



"Enseñar la explotación de
la tierra, no la del hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**POSGRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y
USO INTEGRAL DEL AGUA**

**POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO
DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*) EN CO-DIGESTIÓN
CON ESTIÉRCOL VACUNO EN MICROCOSMOS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y
USO INTEGRAL DEL AGUA**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

DAVID EMMANUEL SOLÍS CRUZ

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2015.



**POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*)
EN CO-DIGESTIÓN CON ESTIÉRCOL VACUNO EN MICROCOSMOS.**

Tesis realizada por el C. David Emmanuel Solís Cruz, bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

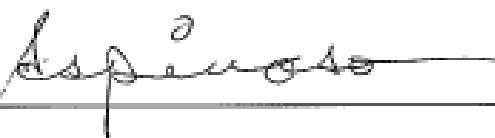
**MAESTRO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA
CON ORIENTACIÓN EN USO INTEGRAL DEL AGUA**

DIRECTOR:



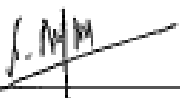
DRA. GUADALUPE HERNÁNDEZ EUGENIO

CO-DIRECTOR:



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESOR:



DR. NAGAMANI BALAGURUSAMY

DEDICATORIA

Con infinito amor y cariño a mis padres Rigoberto Solís Ramírez y Guadalupe Cruz Cancino. Por estar siempre conmigo en todo momento, por todos sus consejos y cuidados; ser mis mejores amigos con quienes hablar, llorar, y esforzarnos juntos por superar las pruebas de vida. Por estar al pendiente de mí y sobre todo por alentarme a ser una persona mejor tanto física, ética, moral, sentimental así como profesionalmente, pues gracias a ustedes he cumplido una meta más de vida. Los amo, respeto y admiro ayer, hoy y siempre. De todo corazón ¡MUCHAS GRACIAS!

A mi hermano Jonathan Mauricio quien me ayudó a superar una prueba académica, pues sin su ayuda, no hubiera podido seguir adelante. A Rosa Iris y Fabiola Estefanía que siempre me muestran cariño y apoyo. A Rubisel quien ha sido apoyo para mi madre como para la familia, así como lo es Ana con mi padre.

A mis tíos Huberto y Lilia quienes siempre han estado al pendiente de mí, apoyándome en todo momento y siempre aconsejándome para bien, gracias por ser como mis padres. También a mis tíos Jesús y Lourdes quienes se preocuparon y me cuidaron desde que llegué a Texcoco. De igual manera a toda mi familia materna quienes siempre se preocupan por mí y por pasar con ustedes siempre gratos momentos; así también a mi familia paterna con quienes comparto poco tiempo pero llenos de alegría.

A quien compartió conmigo buenos y malos momentos, quien estuvo conmigo a lo largo de la licenciatura alentándome y apoyándome así como durante mi trabajo de tesis y quien marcó con su cariño y amistad parte de mi vida. Gracias por todo Yesenia.

A quienes me apoyaron con mi trabajo, de verdad gracias: José Carlos, Ricardo, Guillermina, Mary, Emmanuel, Laura, Alicia, Adriana, Janeth, Lupita. Sin ustedes mi trabajo no hubiera podido realizarse.

A quienes estuvieron al pendiente de mí y alentándome durante la realización de mi trabajo así como de la tesis, gracias: Leydi, Jesús, Mónica, Claudio, Rosa, Carlos, Jaimes, Osmar, Bety, Rafa, Silvia, Noé, Gaby, Rigel, Josué, Jimena, Cathia, Andrés, Edinson, Egbert.

A mis amigos con quienes me divertí y compartí grandes momentos, al igual que me animaron a seguir adelante, gracias: Profesor Quintero, Jennifer, Alejandra, Alejandro, Ana, Sugeyli, Fátima, Lidia, Gabo, Aranza, Karen, Enrique, Ulises, Héctor, Fabiel, José, Iris, Lizeth, Luis.

A todos ustedes y a quienes me faltó por mencionar, no me queda más agradecerles y dedicarles este trabajo. Con sinceridad ¡Muchas Gracias!

David Emmanuel Solís Cruz

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad y el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo que me dio la formación profesional como Ingeniero en Recursos Naturales Renovables y me brindó también la oportunidad de estudiar la maestría.

Al posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua, por ser mi cuna de formación como maestro en ingeniería y sobretodo de brindarme la oportunidad de superar este reto personal y profesional.

A la Dra. Guadalupe Hernández Eugenio por todo su tiempo brindado en las clases, en el laboratorio, por sus enseñanzas y consejos, así como su paciencia y dedicación para la realización del trabajo experimental y escrito de la Tesis.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares por darme la oportunidad de trabajar en este experimento y por su tiempo en trabajo de gabinete.

Al Dr. Nagamani Balagurusamy por ser parte de mi comité asesor y brindarme su conocimiento y tiempo para la tesis.

A Mayra I. Luna por todas las atenciones durante mi estancia en el posgrado y su ayuda para mi titulación.

Y un sincero agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente hicieron posible la realización de este proyecto, y por ende la realización de mi trabajo de tesis.

DATOS BIOGRÁFICOS

David Emmanuel Solís Cruz nació el 10 de mayo de 1990 en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, capital del estado de Chiapas.

Estudió en el kínder Andrés Fábregas Rocas durante el periodo de 1993 a 1996. Entre los años 1996 al 2002 cursó la primaria en la escuela matutina Josefa Garrido de González Blanco. Realizó sus estudios de secundaria en la Escuela Secundaria Federal Licenciado Adolfo López Mateos del 2002 al 2005. Su estudio medio superior lo realizó en el periodo de 2005 a 2008 en el Colegio de Bachilleres de Chiapas (COBACH) plantel 01 con estudios enfocados a la Docencia en el área Rural.

Posteriormente presentó examen en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) donde pretendió estudiar Ingeniería Bioquímica. Sin embargo, también presentó examen para la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), donde a mediados del curso propedéutico del ITTG se enteró de su aceptación a la UACH.

Posteriormente optó por incorporarse a la UACH por todos los beneficios que tiene ser alumno becado de esta institución, aunque lo primordial fue que le interesó mucho la carrera de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables, pues su meta era ayudar al cuidado y mejoramiento del planeta.

Cursó en el periodo académico 2008-2009 su año de propedéutico en el Centro Regional Universitario del Sur Sureste (CRUSSE) hoy Unidad Regional Universitaria del Sur Sureste (URUSSE) ubicado en Puyacatengo, Teapa, Tabasco.

Durante el periodo 2009-2013 cursó y obtuvo la licenciatura por mérito académico en Ingeniería en Recursos Naturales Renovables en Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicios en SUELOS, ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo con sede en Texcoco, Estado de México.

Finalmente entre los años 2013 al 2015 realizó la maestría en el Posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua.

**POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*)
EN CO-DIGESTIÓN CON ESTIÉRCOL VACUNO EN MICROCOSMOS.
BIOCHEMICAL METHANE POTENTIAL OF CACTUS (*Opuntia ficus indica*)
IN CO-DIGESTION WITH COW MANURE IN MICROCOSM.**

David Emmanuel Solís Cruz¹ Guadalupe Hernández Eugenio²

RESUMEN

En este trabajo se obtuvo el potencial bioquímico de metano (PBM) del nopal (*Opuntia ficus indica*) y estiércol vacuno (E). Se realizaron seis tratamientos con diferentes proporciones nopal-estiércol y con tres repeticiones cada uno, para cuantificar el PBM a diferentes relaciones C/N. Los resultados experimentales mostraron que todos los tratamientos generan un promedio de 60% de metano, sin embargo, la producción de biogás fue variable de acuerdo a la composición del medio, la producción de biogás acumulado al final del experimento de T6 fue de aproximadamente 1000 mL, en tanto que, la producción de biogás acumulado de la co-digestión fue entre 2600 a 3100 mL al final del experimento. Los mejores tratamientos fueron el T5 (50% nopal: 50% E) encontrándose el PBM de 155 mL CH₄ g⁻¹ SV alimentados y el T3 (82% nopal: 18% E) con 146 mL CH₄ g⁻¹ SV alimentados. Los tratamientos con rendimientos medios fueron el T4 (75% nopal: 25% E), T1 (95% nopal: 5% E) y T2 (90% nopal: 10% E) con 140, 139 y 134 mL CH₄ g⁻¹ SV alimentados respectivamente. El tratamiento T6 (0% nopal, 100% E) resultó con el menor PBM con 85 mL CH₄ g⁻¹ SV alimentados. Los resultados obtenidos fueron simulados con el modelo de Gompertz, de la simulación se estimó la duración de la fase de latencia [d] donde el orden de menor a mayor duración fue T6, T5, T4, T3, T1 y T2 con 1.7, 9.6, 13.0, 13.2, 14.8 y 18.9 días respectivamente; y la constante de velocidad de producción de metano [d⁻¹], donde el promedio de T1 a T5 fue 6.3 d⁻¹ y el T6 fue 3.0 d⁻¹. Demostrándose un mejor promedio para T5 en la simulación. Por lo tanto, se concluye que el T5 fue la mejor proporción para una co-digestión nopal-estiércol, al obtenerse un mayor PBM e iniciarse en un menor tiempo.

Palabras clave: Potencial Bioquímico de Metano, relación C/N, modelo de Gompertz

ABSTRACT

This study obtained the biochemical methane potential (BMP) of cactus (*Opuntia ficus indica*) combined with cow manure (CM). Six treatments were performed at different cactus-manure rates and with three replications each, to quantify the BMP with different C/N ratios. The experimental results showed that all treatments generate an average of 60% methane; however, the biogas production varied according to the composition of the medium. Cumulative biogas production at the end of experiment T6 was approximately 1000 mL, whereas the cumulative biogas production from co-digestion was between 2600-3100 mL at the end of the experiment. The best treatments were T5 (50% cactus: 50% CM) with BMP of 155 mL CH₄ g⁻¹VS fed and T3 (82% cactus: 18% CM) with 146 mL CH₄ g⁻¹VS fed. Treatments with average yields were T4 (75% cactus: 25% CM), T1 (95% cactus: 5% CM) and T2 (90% cactus: 10% CM) with 140, 139 and 134 mL CH₄ g⁻¹VS fed respectively. The treatment T6 (0% cactus, 100% CM) resulted in the lowest PBM with 85 mL CH₄ g⁻¹VS fed. The results were simulated with the Gompertz model; from the simulation, estimates were obtained for the duration of the lag phase [d], where the order from lowest to highest was T6, T5, T4, T3, T1 and T2 with 1.7, 9.6, 13.0, 13.2, 14.8 and 18.9 days respectively, and for the methane production rate constant [d⁻¹], where the average of T1 to T5 was 6.3 d⁻¹ and T6 was 3.0 d⁻¹. A better average was obtained for T5 in the simulation. Therefore, it was concluded that T5 was the best ratio for a cactus-cow manure co-digestion, since it obtained a greater BMP and started in less time.

