277-282

**Shafizadek, F.; Forneaux, R.H.; Y Stevenson, J. T. 1979** Some reactions of levoglucogenone. *Carboh. Res.* 17-169. pp 80

**Shivayogimath, C.; Ramanujam, T. 1999** Treatment of distillery spentwash by hybrid UASB reactor. *Bioprocess Biosystems Eng.* 21 (3): 255–259.  
Speece 1987 pp 36

**Sirianuntapiboon S., Somchai P., Ohmomo S. y Atthasampunna P. 1988** Screening of filamentous fungi having the ability to decolourize molasses pigments. *Agric. Biol. Chem.* 52, 387-392. pp 81

**Subirós, R, F. 2005** El cultivo de la caña de azúcar. Vinazas. Editorial :Universidad estatal a distancia. San José costa Rica. Pag 362-364.

**Speece, R. E. 1987** Nutrient Requeriments. En: *Anaerobic digestion of biomass*, ed. Chynoweth y Isaacson. Elsevier applied science.

**Tauk, S.M. 1982** Culture of candida in vinasse and molasses: effect of acid and salt addition on biomass and raw protein production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16: 223–227.

**Thiel, PG; Toerien, DF; Hattingh, WHJ; Kotzé, JP y Siebert ML. 1968** Interrelations between biological and chemical characteristics in anaerobic digestion. *Water Resemch* 2, 391.

**Valdez-Vazquez, I.; Ríos-Leal, E.; Muñoz, K.; Carmona, A.; Poggi-Varaldo, H.M.; 2006.** Effect of inhibition treatment, type of inocula and incubation temperature on batch hydrogen production from organic solid wastes. *Biotechnol. Bioeng.* 95(3):342–349.

**Vavilin, V.A.; Fernandez, B.; Palatsi, J. and Flotats, X. 2008** Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management* 28, no. 6, p. 939-951.

**Vázquez-Larios A.L. Solorza-Feria O., Poggi-Varaldo H.M, 2010** Efecto del tipo de inóculo sobre el desempeño de una celda de combustible microbiana. *Energías Renovables Biológicas–Hidrógeno-Pilas de Combustible-II* Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional 84-85

**Vlissidis, A. & Zouboulis, A. I. 1993** Thermophilic anaerobic digestion of alcohol distillery wastewaters. *Bioresour. Technol.* 43(2), 131–140.

**Wang J, Wan W. 2008** The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Sci China Ser B-Chem*, 51, 1110-1117.

**Wiegant, W.H. and Zeeman, G. 1986** *Agric. Wastes* 16:243-253.

**Wienk, J.F. 1976** *Sisal and relatives*. In *evolution of crop plants*. Edited by N.W. Simmonds. Longmans. London, 1-4.

**Wilkie, A. C., Riedesel, K. J. & Owens, J.M. 2000** Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass Bioenergy* 19, 63–102.

**Wheatley A, editor.** *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology*. Elsevier Science Publishers Ltd, Barking, Essex, 1990. cap. 1, 5

**Yenigun, O., Kizilgun, F. and Yilmazer, G. 1996** Inhibition effects of zinc and copper on volatile fatty acid production during anaerobic digestion. *Environmental Technology*, 17, 1269- 1274.

**Zehnder AJB, Stumm W 1988** Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In: Zehnder AJB (ed) Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & Sons, New York, p 1–38.

**Zhang, Z.; Kuan, Y.; Joo, H.; David, T.; Duu, J.; Wen, J. 2006** Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. Process Biochemistry. 41: 2118–2123.

**Zhang J, Tang Y, Song C y Zhang J. 2009** Journal of Power Sources, 12, 163.

**Zoutberg, G.R. y de Been.P. 1999** The Biodied EGSB (Expanded granular sludge bed) System Covers Shortcomings of the upflow anaerobic sludge blanket reactor in the chemical industry. Wat. Sci.Technol. 35(10).183-188.