Keywords: Biochemical Methane Potential, C/N ratios, Gompertz model

¹Thesis author ²Thesis Advisor

¹Autor de Tesis ²Director de Tesis

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	III
DATOS BIOGRÁFICOS	IV
ABSTRACT	V
RESUMEN	V
ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE CUADROS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVO GENERAL	8
2.1 Objetivos específicos	8
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 Digestión anaeróbica.....	9
3.2 Mono-digestión y co-digestión	13

3.3 Estiércol vacuno como sustrato.....	16
3.4 Nopal como sustrato	17
3.5 Co-digestión Nopal – Estiércol	17
3.6 Potencial bioquímico de metano	18
3.7 Modelo de Gompertz	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Inóculo	19
4.2 Sustratos	20
4.2.1 Características físico-químicas de los sustratos	25
4.3 Microcosmos.....	26
4.3.1 Características y manejo de microcosmos.....	26
4.4 Metodologías de análisis.....	29
4.4.1 Sólidos	29
4.4.1.1 Sólidos totales	31
4.4.1.2 Sólidos totales fijos	32
4.4.1.3 Sólidos totales volátiles	32
4.4.2 Biogás.....	32
4.4.3 DQO	33
4.4.4 Amonio	35
4.4.5 Ion Sulfato.....	36
4.4.6 Ion Sulfuro	36
4.4.7 pH	37
4.5 Métodos analíticos	37

4.5.1 Relación Carbono – Nitrógeno	37
4.5.2 Metano.....	38
4.5.3 Ácidos Grasos Volátiles	39
4.6 Potencial bioquímico de metano	40
4.7 Análisis Estadístico	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1 Sólidos totales degradados	42
5.2 Sólidos volátiles degradados	43
5.3 Materia orgánica removida.....	45
5.4 Amonio producido	46
5.5 Sulfato producido	48
5.6 Sulfuro producido.....	49
5.7 Cambio de pH.....	51
5.8 Potencial bioquímico de metano	53
5.8.1 Ácidos Grasos Volátiles	60
5.9 Modelo de Gompertz	65
5.10 Análisis de medias por Tukey.....	66
6. CONCLUSIONES	69
7. RECOMENDACIONES.....	70
8. BIBLIOGRAFÍA	71
9. ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Experimento con cal para neutralizar el pH del nopal.	23
Cuadro 2. Características físico-químicas de los sustratos.	26
Cuadro 3. Tratamientos realizados en el experimento.....	27
Cuadro 4. Valores iniciales y finales de los tratamientos.	64
Cuadro 5. Análisis del PBM de los tratamientos con el modelo de Gompertz. .	66
Cuadro 6. Análisis ANOVA de la simulación por Gompertz.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inóculo tomado del fondo del digestor de 10 L.	20
Figura 2. Toma de muestra del centro del cladodio.	21
Figura 3. Molienda de nopal con cal.	22
Figura 4. Tamizado de mezcla de nopal con cal.....	22
Figura 5. Pesado de nopal fresco.	24
Figura 6. Tarado de botella y pesado de estiércol.	28
Figura 7. Matraz Erlenmeyer con agua destilada y flujo constante de nitrógeno.	28
Figura 8. Vertido de inóculo con pipeta.....	29
Figura 9. Crisoles en estufa a 105 °C.	30
Figura 10. Crisoles a 550°C dentro de mufla.	31

Figura 11. Medición de biogás por desplazamiento de agua.	33
Figura 12. Pasos de la DQO. a) Vertido de dicromato b) Vertido de sulfato de plata c) Inversiones de tubos y tubos colocados en digestor.	35
Figura 13. Toma de muestra e inyección en cromatógrafo.	38
Figura 14. Sólidos totales degradados.	42
Figura 15. Sólidos volátiles degradados.	44
Figura 16. DQO removido.	46
Figura 17. Amonio producido.	47
Figura 18. Ión Sulfato producido.	48
Figura 19. Ión sulfuro presente.	50
Figura 20. Cambio de pH.	52
Figura 21. Producción diaria de metano.	54
Figura 22. Biogás acumulado de los tratamientos.	56
Figura 23. Volumen de metano acumulado normal de los tratamientos.	58
Figura 24. Potencial Bioquímico de metano de los tratamientos.	59
Figura 25. Comportamiento de los AGVs en comparación con el PBM.	62

1. Introducción

La digestión anaeróbica (DA) es un tratamiento biológico realizado en ausencia de oxígeno para estabilizar la materia orgánica, teniéndose como producto el biogás, que es una mezcla formada principalmente de metano y dióxido de carbono. (Mata-Alvarez *et al.*, 2014)

Dentro de los tratamientos biológicos, la digestión anaeróbica es frecuentemente el mejor en cuanto a costo-beneficio (Niu *et al.*, 2013), debido a la alta recuperación de la energía vinculada al proceso (Mata-Alvarez *et al.*, 2000), se ayuda a reducir el uso de combustibles fósiles y se pueden usar los sólidos ricos en nutrientes como fertilizante al finalizarse la digestión. (Ciborowski, 2007)

La mono-digestión presenta algunos inconvenientes vinculados a las propiedades del sustrato, como son: Sólidos con cargas orgánicas bajas, altas concentraciones de N y/o ácidos de cadena larga que pueden inhibir la actividad metanogénica. La mayor parte de estos problemas se pueden resolver con la adición de un co-sustrato en lo que se ha llamado co-digestión anaeróbica. (Mata-Alvarez *et al.*, 2014)

Los principales sustratos utilizados con mayor frecuencia en los últimos años son excremento de animales (54 %), sólidos de depuradora (22%), sólidos de residuos municipales (11%). Y los principales co-sustratos utilizados son

residuos industriales (41%), residuos agrícolas (23%) y residuos municipales (20%) (Gunaseelan, 2004, Mata-Alvarez *et al.*, 2014)

El estiércol vacuno es un sustrato de fácil acceso en México, ya que en nuestro país la ganadería está presente en cualquier estado, destacando la zona centro y norte de la república. (Trinidad, 2007).

El uso del nopal como residuo agrícola, por el contrario no es un co-sustrato muy utilizado en biodigestores en México, a pesar de ser un cultivo sembrado en gran densidad en la mayor parte del norte y centro del país, por lo que se conoce muy poco de las características del nopal actuando como co-sustrato en digestores anaeróbicos en México, a diferencia de otros países como Etiopía (Jigar *et al.*, 2011).

Para saber la eficiencia de los reactores se estudiará el Potencial Bioquímico de Metano (PBM) siendo la evaluación de la influencia de los lodos aeróbicos sobre la biomasa anaeróbica activa (Buntner *et al.*, 2014), dentro de botellas serológicas o también llamados microcosmos, donde se desarrollan modelos de ecosistemas en los que parte del ambiente (medio sólido o líquido) está circunscrito en ellos y son estudiados. (Barra Caracciolo *et al.*, 2013)

2. Objetivo general

Evaluar el potencial bioquímico de metano en co-digestión nopal-estiércol vacuno a seis proporciones de cada co-sustrato en microcosmos.

2.1 Objetivos específicos

Comparar el PBM con 6 tratamientos nopal-estiércol.

Comparar el comportamiento de degradación de los sustratos en los 6 tratamientos.

Simular los datos experimentales con el modelo de Gompertz y comparar los datos obtenidos por medias de Tukey.

Establecer el mejor tratamiento de PBM, soportado en los análisis generados.

3. Revisión bibliográfica

3.1 Digestión anaeróbica

La digestión anaeróbica es un proceso en el que los microorganismos descomponen material biodegradable en ausencia de oxígeno. La digestión anaeróbica es una fuente de energía renovable debido a que el proceso produce biogás, rico en metano y dióxido de carbono adecuados para la producción de energía, que ayudaría a reemplazar los combustibles fósiles. Además, los sólidos ricos en nutrientes que quedan después de la digestión se pueden utilizar como fertilizante (Ciborowski, 2007). La eficiencia en la conversión de la materia orgánica en metano en un digestor anaeróbico depende de las interacciones sinantrópicas entre los distintos organismos.(Akuzawa *et al.*, 2011)

La digestión anaeróbica es un proceso biológico controlado que puede reducir sustancialmente los impactos del aire y la calidad del agua de estiércol a través de la reducción de gases de efecto invernadero. El metano es un gas de efecto invernadero con 21 veces la capacidad que atrapa el calor del dióxido de carbono. Además, la electricidad generada a partir de biogás tiene el potencial de reducir las emisiones de dióxido de carbono mediante el desplazamiento de la combustión de combustibles fósiles que de otro modo habría sido utilizado para generar la electricidad. Dada la ausencia de formas oxidadas de nitrógeno en el estiércol de ganado lechero y la exigencia de condiciones anaerobias para la

producción de metano, el potencial de las emisiones de óxido nitroso se reduce significativamente. (Belostotskiy *et al.*, 2015, Kundu *et al.*, 2012)

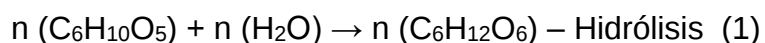
El conocimiento de los fundamentos de la digestión anaeróbica es útil en el diseño y operación de digestores eficientes, y en la comprensión de cómo se pueden producir condiciones desfavorables y la forma de evitarlos. La digestión anaeróbica es un proceso complejo que consta de un sistema biológico mixto en el que los materiales orgánicos tales como carbohidratos, lípidos y proteínas son utilizados por los microorganismos en sus actividades metabólicas normales. Se presenta en cuatro pasos biológicos y químicos básicos en la digestión anaeróbica como resultado de la actividad de una variedad de microorganismos. (Ciborowski, 2007)

El proceso de digestión comienza con la hidrólisis bacteriana de los materiales de entrada para descomponer polímeros orgánicos insolubles tales como hidratos de carbono a una forma que puede ser utilizado directamente por los organismos anaerobios. La velocidad de hidrólisis es una función de factores tales como el pH, la temperatura, composición y tamaño de partícula del sustrato, y altas concentraciones de los productos intermedios. (Niu *et al.*, 2015, Sundberg *et al.*, 2013, Veeken and Hamelers, 1999)

En la mayoría de los casos la biomasa se compone de grandes polímeros orgánicos. Para que las bacterias en los digestores anaerobios tengan acceso a la energía potencial del material, estas cadenas primero deben desglosarse en sus partes constituyentes más pequeños. Estas partes constituyentes o monómeros tales como azúcares son fácilmente disponibles por otras bacterias.

El proceso de ruptura de estas cadenas y la disolución de las moléculas más pequeñas en solución se llama hidrólisis. Por lo tanto la hidrólisis de estos componentes poliméricos de alto peso molecular es el primer paso necesario para la digestión anaerobia. A través de la hidrólisis de las moléculas orgánicas complejas se descomponen en azúcares simples, aminoácidos, y ácidos. (Niu et al., 2015)

Para (Chynoweth, 1987) la hidrólisis es la primera y, a menudo la etapa limitante de la velocidad. En la etapa de hidrólisis, los compuestos poliméricos son convertidos por las enzimas extracelulares a sustratos con moléculas solubles más pequeñas.

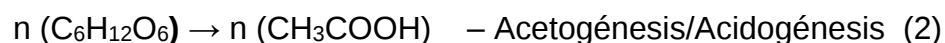


La velocidad de hidrólisis de un sustrato particular está limitada por la cantidad disponible en la superficie de las enzimas hidrolíticas. Reacciones hidrolíticas generalmente limitan la cantidad de metano producido durante la digestión anaeróbica de la biomasa (Chynoweth, 1987)

Acidogénesis (bacterias fermentativas) convierten material orgánico sencillo (soluble) a principalmente ácidos orgánicos y alcoholes, así como dióxido de carbono e hidrógeno. Ciertas reacciones fermentativas proceden únicamente a bajas concentraciones de H_2 y dependen de la eliminación del H_2 por bacterias H_2 -oxidantes (metanogénesis). La baja concentración de H_2 resultante acompaña la formación de acetatos como producto soluble mayor (Chynoweth, 1987)

El proceso biológico de acidogénesis es realizado por microorganismos fermentativos. Se generan ácidos grasos volátiles (AGV) junto con amoníaco, dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno, así como otros subproductos.

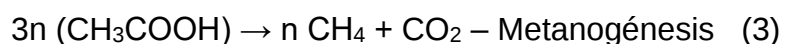
La tercera etapa de la digestión anaerobia es la acetogénesis. Las moléculas sencillas se digieren por acetógenos para producir ácido acético en, así como dióxido de carbono e hidrógeno. Los organismos acetogénicos son el vínculo vital entre la hidrólisis / acidogénesis y la metanogénesis en la digestión anaeróbica. La acetogénesis proporciona los dos sustratos principales para el último paso en la conversión metanogénica del material orgánico, es decir, el hidrógeno y acetato. (Chynoweth, 1987)



La formación de metano involucra la conversión de compuestos simples en metano CH_4 y CO_2 , mediante bacterias metanogénicas anaeróbicas. La etapa terminal de la digestión anaeróbica es el proceso biológico de la metanogénesis. Aquí los metanógenos utilizan los productos intermedios de las etapas precedentes y las convierten en metano, dióxido de carbono y agua. Son estos compuestos los que componen la mayoría del biogás emitido por el sistema. La metanogénesis es sensible a valores de pH alto y bajo y se produce entre pH 6,5 y pH 8. (Li *et al.*, 2015b).

Las bacterias metanogénicas son más sensibles a los cambios de temperatura que otros organismos presentes en el digestor. Esto es debido a la tasa de crecimiento más rápido a la de otros grupos, tales como los acetógenos,

que puede alcanzar el catabolismo sustancial incluso a baja temperatura. El amoníaco actúa como un fuerte inhibidor de la formación de metano a partir del H_2 y CO_2 . Sólo tiene un efecto menor sobre la formación de metano a partir del acetato. La característica más notable del proceso anaeróbico es que su operación exitosa depende de la interacción metabólica de diferentes bacterias. Para mantener un sistema de tratamiento anaeróbico estable, las bacterias metanogénicas y no metanogénicas deben de estar en un estado de equilibrio dinámico. Para establecer y mantener un estado estable, todos los parámetros que afectan el proceso de metano deben ser monitoreados y mantenerse dentro de un rango aceptable, ya que dos cosas son necesarias para el manejo de reactores anaeróbicos conocer las condiciones ambientales y los procesos que causan disturbio. (Carballa *et al.*, 2015) Los parámetros más importantes son pH, alcalinidad, temperatura, nutrientes, tiempo de retención, relación C/N, material tóxico, y la carga orgánica.



Una ecuación química simplificada para el proceso global descrito anteriormente es el siguiente:



3.2 Mono-digestión y co-digestión

La mono-digestión se refiere al uso de un solo sustrato para en este caso realizar una digestión anaeróbica. A través de éste se degrada el sustrato o la

materia orgánica mediante diversos grupos de microorganismos que al consumir el sustrato generan metano y CO₂. Sin embargo, el uso de un solo determinado sustrato contribuye a una relación C/N muy baja que posteriormente implica un aumento en la concentración de amonio, sin embargo (Nie *et al.*, 2015) encontró que la recirculación de una fracción del líquido digestado puede reducir el aumento de amonio.

La creciente conciencia de los problemas de contaminación, asociado con el manejo inadecuado de estiércol animal y desechos orgánicos, hace hincapié en la necesidad de soluciones adecuadas para hacer frente al problema. Un proceso integrado para resolver este problema es la co-fermentación que se define como la co-digestión de estiércol principalmente de los animales y otros tipos de materia orgánica adecuada en plantas de biogás.

Los materiales de alimentación para la digestión anaeróbica varían considerablemente en su composición, homogeneidad, la dinámica de fluidos y la biodegradabilidad. Por ejemplo, el contenido de materia seca (ST) es muy variable. Algunos residuos agroindustriales pueden contener menos de 1% ST, mientras que otros contienen altos contenidos de ST de más de 20%. Esto refiere a que algunos sustratos son capaces de ser fermentadas solamente cuando se mezclan con otro sustrato o son diluidos. Además, la proporción global de nutrientes en los materiales de desecho es de gran importancia para el proceso de biodegradación microbiana. La relación C/N de los desechos puede variar en una amplia gama, considerablemente entre 6 (por ejemplo, estiércol animal) y más de 500 (por ejemplo, residuos de madera). (Mshandete *et al.*, 2004)

Por otra parte, las materias primas tienen una distribución diferente de las macromoléculas orgánicas como proteínas, grasas e hidratos de carbono en el que su degradación es de gran importancia. La degradación de los materiales de alimentación con alto contenido de grasa aumentan los AGVs considerablemente, mientras que los de alto contenido de proteína conducen a grandes cantidades de amoníaco (NH_4). (Mshandete *et al.*, 2004)

Por lo tanto, una combinación de dos o más sustratos, es decir, co-digestión, optimizará las propiedades de degradación de las poblaciones de alimentación y por lo tanto aumentar el rendimiento de metano. Se ha informado que el rendimiento de los digestores podría mejorarse considerablemente mediante la adición de un co-sustrato y por lo tanto aumentar la degradación de la MO y la eficiencia de la producción de biogás (Mshandete *et al.*, 2004). Una ventaja adicional de la co-digestión es la eliminación ecológica de los residuos orgánicos y al mismo tiempo el aumento de la energía.

Las principales ventajas del proceso de co-digestión son (Lee *et al.*, 2012, Braun and Wellinger, 2003):

- El aumento de la producción de biogás, en comparación a un solo sustrato.
- Cantidad adicional de fertilizante, debido a que se adiciona más materia orgánica y se degrada mejor y el lodo es mayor y de mejor calidad.
- Ingresos adicionales, ya que puedes vender el lodo como biofertilizante o usar el gas metano para generar electricidad y/o para uso doméstico o industrial, generando un ahorro.

3.3 Estiércol vacuno como sustrato

Los residuos de granjas pecuarias y de la creciente industria del bioprocesamiento pueden causar problemas ambientales y de salud, si no reciben algún tratamiento y son depositados inadecuadamente. Sin embargo, estos residuos después de recibir un tratamiento aeróbico o anaeróbico se pueden usar como suplementos benéficos para la producción agrícola y como fuente de energía usando la digestión anaeróbica. (Rivera-Salvador *et al.*, 2009). Tal es el caso de México, pues muy pocos ranchos ganaderos aprovechan sus residuos orgánicos para la generación de metano.

Un ejemplo de estudio fue (Li *et al.*, 2015b) obtuvo un rendimiento en el PBM de $222 \text{ N mL g}_{\text{SV}}^{-1}$. (Abubakar and Ismail, 2012) investigó la eficacia de estiércol de vaca para la producción de biogás y presentó las características de funcionamiento de la digestión anaeróbica de lotes y en operaciones semi-continuas. En estas condiciones, la digestión del estiércol de vaca llega a 47% de reducción en SV y aproximadamente el 48,5% de reducción de la DQO con un rendimiento de biogás de $0,15 \text{ L de biogás kg}^{-1} \text{ SVañadidos}$. A pesar de las grandes variaciones en las concentraciones de contaminantes, se logró un mejor desempeño de la digestión anaerobia de la fracción biodegradable de estiércol de vaca. Los resultados mostraron que el estiércol de vaca podría ser una materia prima eficiente para la producción de biogás y para el tratamiento de residuos.

3.4 Nopal como sustrato

(Stephanopoulos, 2007) encontró una relación C/N de los cladodios de 48, que es mayor a lo que siempre debe mantenerse por debajo de 43. Esto demuestra que la biomasa de los cladodios es altamente orgánica y con menor contenido de nitrógeno, por lo que podría necesitar materiales de alimentación suplementarios ricos en nitrógeno. En este estudio se obtuvo un porcentaje de metano de 53 % y un volumen de biogás de 3283 mL. (Jigar *et al.*, 2011)

La producción de biogás a partir del fruto es superior a la del cladodio, como era de esperar debido a su mayor contenido en sólidos volátiles. Por causa de su elevada humedad, la productividad de biogás en peso fresco es mucho menor que los cultivos energéticos tradicionales, aunque su rápida degradación (inferior a 10 días) podría hacer este sustrato interesante para su co-digestión con residuos ganaderos. (Pascual and Fuertes, 2008)

3.5 Co-digestión Nopal – Estiércol

Los ensayos de co-digestión de nopal y estiércol de vaca realizados en la planta piloto en proporción 15:85 han permitido extraer las siguientes conclusiones (Pascual and Fuertes, 2008):

- Los resultados mostraron que el estiércol de vaca podría ser uno de materia prima para la producción de biogás eficiente y tratamiento de residuos.
- La producción de biogás observada es superior a la obtenida con la digestión anaeróbica de estiércol, y estable a lo largo del periodo experimental con una

velocidad de carga orgánica de $1 \text{ Kg}_{\text{sv}} \text{ m}^{-3}\text{d}^{-1}$ la producción de biogás es de 514.5 litros normales Kg^{-1}sv , con un 50 % de concentración de metano en el biogás.

- La co-digestión anaeróbica de una mezcla 15:85 de estiércol de vaca y *Opuntia ficus indica* es técnicamente viable, pero un porcentaje mayor de nopal puede presentar limitaciones en cuanto a su comportamiento mecánico.
- El pretratamiento de trituración de los cladodios del nopal es esencial para asegurar el buen funcionamiento mecánico e hidráulico del proceso de digestión anaeróbica de la mezcla.
- Dada la alta concentración de H_2S encontrada en el biogás, sería necesario probablemente un sistema de desulfurización del biogás externo.

3.6 Potencial bioquímico de metano

El Potencial bioquímico de metano (BMP) puede ser definido como la máxima cantidad de metano producido a través de la degradación anaeróbica de un sustrato a través del tiempo, este proceso es realizado en batch y es usado para determinar la biodegradabilidad de la materia a digerir (Domínguez-Puerto, 2013)

(Gunaseelan, 2004) estudió el rendimiento de metano que se genera de acuerdo a la materia agregada al medio, es decir, la cantidad de volumen de metano por cada unidad de materia integrada al medio. También obtuvo el PBM de diferentes sustratos y co-sustratos, con ello dio conocer los posibles

resultados obtenidos al realizar una degradación de la materia a través de la digestión anaeróbica.

3.7 Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz fue estudiado por (Zwietering *et al.*, 1990), simulando diversas curvas de crecimiento bacteriano. Observando que este modelo no tiene problemas de la adecuación con el tipo de crecimiento bacteriano y describe mejor los modelos de crecimientos bacterianos.

4. Materiales y métodos

4.1 Inóculo

El inóculo utilizado para los microcosmos se extrajo del fondo de un digestor de 10 L de volumen de trabajo como se observa en la Figura 1, previamente inoculado con estiércol de bovino y con un mes previo de operación.

El digestor de donde se tomó el lodo para inocular, se alimentó de manera semi-continua, considerando un tiempo de retención hidráulico de 30 días y una alimentación al 4% de ST.

El inóculo se almacenó en una botella estéril de 1 L, inmediatamente después se prepararon los microcosmos, éste se mantuvo con flujo constante de nitrógeno para mantener el medio anóxico. (6 horas)



Figura 1. Inóculo tomado del fondo del digester de 10 L.

4.2 Sustratos

Los sustratos utilizados fueron el nopal (*Opuntia ficus indica*) y estiércol vacuno.

Los cladodios con una etapa fenológica de 6 meses fueron recolectados en Zacatecas en el Centro Regional Universitario Centro Norte de la UACH y adicionalmente de la granja Experimental de la UACH, Texcoco.

La base del cladodio presenta un tejido fibroso difícil de manejar, por lo que se eliminó dejando 5 cm en la base y 2 cm a los lados, quedando solo la parte central como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Toma de muestra del centro del cladodio.

La parte central del cladodio fue licuado durante 2 minutos con una licuadora casera de velocidad única, además, se procedió a pasar el nopal licuado por un tamiz metálico con 3 mm de abertura.

El nopal contiene en su estructura ácido oxálico, por lo que presenta pH de 4.6. Con la finalidad de llevarlo a neutralidad se adicionó la cantidad necesaria de hidróxido de calcio o cal hidratada ($\text{Ca}(\text{OH})_2$).

El centro de los cladodios fueron licuados y neutralizados al momento de la molienda con la cantidad necesaria de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ de acuerdo al Cuadro 1, dicho porcentaje fue en base al peso fresco de nopal como se observa en la Figura 3.



Figura 3. Molienda de nopal con cal.

La pulpa licuada y neutralizada se tamizó con una maya de 3 mm de diámetro, siendo éste uno de los materiales utilizados en los microcosmos, tal como se ve en la Figura 4.

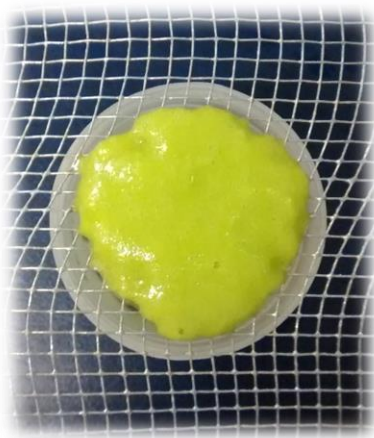


Figura 4. Tamizado de mezcla de nopal con cal.

El Cuadro 1 describe el porcentaje de cal utilizado y el pH obtenido. Se observa que al agregar 0.0023 g de cal por cada gramo de nopal fresco se obtiene un pH cercano a 7.

% Ca(OH)₂	pH	Temperatura (°C)
0	4.63	19.7
0.10	5.15	21.8
0.20	5.80	22.0
0.22	6.47	22.4
0.23	6.81	21.7
0.24	7.58	22.1
0.25	8.32	23.0
0.30	9.13	22.0
0.50	9.88	23.8
1.00	10.24	20.8

Cuadro 1. Experimento con cal para neutralizar el pH del nopal.

Para utilizar el nopal en los microcosmos primero se cortó la parte central del cladodio pesándose en trozos pequeños, como se observa en la Figura 5. Una vez pesados se calculó la cantidad de cal necesaria para neutralizar el pH. Se agregó el nopal con la cantidad de cal necesaria en la licuadora y se licuó por dos minutos. Finalmente se tamizó el licuado de nopal con cal, el líquido obtenido fue pesado y usado para introducirlos en los microcosmos.



Figura 5. Pesado de nopal fresco.

El estiércol de bovino fue el otro co-sustrato utilizado, se obtuvo del corral dos ubicado en la granja Experimental Chapingo ubicado en Texcoco, Estado de México. Se recolectó y almacenó el estiércol seco en un costal de plástico y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Dado que el estiércol recolectado contenía basura como piedras y hojas, se tamizó el estiércol con una malla metálica con 3 mm de abertura. Con la finalidad de reducir el tamaño de las partículas del estiércol, se procedió a licuar el sustrato seco durante 2 minutos en una licuadora casera de velocidad única para obtener estiércol en polvo. Una vez obtenido el estiércol en polvo, se alimentó en los microcosmos en combinación con la pulpa de cladodio obtenida previamente, todo en condiciones anaeróbicas.