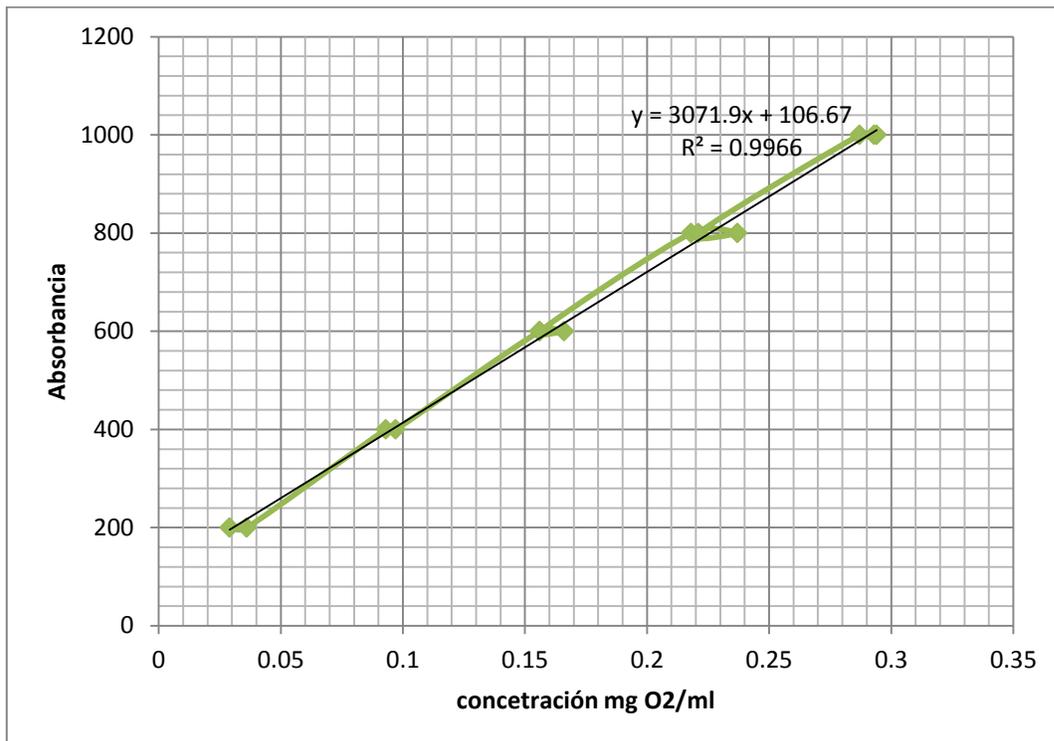
# CAPITULO X

---

# X. ANEXOS

---

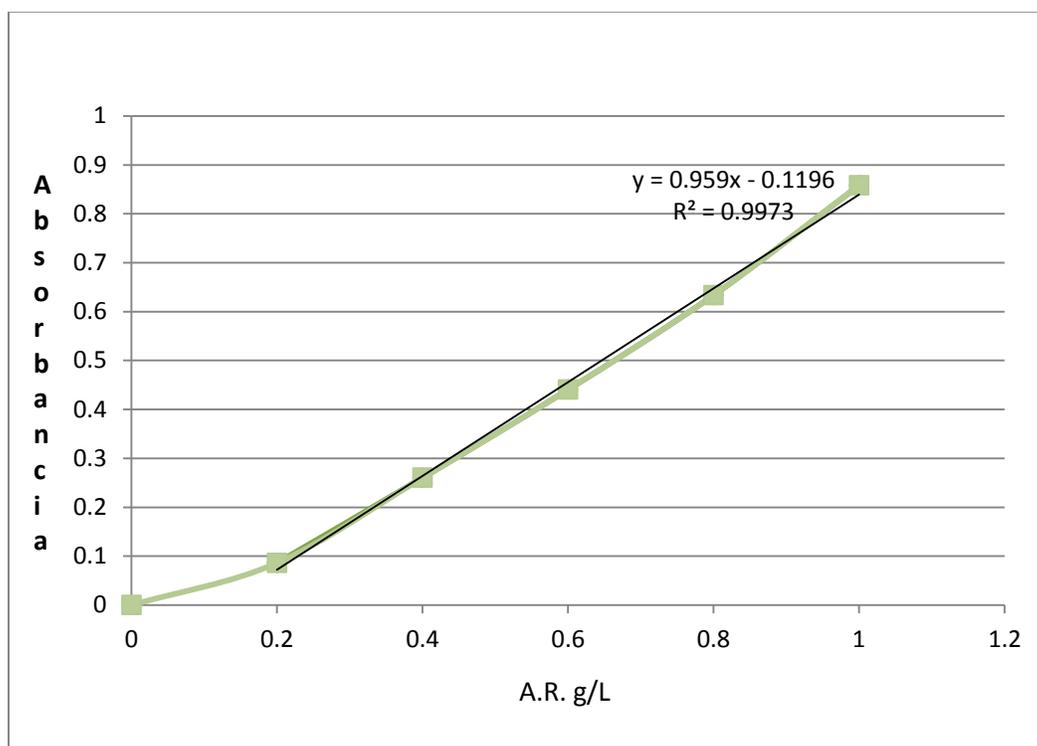
ANEXO 1. Curva estándar para la determinación de DQO, según el método propuesto en la NMX-AA-030-SCFI-2001, en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.