4.2.1 Características físico-químicas de los sustratos

Los sustratos nopal y estiércol se analizaron previamente por López *et al.* en 2013 y Torres en 2015 obteniendo los valores del Cuadro 2. Los análisis realizados por Torres fueron efectuados con sustrato fresco, al análisis elemental realizado por López se realizó con materia seca para conocer el contenido de carbono (C) y nitrógeno (N) y así calcular las relaciones C/N. Adicionalmente el día de inicio de los microcosmos en cada experimento se analizó ST y SV.

Los análisis de sólidos totales y volátiles incluidos en el Cuadro 2, fueron realizados tal como fueron incluidos en los microcosmos, es decir, el estiércol seco y el nopal con cal licuados y tamizados.

Componentes	<i>Opuntia ficus indica</i>	Estiércol
	(6 meses)	vacuno
Sólidos Totales (%)	5.21	92.07
Sólidos Volátiles (% ST)	71.75	41.53
DQO (mg DQO Kg_{MS}⁻¹)^a	810967.77	1485405.36
Ion Sulfato (mg Ion Sulfato kg_{MS}⁻¹)^a	45864.76	236096.11
Carbohidratos (%)^a	78.56	54.18
Lípidos (%)^a	5.40	2.02
Proteínas (%)^a	4.71	10.85
Fibras (%)^a	10.21	29.24
Carbono (%)^b	36.06	24.55

Nitrógeno (%)^b	1.03	2.28
----------------------------------	------	------

^a Análisis realizados por Torres. ^b Análisis realizados por López.

Cuadro 2. Características físico-químicas de los sustratos.

El contenido de carbono y nitrógeno fue realizado para poder obtener la relación C/N, ya que (Borowski *et al.*, 2014) afirma que la mejor relación C/N se encuentra entre 15 y 30 para optimizar la digestión anaeróbica. Se realizaron seis tratamientos para obtener un mejor estudio del comportamiento del PBM con respecto a diferentes relaciones C/N.

4.3 Microcosmos

4.3.1 Características y manejo de microcosmos

Los microcosmos se realizaron en botellas serológicas con capacidad total de 330 mL y un volumen de trabajo de 250 mL, con tapón de goma y casquillos de aluminio. El volumen de inóculo utilizado fue el 10%.

Los sustratos en los microcosmos fueron adicionados en diversas proporciones para alcanzar un contenido total de sólidos de 4%. En todos los tratamientos del Cuadro 3 se alimentó al mismo contenido de sólidos. Del 4% de sólidos a alimentar, en el tratamiento T1 se alimentó 95% procedente de nopal y

5% de estiércol, es decir, 3.8% de sólidos totales provienen de nopal y 0.2% de sólidos de estiércol, con esa proporción la relación C/N resultante fue 23.57. Para obtener el peso a adicionar de cada uno de los sustratos se realizó el balance de materia, considerando su humedad y con un volumen de operación de 225 mL. En el Cuadro 3 se puede observar las seis proporciones nopal-estiércol que se analizaron en el experimento, así como su respectiva relación C/N.

Tratamientos	% Nopal	% Estiércol vacuno	Relación C/N
T1	95	5	23.57
T2	90	10	22.61
T3	82	18	21.16
T4	75	25	19.98
T5	50	50	16.3
T6	0	100	10.7

Cuadro 3. Tratamientos realizados en el experimento.

El estiércol previamente molido y tamizado fue adicionado a las botellas serológicas, como se observa en la Figura 6. Cada tratamiento se realizó por triplicado. El nopal pesado se vertió en las botellas serológicas con el estiércol. La mezcla nopal-estiércol se agitó cinco minutos con agitador magnético, bajo flujo de nitrógeno se procedió a verter la cantidad de agua destilada necesaria para completar el balance. El agua destilada se hirvió y dejó enfriar bajo flujo constante de nitrógeno, como se observa en la Figura 7.



Figura 6. Tarado de botella y pesado de estiércol.



Figura 7. Matraz Erlenmeyer con agua destilada y flujo constante de nitrógeno.

Se procedió a medir el pH inicial de cada botella de cada tratamiento, se agitó 5 minutos más antes de inocular. El inóculo fue vertido con una pipeta de 25 mL como se observa en la Figura 8, al verterse se procedió a tapar y sellar la botella serológica. Con la finalidad de evitar la entrada de menor cantidad de aire se aplicó una purga de nitrógeno a cada botella durante cinco minutos. Cada botella se agitó previo a incubar a 37°C, tras dos horas se realizaron los análisis iniciales.



Figura 8. Vertido de inóculo con pipeta.

4.4 Metodologías de análisis

4.4.1 Sólidos

Para la determinación de los sólidos se utilizaron crisoles, que primero se pusieron a peso constante, para ello se lavaron y enjuagaron con agua destilada,

se numeraron y colocaron en una mufla a 550 °C. Posteriormente se colocaron los crisoles en una estufa a 105 °C para bajar la temperatura, posteriormente se dejaron enfriar en un desecador para tenerlos a peso constante.

Cuando los crisoles se tuvieron a peso constante, se procedió a anotar el número del crisol y su peso. Una vez anotado el peso del crisol se procedió a colocar la muestra dentro del crisol y anotar el peso con la muestra.

El crisol con la muestra se colocó en una parrilla eléctrica con baja temperatura, para eliminar la mayor cantidad de humedad posible, después se colocó en una estufa Boekel a 105 °C como se observa en la Figura 9.



Figura 9. Crisoles en estufa a 105 °C.

Después de dos horas dentro de la estufa se colocaron los crisoles con las muestras dentro del desecador durante media hora y se procedió a pesar el crisol y anotar su peso. Al tener el peso del crisol, se colocó dentro de una mufla Felisa a 550 °C durante 20 minutos como se observa en la Figura 10, luego se colocaron en la estufa por 10 minutos y finalmente en el desecador durante media hora. Transcurrido el tiempo en el desecador se procedió a pesar y anotar el peso del crisol, finalizado este paso el crisol se lavó y dejó a peso constante nuevamente.



Figura 10. Crisoles a 550°C dentro de mufla.

4.4.1.1 Sólidos totales

Los sólidos totales se determinaron con la siguiente fórmula:

$$ST = \frac{\text{Peso del crisol con muestra a } 105^{\circ}\text{C} - \text{Peso del crisol a peso constante}}{\text{Peso del crisol con muestra húmeda} - \text{Peso del crisol a peso constante}}$$

$$\text{Peso del crisol con muestra húmeda} - \text{Peso del crisol a peso constante}$$

Los ST se obtienen en base a uno o se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje

4.4.1.2 Sólidos totales fijos

Los sólidos totales fijos se determinaron con la siguiente fórmula:

$$\text{STF} = \frac{\text{Peso del crisol con muestra a } 550^{\circ}\text{C} - \text{Peso del crisol a peso constante}}{\text{Peso del crisol con muestra húmeda} - \text{Peso del crisol a peso constante}}$$

Los STF se obtienen en base a uno o se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje

4.4.1.3 Sólidos totales volátiles

Los sólidos totales volátiles se determinaron con la diferencia entre los ST y los STF.

4.4.2 Biogás

Para determinar el biogás generado se procedió a llenar una botella serológica de igual tamaño al microcosmo con una solución al 10 % de NaCl y un pH de 3. La botella con agua salina se colocó boca abajo en un soporte

universal con ayuda de unas pinzas. Se introdujo una aguja como salida, colocada sobre una probeta. El microcosmo se agitó y colocó cercano a la botella con agua salina y mediante una manguera de goma adaptada con dos agujas en los extremos se insertó primero un extremo en la botella con solución salina y después dentro del microcosmo. En la Figura 11 se observa la forma en que se midió el biogás. La cantidad de agua desplazada de la botella salina y medida con ayuda de la probeta, se consideró como el volumen de biogás generado por el microcosmo.



Figura 11. Medición de biogás por desplazamiento de agua.

4.4.3 DQO

Con base en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Wef, 1998), se determinó la DQO de la siguiente manera:

Primeramente se tuvo que diluir en un matraz aforado de 250 mL, un mililitro de muestra del microcosmo en 249 mL de agua destilada, esto con base en pruebas de experimentos previos. Se escogieron tubos de ensayo con tapa de rosca de 10 mL que no estuvieran rayados, donde se añadió 1.5 mL de una solución de dicromato de potasio o solución de digestión alta. En el tubo con la solución de dicromato se añadió 2.5 mL de la muestra diluida y solo un tubo con 2.5 mL de agua destilada que se usó como blanco. Para terminar se añadió 3.5 mL de una solución de sulfato de plata y ácido sulfúrico o solución catalítica. Tanto la solución de digestión alta y la muestra se pueden añadir libremente, sin embargo, hay que usar guantes para protección de la piel y gafas de seguridad. En cuanto a la solución catalítica, ésta se debe agregar dentro de una campana extractora de gases y de manera lenta por el borde del tubo de ensayo, debido a que si se agrega de manera rápida ocurre la reacción entre los ácidos y la muestra de manera inmediata y se eleva la temperatura pudiendo provocar quemaduras. Una vez vertidas ambas soluciones y la muestra se procede a colocar cinta teflón sobre la boquilla del tubo para que la tapa se enrosque bien y proteja la tapa de plástico de los ácidos dentro del tubo. Finalmente tapados los tubos se colocaron dentro de una cámara digestora previamente encendida a 150°C de temperatura. Los tubos se invierten lentamente cinco veces para iniciar la reacción y se colocan en la cámara digestora. Dicha cámara mantiene los tubos a 150°C durante dos horas, como se observa en la Figura 12. Terminado el tiempo de la cámara digestora, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y en un espectrofotómetro con lectura a 600 nm se leyó primero el tubo

blanco que sirvió de referencia y posteriormente los tubos con las muestras correspondientes. Además la lectura se multiplicó por la inversa de la dilución.



Figura 12. Pasos de la DQO. a) Vertido de dicromato b) Vertido de sulfato de plata c) Inversiones de tubos y tubos colocados en digestor.

4.4.4 Amonio

Para determinar la cantidad de Amonio presente, se utilizaron las pruebas en tubos con viales de la marca HACH®, utilizando el método del salicilato número 10031. Con una dilución 1 en 10. La determinación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante con el procedimiento DR/4000.

4.4.5 Ion Sulfato

Con base en el SMEWW (Wef, 1998), se determinó el ion sulfato de la siguiente manera:

De la muestra diluida que se utilizó para la medición de DQO, se tomó 5 mL de muestra y se añadió en un tubo de ensayo con rosca de 10 mL, además se realizó uno con 5 mL de agua destilada como blanco. Se agregó un mililitro de una solución con 30 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 5 g de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 1 g de nitrato de potasio (KNO_3) y 20 mL de ácido acético (CH_3COOH 99%) aforado a 1 L con agua destilada. Los seis mililitros se agitaron en un vortex a 3000 rpm para homogenizar la solución con la muestra, después se agregó medio gramo de BaCl_2 . Una vez agregado el cloruro de bario se agitaron nuevamente los tubos a 3000 rpm en el vortex durante un minuto, transcurrido el minuto se dejó reposar durante cinco minutos y se procedió a realizar la medición en un espectrofotómetro con lectura a 420 nm.

4.4.6 Ion Sulfuro

De acuerdo a (Cord-Ruwisch, 1985) el ion sulfuro se determinó de la siguiente manera:

Se agregó 1.95 mL de una solución de HCl al 50 mM y CuSO_4 al 5 mM en un tubo de ensayo de 10 mL con rosca, posteriormente 0.05 mL de muestra

directa del microcosmo al tubo de ensayo y uno con 0.05 mL de agua destilada como blanco. La muestra se agregó mientras se agitó el tubo en un vortex a 1000 rpm durante cinco segundos. La mezcla se pasó directamente a un espectrofotómetro con lectura a 480 nm para su medición.

4.4.7 pH

La medición del pH se realizó antes de cerrar el microcosmo y al final del experimento al abrir los microcosmos con un potenciómetro Orion 4 star de Thermo Scientific.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Relación Carbono – Nitrógeno

La relación carbono/nitrógeno presente en los microcosmos se determinó con ayuda del estudio de laboratorio en la facultad de química de la UNAM realizado por López *et al.* en 2013 donde obtuvieron el porcentaje de carbono y nitrógeno de cada sustrato. La relación C/N se calculó de acuerdo al porcentaje del sustrato añadido multiplicado por el contenido de carbono y sumando el carbono de ambos sustratos, de igual manera para el nitrógeno, ambas sumas totales se dividieron y se obtuvo la relación C/N.

4.5.2 Metano

La cantidad de Metano generado por los microcosmos se determinó utilizando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Clarus 500 como se observa en la Figura 13, con temperaturas en el inyector y el detector de ionización por llamas de 100°C y el horno con 70°C; el gas acarreador usado fue el helio su presión en el inyector fue de 23.3 PSI y dentro del detector de 14 PSI, los gases usados para generar la flama fueron aire comprimido e hidrógeno.



Figura 13. Toma de muestra e inyección en cromatógrafo.

Se inyectó del medio gaseoso del microcosmo 10 μL del gas con una jeringa Hamilton de 50 μL , y mediante una secuencia establecida para detectar el metano, se obtiene un área generada de la cantidad de metano presente en el volumen inyectado.

Para poder determinar la cantidad de metano generado por el microcosmo, se realizó una curva tipo, es decir, se inyectaron porcentajes conocidos de metano, esto es, de 0 a 100 por ciento de metano en un medio gaseoso con

intervalos de porcentaje conocidos y, mediante estas lecturas de áreas se realizó una regresión lineal obteniéndose un modelo $y=ax+b$, donde tras despejar “x” se puede conocer el porcentaje de metano presente en el gas al introducir el área obtenida de las lecturas.

4.5.3 Ácidos Grasos Volátiles

Para determinar los AGVs se utilizó un cromatógrafo Perkin-Elmer Clarus 500, donde se inyectó de manera líquida 10 μL de una solución preparada. La solución se realizó con 1.5 mL del medio líquido del microcosmo vertido en un microtubo, se agregó con una micropipeta 5 μL de HCl. Se centrifugó esta solución a 14000 rpm durante 10 minutos, para así del sobrenadante solo tener un medio líquido de la muestra que se inyectó al cromatógrafo.

Se utilizó la solución estándar de ácidos grasos de cadena corta Sigma Aldrich donde se encontraban los siguientes ácidos: Acético, Propiónico, Iso-butírico, Butírico, Iso-Valérico, n-Valérico, Iso-Capriónico, n-Capriónico y Heptanóico. La solución estándar de AGVs de acuerdo a la hoja de calidad de dicha solución establece que tiene una concentración de 10 mM, por lo tanto, se hizo una curva tipo con dilución en cascada con 2400 μL de la solución estándar a 10 mM, pasando al siguiente tubo 1680 μL de la solución estándar con 720 μL de agua desionizada, en un tercer tubo se agregó 1680 μL de la solución dos con 720 μL de agua desionizada, este procedimiento siguió hasta obtener 10 tubos.

Las diluciones realizadas se inyectaron en el cromatógrafo para así conocer las áreas y el tiempo en que se detecta cada tipo de AGV.

4.6 Potencial bioquímico de metano

Para determinar el Potencial Bioquímico de Metano fue necesario utilizar varios datos obtenidos, de acuerdo a los siguientes pasos:

- a) Se conoció la cantidad de biogás generado en el día y se sumó con el volumen anterior, para generar el biogás acumulado.
- b) Se determinó el porcentaje de metano presente en el biogás diario.
- c) Teniendo el porcentaje diario de metano y el volumen de biogás diario, se estableció el volumen de metano generado diario, por ejemplo, se obtuvo un porcentaje de 23% de metano en el día y 100 mL de biogás, por lo tanto, el volumen de metano del día fue de 23 mL.
- d) Una vez realizado el paso anterior se sumó sucesivamente el volumen de metano del día con el anterior.
- e) El volumen de metano generado se estandarizó a una temperatura de 273°K y una presión de 760 mm Hg o 1 atmósfera.
- f) Los sólidos totales iniciales en base uno se multiplicaron con el volumen de trabajo, para obtener los gramos de ST presentes.

- g) Los gramos de ST se multiplicaron por los sólidos volátiles en base uno presentes al inicio del experimento, para así obtener los gramos de SV iniciales.
- h) El PBM se obtuvo al dividir el volumen de metano estandarizado generado a lo largo del tiempo entre los gramos de sólidos volátiles iniciales.

4.7 Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico se procedió a generar un código en Sigma Plot como se observa en el Anexo 1 con base en (Zwietering *et al.*, 1990) basándose en el modelo tipo Gompertz.

Una vez simulados los datos obtenidos del modelo de Gompertz, se realizó un análisis ANOVA en SAS por medias de Tukey con el código del Anexo 2, para poder establecer si hubo diferencia significativa entre ellos.

5. Resultados y discusión

5.1 Sólidos totales degradados

La cantidad de sólidos totales iniciales de todos los tratamientos promedian 4%, es decir, se cumplió el balance de materia generada para cada tratamiento. Además, los sólidos totales al finalizar el experimento muestran una reducción con respecto a la inicial, observándose así la degradación de la materia como se observa en la Figura 14.

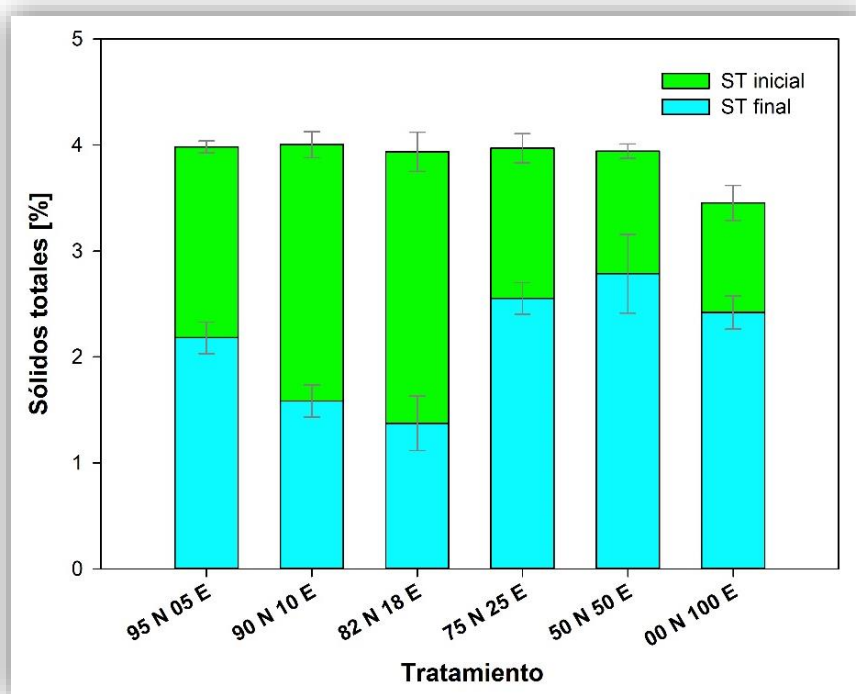


Figura 14. Sólidos totales degradados.

(Yang *et al.*, 2015) caracterizó las especies *O. ficus indica* y *Agave tequilana* para conocer los sustrato y estimar su producción en digestión anaeróbica y encontró que el nopal contiene en promedio de 6% ST y el agave de 15% ST. Con base en lo anterior, se puede afirmar que a pesar de caracterizar una misma especie como lo fue el nopal de la especie *O. ficus indica* su composición puede variar de acuerdo a la zona de colecta.

(Soto *et al.*, 2015) utilizó la especie de alga *Sargassum muticum* con digestión anaeróbica de forma continua para conocer su viabilidad para producir metano, en este estudio se removieron 66.2, 61.3 y 55.1 % de ST para esta especie de alga recolectada en diferentes zonas. En contraste la remoción de ST para los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6, es decir, con porcentajes de nopal de 95, 90, 82, 75, 50, y 0 fueron 45.2, 60.5, 65.2, 35.7, 29.2 y 29.8 % ST removidos respectivamente. Lo que implica que *S. muticum* es un sustrato con mejor degradabilidad que el nopal y estiércol, y que entre estos últimos el nopal mejora la remoción de ST.

5.2 Sólidos volátiles degradados

La Figura 15 muestra que los 4 tratamientos con mayor porcentaje de nopal muestran un promedio de 65 % de sólidos volátiles, lo cual indica que un gran porcentaje del total de la materia es degradable por los microorganismos. Se puede observar este comportamiento con los SV finales siendo un promedio de 40%, por lo tanto, se degrada el 38.5 % de sólidos volátiles iniciales.

Por otro lado, los dos tratamientos con mayor porcentaje de estiércol muestran un contenido inicial menor de SV, para T5 y T6 su porcentaje de remoción de SV fue 28.2 y 15.7 respectivamente, lo cual podría indicar que el estiércol es un sustrato que mejora la degradación en presencia de un co-sustrato con menor contenido de nitrógeno.

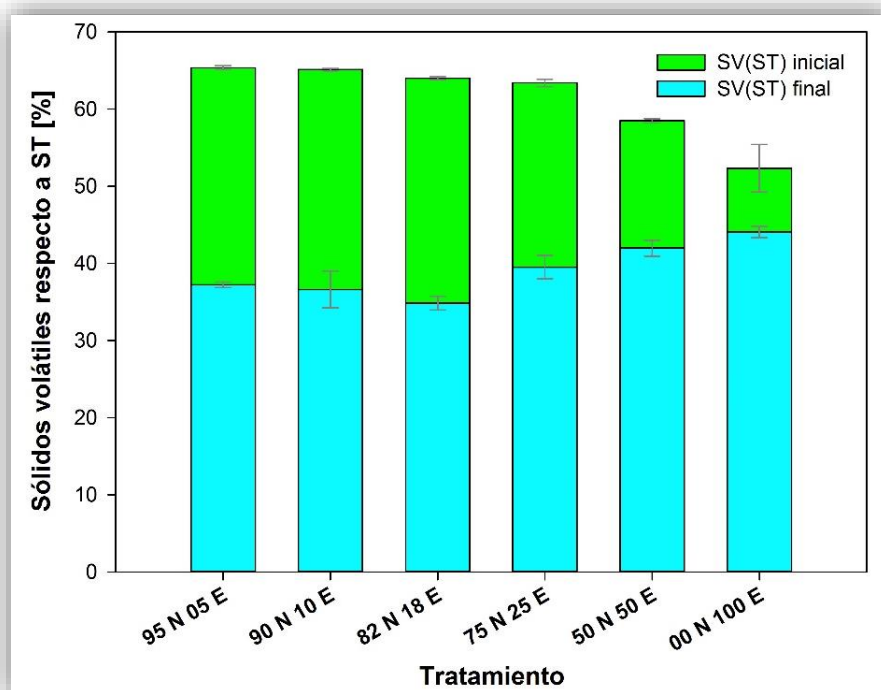


Figura 15. Sólidos volátiles degradados.

(Soto *et al.*, 2015) realizó digestión anaeróbica con alimentación continua de la especie de alga *Sargassum muticum* para conocer su viabilidad para producir metano, en este estudio se removieron 58.3, 56.2 y 41.2 % de SV para esta especie de alga recolectada en diferentes zonas. Comparadas con las obtenidas en el experimento se tiene una remoción baja, pues no se alcanza la

degradación reportada con *S. muticum*, por lo tanto, ninguno de los sustratos usados alcanza un buen rendimiento en la degradación de la materia presente.

5.3 Materia orgánica removida

La Figura 16 muestra la DQO inicial y final de los 6 tratamientos, en donde se puede apreciar una tendencia a disminuir la DQO de todos los tratamientos en la medida de disminuir la concentración de nopal, excepto para el tratamiento con 82% de nopal. Tendencia que coincide con la de los SV, lo que podría implicar que el estiércol presenta contenidos altos de sólidos fijos. Sin embargo, considerando la remoción de DQO se tienen valores de 69.9, 77.3, 56.9, 66.3, 49.4 y 40.8, en donde los porcentajes de nopal son 95, 90, 82, 75, 50 y 0 respectivamente, lo que presenta una disminución en la remoción de DQO con la disminución de nopal. Se observa que los tratamientos con mayor DQO inicial fueron los tratamientos con mayor porcentaje consumido, lo cual indica que el nopal contiene mayor materia orgánica biodegradable.

(Ramos-Suárez *et al.*, 2014) estudió el comportamiento de la co-digestión de *O. máxima* y *Scenedesmus sp.* en microcosmos con cinco tratamientos en diferentes proporciones nopal-microalga siendo 0-100, 25-75, 50-50, 75-25 y 100-0, obtuvieron un porcentaje de remoción en la DQO de 21.3, 33.7, 72.8, 81.8 y 77.6 respectivamente. Comparando los tratamientos con porcentajes de nopal al 95, 75, 50 y 0 % y sus respectivos porcentajes de remoción siendo 40.8, 49.4, 66.3, 69.9; se observa que el estiércol es un sustrato con mejor degradabilidad

que la microalga, sin embargo, la co-digestión entre el nopal-microalga es óptima ya que se remueve un mayor porcentaje de la DQO.