Según la ecuación de la recta, la fórmula para la determinación de la DQO es la siguiente:

$$(\text{mgO}_2/\text{ml}) = (3071.9 * \text{abs} + 106.67) * \text{Factor de la disolución}$$

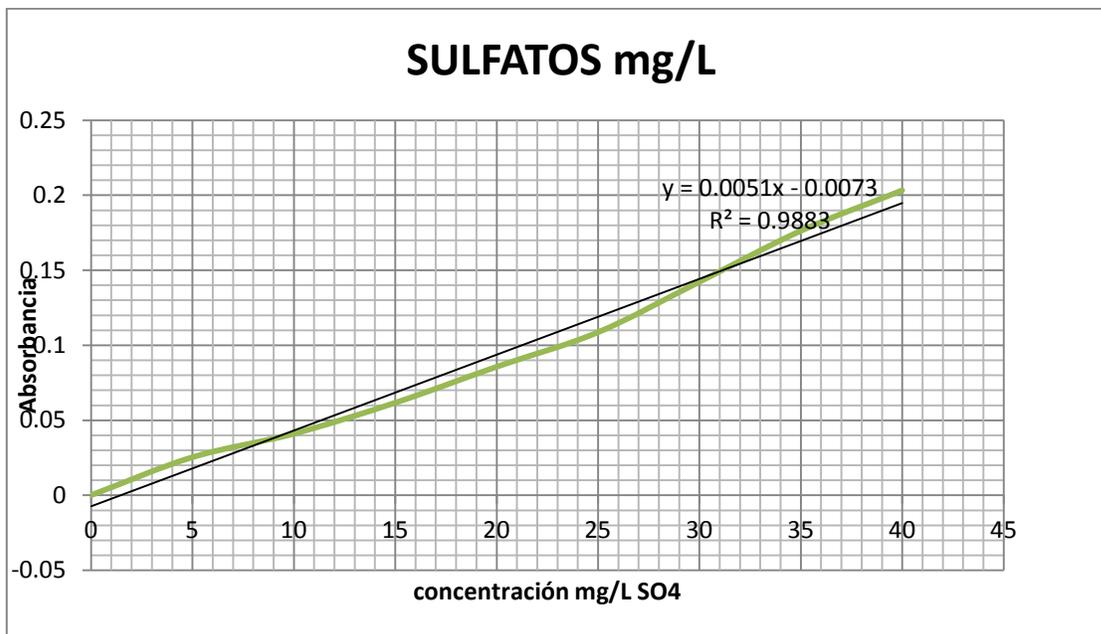
ANEXO 2. Azúcares totales, se llevó a cabo una curva de calibración aplicando la técnica de Miller DNS (ácido dinitrosalicílico).



Según la ecuación de la recta, la fórmula para la determinación de los azúcares reductores es la siguiente:

$$(g \text{ de A.R./L}) = (0.959 * \text{abs} - 0.1196) * \text{Factor de la disolución de la alícuota.}$$

ANEXO 3. Curva estándar para la determinación de sulfatos, según el método propuesto en la NMX-AA-074-1981, para análisis de aguas.



Según la ecuación de la recta, la fórmula para la determinación de sulfatos es la siguiente:

$$(\text{mg SO}_4/\text{L}) = (0.0051 * \text{abs} - 0.0073) * \text{Factor de la disolución de la alícuota}$$