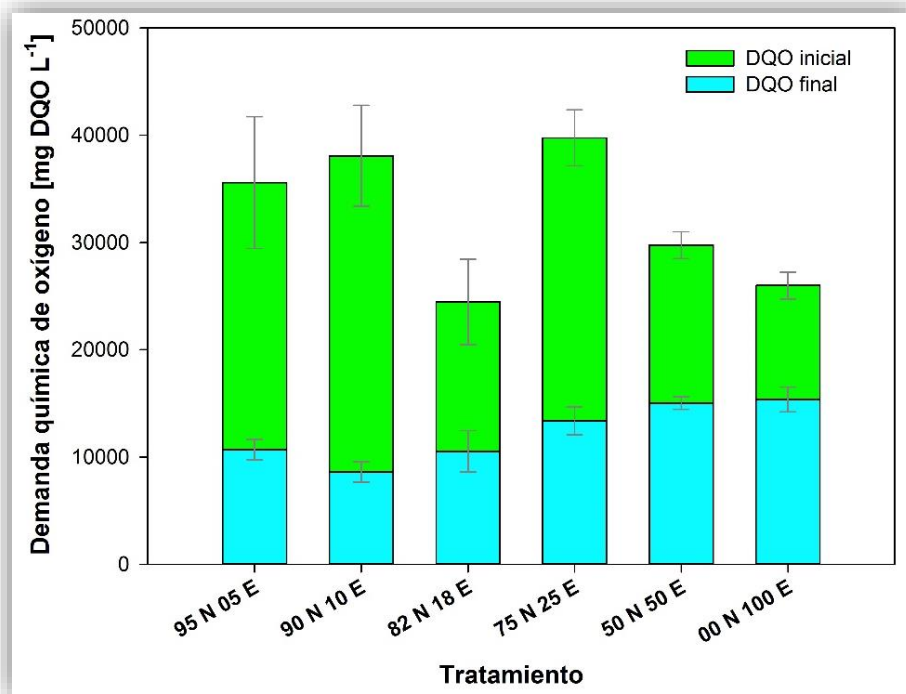


Figura 16. DQO removido.

5.4 Amonio producido

La Figura 17 muestra la concentración de amonio inicial y final, dado los resultados obtenidos se observó un aumento en la concentración de amonio. Para el tratamiento T1 hubo un aumento del 74%, para los tratamientos T2 y T3 fue del 290%, para el T4 fue de 30%, para el T5 fue de 212%, para el T6 fue de 93%.

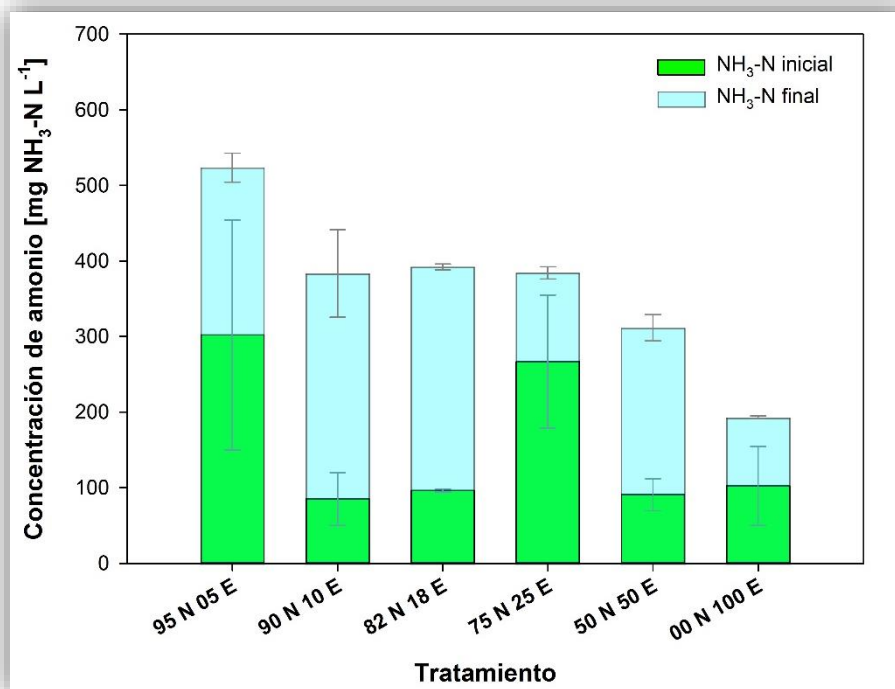


Figura 17. Amonio producido.

De acuerdo a los datos obtenidos por (Niu *et al.*, 2014) en un proceso de digestión anaeróbica continua con pollinaza en condiciones termofílicas, obtuvo una inhibición por amonio con una concentración entre 4000-5000 mg NH₃-N L⁻¹ acompañado de un aumento en los AGVs y una baja producción de metano y reporta una completa inhibición a los 8000 mg NH₃-N L⁻¹. Al comparar los resultados obtenidos con el rango de inhibición se observó que existe una concentración final 8 veces menor a este rango, lo cual podría significar que el bajo rendimiento al finalizar el experimento no ocurrió por inhibición de amonio.

(Ramos-Suárez *et al.*, 2014) estudió la co-digestión entre *O. maxima* y *Scenedesmus sp.*, tanto en microcosmos como con alimentación semi-continua,

obteniendo concentraciones de amonio menores a 1160 mg L^{-1} y concluyó que dichas concentraciones no inhiben el proceso de metanogénesis coincidiendo con (Niu *et al.*, 2014), comparándose con los tratamientos estudiados, se puede concluir que el sustrato nopal no se inhibe en concentraciones de amonio menores a 1160 mg .

5.5 Sulfato producido

La Figura 18 muestra la concentración inicial y final de sulfato. Los porcentajes de aumento del ión sulfato fueron: T1 de 80%, T2 de 36%, T3 de 24%, T4 de 89%, T5 de 99% y para T6 de 57%.

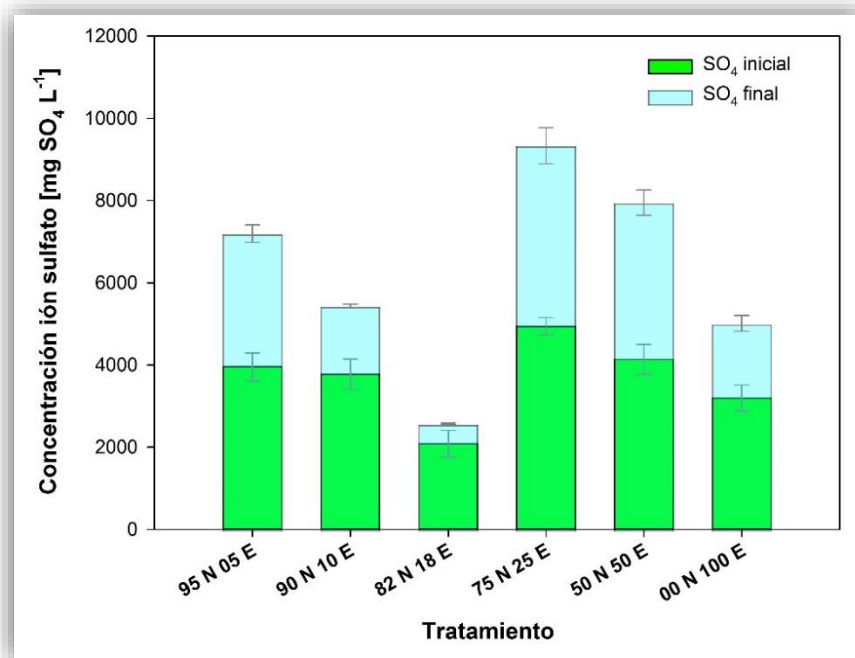


Figura 18. Ión Sulfato producido.

(Li *et al.*, 2015a) estudió en un reactor de membrana anaeróbica en condiciones termofílicas, los sustratos de residuos de café, leche y de lodos activados, donde los resultados revelan que la adición de sulfato mostró una excelente capacidad para degradar el propionato al igual que grandes cargas orgánicas. Por lo tanto, podría significar que los tratamientos con mayor cantidad de sulfato generado en el estudio destaquen en su potencial de metano, sin embargo, el tratamiento con 82% nopal difiere del resto de los tratamientos con nopal, lo cual podría deberse a la diferente zona de recolección de la especie de nopal.

5.6 Sulfuro producido

La Figura 19 muestra la concentración inicial y final del ión sulfuro, donde se puede apreciar la reducción de sulfuro de los diferentes tratamientos siendo para T1 y T5 de 10%, para T2 de 23%, para T3 de 48%, para T4 de 19%, y para T6 de 67%.

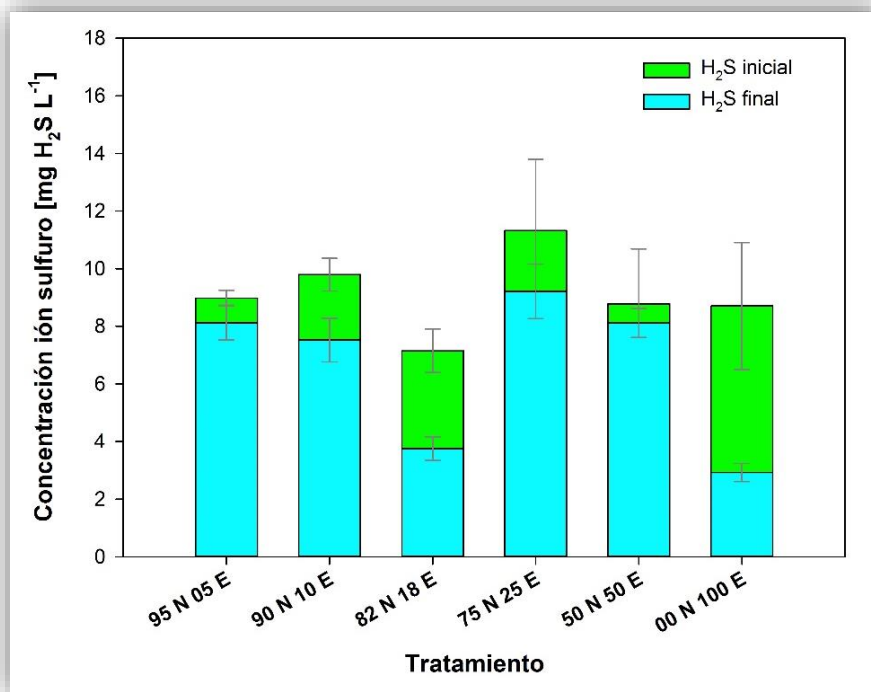


Figura 19. Ión sulfuro presente.

(Bohutskyi *et al.*, 2015) estudió la digestión anaeróbica de *Nannochloropsis salina* de forma semi-continua a diferentes temperaturas, donde caracterizando el sulfuro teórico para este sustrato siendo de 9 mg H₂S L⁻¹ lo cual fue muy cercano a los obtenidos inicialmente.

(Pascual and Fuertes, 2008) realizó un estudio de la co-digestión nopal-estiércol con una relación 15-85% respectivamente de forma continua, donde observó que existe una alta concentración de H₂S, por lo que propone un sistema de desulfurización para el biogás, sin embargo, los tratamientos realizados no muestran gran cantidad de sulfuros al inicio y final del experimento, esto podría

deberse a que la relación C/N de los tratamientos estudios optimizan la metanogénesis y la concentración de sulfuro se reduce.

5.7 Cambio de pH

En la Figura 20 se observa que el pH inicial y final de los 6 tratamientos, se observa que hay un comportamiento ascendente conforme el porcentaje de nopal se reduce, por otro lado al finalizar el estudio el pH se estabiliza para todos los tratamientos en un pH promedio de 7.3. Por lo tanto, los tratamientos en su estabilización obtienen un pH cercano a la neutralidad. Se reporta que cuando la digestión anaeróbica llega a la etapa de metanogénesis, aumenta la concentración de amonio y el valor pH puede aumentar por encima de 8. Una vez que la producción de metano se estabiliza, el nivel de pH se mantiene entre 7.2 y 8.2. (Verma, 2002)

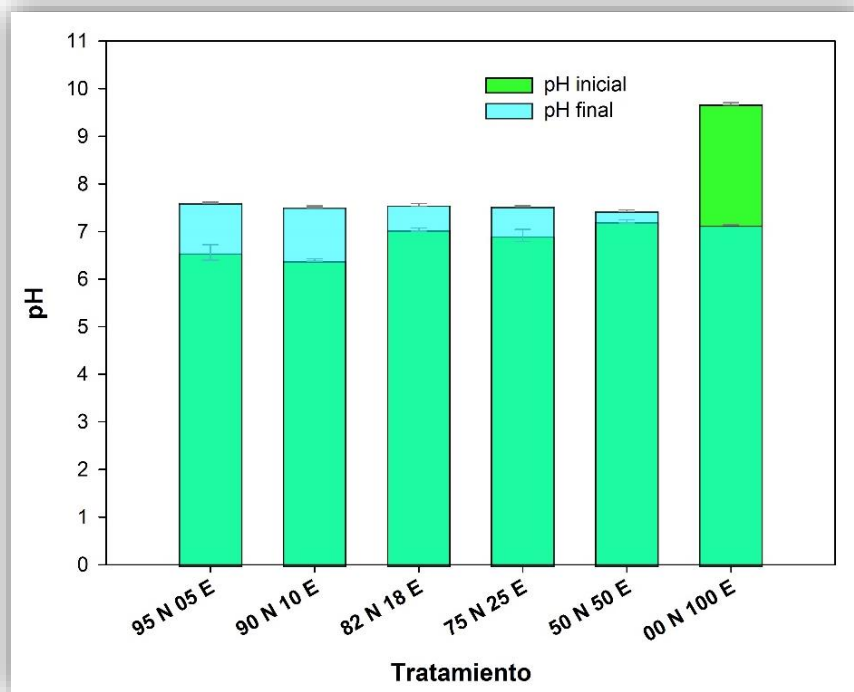


Figura 20. Cambio de pH.

(Bombardiere *et al.*, 2007), realizó un estudio de digestores con alimentación semi-continua en condiciones termofílicas a 56°C, donde un aumento en la producción de biogás durante todo el día correspondió con una disminución en la concentración de ácidos volátiles y un aumento en el pH del digestor en comparación con el momento de la entrada de alimentación. Los tratamientos con nopal coinciden con este comportamiento, ya que los tratamientos con menor pH como son los correspondientes con nopal al final del experimento lograron un aumento del pH, debido a la disminución de los AGVs y al aumento en la producción de biogás.

(Jigar *et al.*, 2011) analizó la co-digestión entre *O. ficus indica* y estiércol con 5 diferentes proporciones entre estos sustratos, determinó el pH de estos tratamientos obteniendo 6.79, 6.91, 6.75, 6.76 y 6.81, después de 62 días el pH final para todos los tratamientos promedió 5.2. Debido a que en las etapas iniciales del proceso general de producción de biogás, las bacterias que forman ácidos producen ácidos grasos volátiles, que resultan en la disminución del pH y disminuyen el crecimiento de las bacterias metanogénicas. Con base en lo anterior y al observar el comportamiento de los AGVs en la Figura 25, se podría implicar el pH ácido de los tratamientos con nopal a la gran cantidad de acetato, propionato y butirato presente al inicio del experimento, por otro lado, el aumento en el pH se debería a la presencia casi nula de los AGVs al finalizar el estudio.

5.8 Potencial bioquímico de metano

Primeramente se determinó el porcentaje de metano diario, la Figura 21 muestra el comportamiento de la producción de metano diario a lo largo el experimento. Antes de los 8 días se observa el inicio en la producción de metano, antes de los 30 días termina la fase logarítmica de producción de metano y al llegar a los 55 días tienen una estabilización

Entre los 10 y 30 días la producción de metano aumenta logarítmicamente, por lo tanto, la producción de metano es óptima, debido a que los microorganismos aumentan su población y degradan rápidamente la materia

orgánica. A partir del día 30 la producción de metano en los tratamientos se mantiene en un promedio general de 60 %, debido a que se llega a una estabilidad entre el consumo de materia orgánica y el nacimiento y muerte de microorganismos.

(Jigar *et al.*, 2011) obtuvo en su estudio de co-digestión de nopal con estiércol que la calidad del metano fue de 50% ya sea en co-digestión o solo estiércol, siendo muy parecido a los encontrados en el estudio.

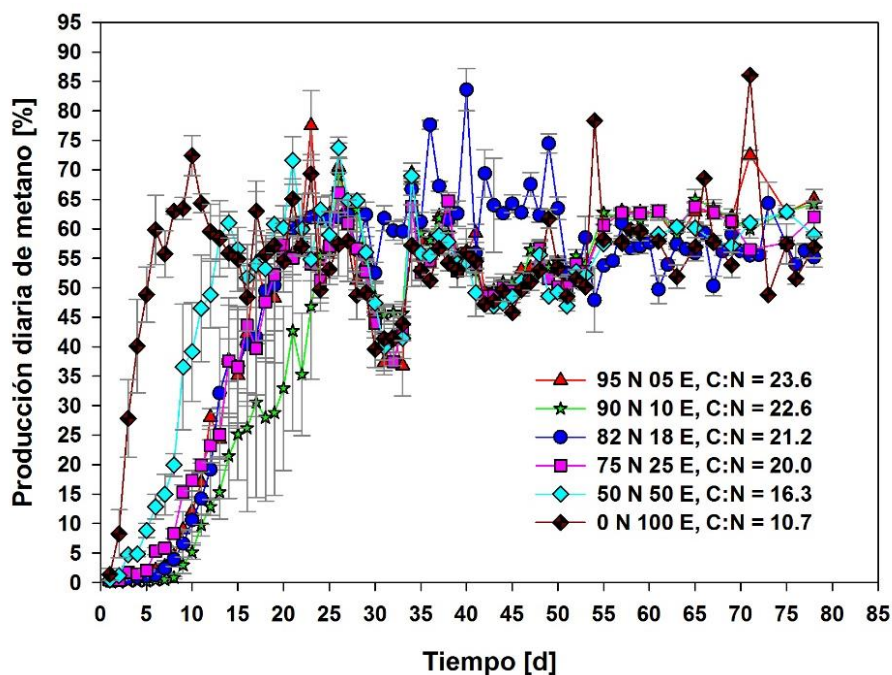


Figura 21. Producción diaria de metano.

Después de medir el metano se determinó la producción de biogás, la producción de biogás diaria generada los primeros 5 días fue alta, siendo en promedio de 200 mL en un espacio de cabeza de 80 mL, por lo que fue necesario purgar constantemente las primeras horas. Se procedió a medir los primeros 5

días la cantidad de biogás generada a las 10 y 22 h, para reducir presión dentro del microcosmo. Una vez que pasaron los 5 días de máxima producción de biogás, se midió la producción de biogás cada 24 h.

En la Figura 22 se observa el comportamiento de la producción de biogás acumulado a lo largo del experimento, destacando que los tratamientos con nopal tienen dos pendientes de producción de biogás, la primera se observa hasta los 5 días en promedio. Durante los primeros 5 días el biogás producido fue mayormente dióxido de carbono, pues su porcentaje de metano como se observa en la Figura 21 fue menor al 10 %, es decir, los primeros días en los tratamientos con nopal la respiración es dominante en lo microcosmos. Posterior entre los 5 y 10 días, existe una etapa de producción de biogás reducida. Entre los 10 y 45 días del experimento los tratamientos con nopal tienen una tercera pendiente, siendo la generación de biogás alta aunado a un porcentaje de metano alto, por lo que se está degradando y produciendo metano con la materia presente. A partir del día 45 para los tratamientos con nopal se observa la cuarta pendiente, donde la producción de biogás se empieza a reducir y a estabilizar, puesto que dentro del microcosmo la materia degradable por los microorganismos es mínima, por lo tanto la producción de biogás decae, esto se podría asociar también al hecho que los análisis de amonio, sulfato y sulfuro que son los principales inhibidores de la digestión anaeróbica no se encuentran en altas concentraciones.

Por otro lado en el tratamiento con 100% estiércol vacuno la producción de biogás es reducida durante los primeros 5 días. Una segunda pendiente ocurre entre los 5 y 13 días del experimento donde la producción de biogás es mayor,

como se observa en la Figura 21 su porcentaje de metano se encuentra entre 30 y 70 %, deduciéndose así que los microorganismos se encuentran degradando de manera óptima la materia orgánica. La tercera pendiente ocurre a partir del día 13 donde se observa la reducción y estabilización del biogás generado, pues como se dijo anteriormente la materia degradable es mínima.

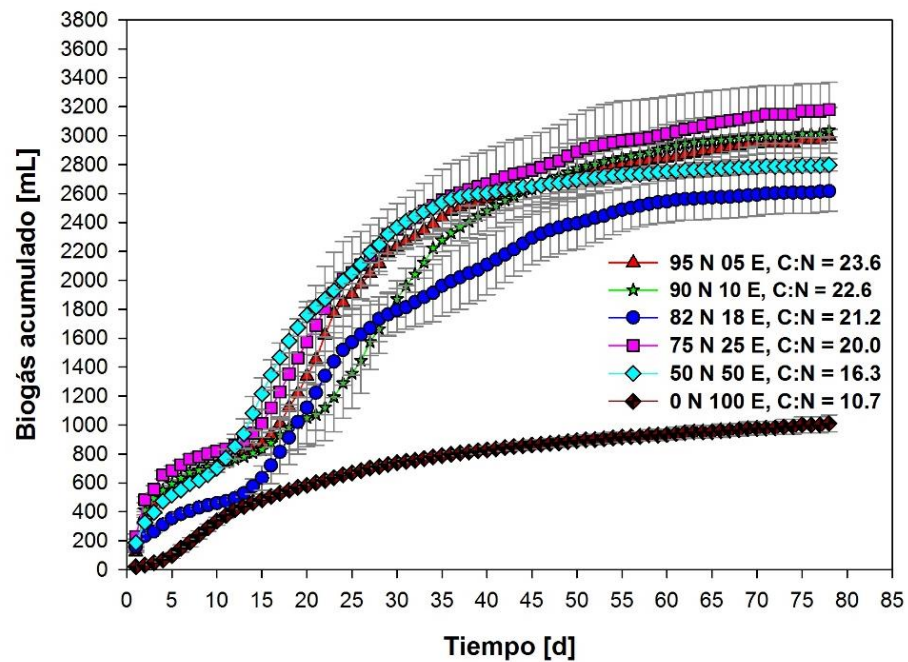


Figura 22. Biogás acumulado de los tratamientos.

(Pascual and Fuertes, 2008) obtuvo de una co-digestión de nopal- estiércol con una proporción 15:85 un volumen de biogás acumulado tras estabilizarse el digestor de 400 mL. Por su parte (Jigar et al., 2011) obtuvo 14.183 L de biogás de una combinación 25 nopal y 75 estiércol y 13.67 L con sólo estiércol operando con 8% ST en un digestor de 2.8 L. En ambos casos y comparando con los

resultados obtenidos se observa que la co-digestión genera mayor cantidad de biogás que al operar un solo sustrato.

La Figura 23 muestra el volumen de metano normal acumulado a lo largo del experimento, destaca que todos los tratamientos con nopal generan mayor cantidad de metano que el tratamiento con solo estiércol.

El volumen de metano generado por los tratamientos mostró tres pendientes. Los tratamientos con mayor cantidad de estiércol muestran su primer pendiente entre los 5 días con puro estiércol y a los 8 días para el tratamiento con 50 % estiércol. La segunda pendiente comprende hasta el día 35, siendo la etapa en la que estos tratamientos generan la mayor cantidad de metano. La tercera pendiente comprende después del día 35, donde el volumen generado de metano es casi nulo.

Para los tratamientos con mayor cantidad de nopal la primera pendiente comprende hasta el día 15, pues se observó que el porcentaje de metano empieza a incrementar al igual que el biogás generado. La segunda pendiente para estos tratamientos comprende del día 15 hasta aproximadamente el día 55, siendo la etapa con mayor acumulación de volumen de metano. A partir del día 55 la producción de metano acumulado es mínima o nula, ya que la cantidad de biogás generado se redujo.

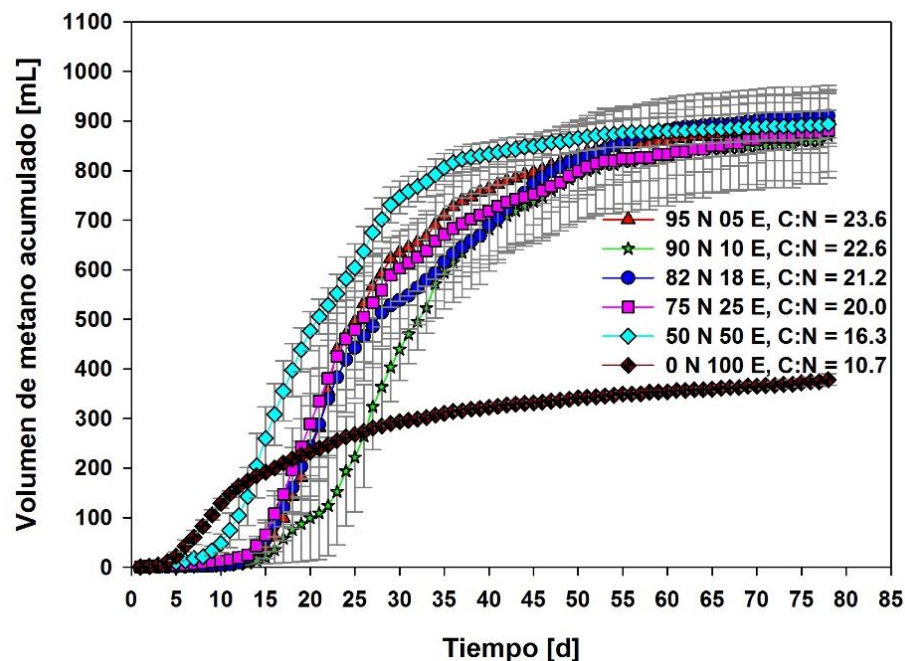


Figura 23. Volumen de metano acumulado normal de los tratamientos.

Finalmente se obtuvo el Potencial Bioquímico Metano de todos los tratamientos como se observa en la Figura 24. El PBM fue menor para el tratamiento con puro estiércol, lo cual era de esperarse debido a que el volumen de metano normal producido fue una tercera parte menor a los tratamientos con nopal. En cambio los tratamientos con nopal generaron casi el doble al tratamiento testigo.

El tratamiento con mayor PBM fue el tratamiento con 50% nopal y 50% estiércol, destacando que su fase de latencia fue menor al resto de los tratamientos con nopal.

En comparación con el tratamiento T6, el tratamiento T1 obtuvo un aumento en el PBM de 64%, para T2 un 65%, para T3 de 79%, para T4 de 69 % y para T5

de 92%. Por lo tanto, el tratamiento T5 obtuvo casi el doble de rendimiento de metano que solo el estiércol como único sustrato.

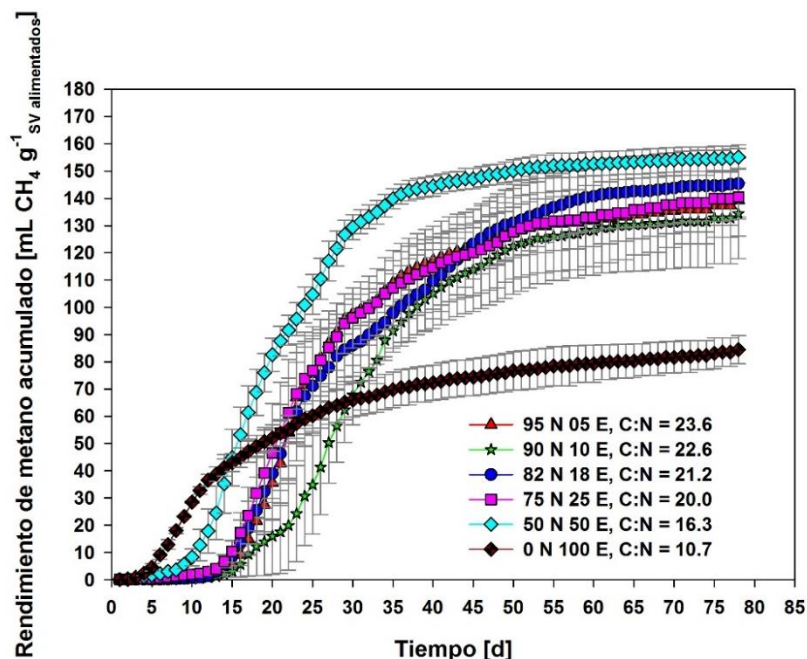


Figura 24. Potencial Bioquímico de metano de los tratamientos.

(Moraes *et al.*, 2015) observó que la co-digestión de azúcar con vinaza no puede generar metano, sin embargo, al agregar estiércol a estos sustratos obtuvo un PBM de 267.4 mL CH₄ g sv⁻¹. (Soto *et al.*, 2015) produjo 166–208 mL CH₄ gvs⁻¹ con una mono-digestión de *Sargassum muticum*, además concluyó que este sustrato tiene buen rendimiento en microcosmos, pues en digestores semi-continuos la producción disminuye. (Bohutskyi *et al.*, 2015) obtuvo un rendimiento de 220 a 380 mL CH₄ gvs⁻¹ con *Nannochloropsis salina*, además concluyó que con un pretratamiento en agua de este sustrato entre 150 – 170°C, aumenta en un 40% el PBM. (Ramos-Suárez *et al.*, 2014) obtuvo de una co-

digestión de *Opuntia máxima* y *Scenedesmus sp* con una proporción entre estos de 75-25% un PBM promedio de 300 166–208 mL CH₄ gvs⁻¹.

Por lo cual se puede deducir que no todo tipo de co-digestión es viable, pues hay que conocer las características de los sustratos, pues la relación C/N es una pauta importante para poder realizar la digestión anaeróbica, pues si se presenta gran cantidad de nitrógeno habrá que agregar mayor materia orgánica rica en carbono o con una relación C/N alta para reducirla al rango requerido, de igual manera si la relación contiene mayor carbono será necesario agregar materia rica en nitrógeno como lo es el estiércol.

5.8.1 Ácidos Grasos Volátiles

Otro análisis realizado a los microcosmos fueron los ácidos grasos volátiles (AGVs), que nos muestran el comportamiento de los microcosmos dentro del medio y de los microorganismos. En la Figura 25 se observa el comportamiento de los AGVs al igual que el PBM de cada tratamiento, destacando una mayor producción de acetato, propionato y butirato. También se observó que la mayor cantidad de acetato producido por todos los tratamientos se encuentra donde el PBM empieza a aumentar. El propionato mostró dos comportamientos uno donde hay gran cantidad y se reduce a casi nulo, y otro comportamiento donde supera al acetato y nuevamente es menor a éste y casi es nulo al día 50.

El tratamiento con 82 % de nopal presenta un comportamiento diferente a los otros tratamientos con nopal, ya que no presentó AGVs al inicio del experimento como los otros microcosmos.

Los AGVs muestran en la mayoría de los tratamientos, que la presencia de acetato se debe al nopal, dado que en el tratamiento con 100% estiércol su presencia es casi nula, además conforme se aumenta la cantidad de nopal la concentración de acetato es mayor. El pico máximo de acetato se presenta cuando la fase de latencia termina en los resultados experimentales, siendo también muy parecidos a los simulados. La poca presencia de AGVs en el tratamiento con solo estiércol sugiere que, el inóculo al estar adaptado solo a este sustrato, los microorganismos consumen rápidamente la materia, por lo tanto, la presencia de nopal podría reducir su eficiencia inicial.

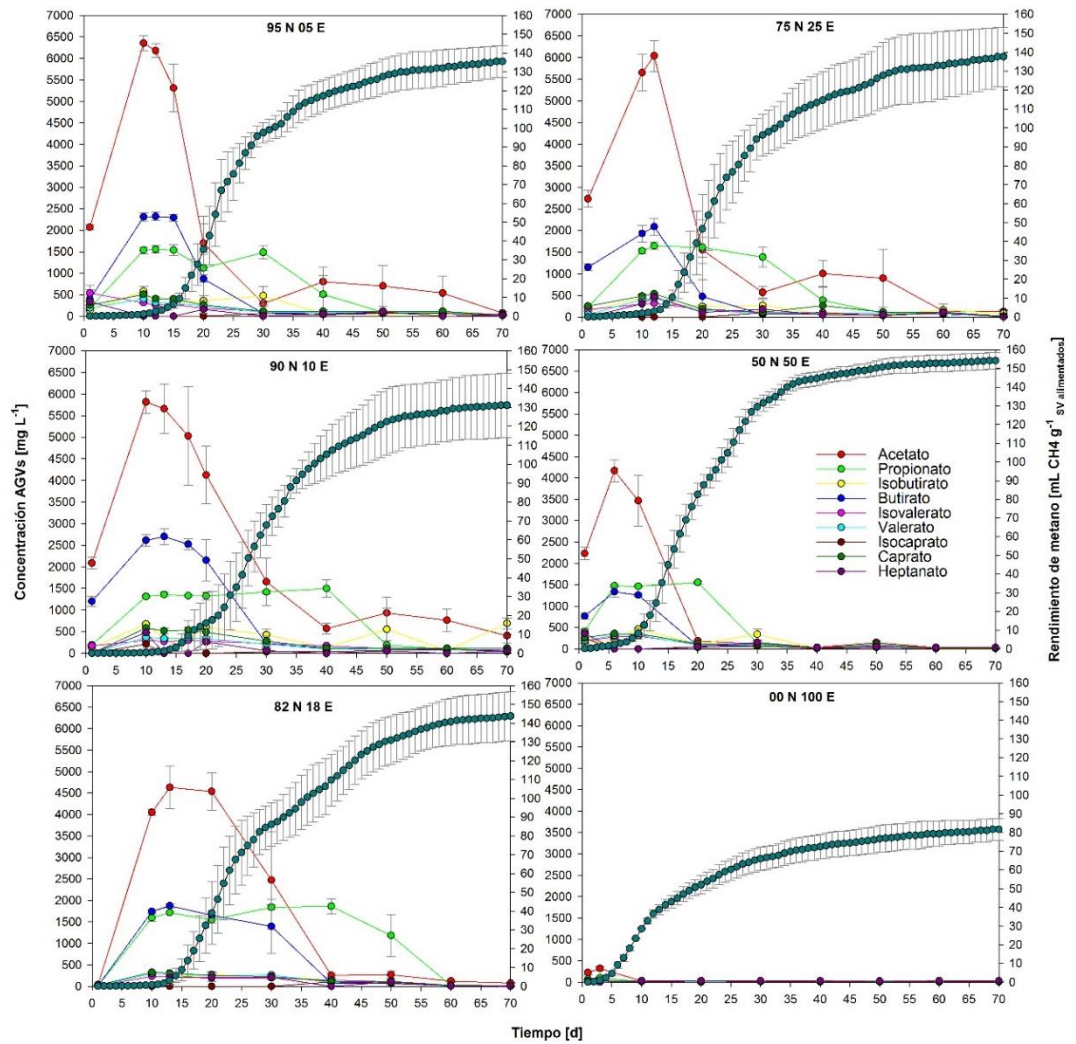


Figura 25. Comportamiento de los AGVs en comparación con el PBM.

De acuerdo con (Bombardiere *et al.*, 2007) el aumento del biogás provoca la disminución de los AGVs, lo cual es comparable con los resultados obtenidos, pues cuando los AGVs empiezan a reducirse en los tratamientos con nopal hay una pendiente mayor en el PBM.

El Cuadro 4 muestra los valores iniciales y finales de cada tratamiento donde se pueden observar los valores promedios obtenidos por cada tratamiento. Todos los estudios fueron necesarios para conocer el comportamiento de los microorganismos, y poder realizar el PBM y el análisis estadístico.

Componentes del microcosmos	95 % N 05 E		90 % N 10 E		82 % N 18 E		75 % N 25 E		50 % N 50 E		00 % N 100 E	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Sólidos Totales (%)	3.98	2.18	4.00	1.58	3.94	1.37	3.97	2.55	3.94	2.79	3.45	2.42
Sólidos Volátiles (% en base a ST)	65.36	37.23	65.13	36.6	64.01	34.86	63.39	39.53	58.49	41.97	52.33	44.09
Metano (%)	0.00	65.38	0.00	64.5	0.00	55.16	0.00	62.33	0.00	59.19	0.85	58.63
Biogás (mL)	122	2997	133	3037	159	2617	229	3180	186	2798	21	1011
Ion Sulfato (mg SO₄ L⁻¹)	3951	7197	3768	5439	2079	2577	4940	9332	4133	7952	3195	5009
Ion Sulfuro (mg H₂S L⁻¹)	8.98	8.13	9.80	7.52	7.15	3.75	11.32	9.21	8.78	8.12	8.70	2.93
DQO (mg DQO L⁻¹)	35583	10700	38083	8617	24458	10533	39750	13367	29750	15033	26000	15367
Amonio (mg N-NH₃ L⁻¹)	302	524	85	384	96	392	267	384	91	312	102	193
pH	6.56	7.61	6.40	7.52	7.04	7.56	6.92	7.54	7.22	7.44	9.68	7.15

Cuadro 4. Valores iniciales y finales de los tratamientos.

5.9 Modelo de Gompertz

Todos los tratamientos fueron analizados en el software Sigma Plot 12.5 mediante el modelo de Gompertz, obteniéndose los resultados del Cuadro 5.

Trata- miento	Porcentaje		Repe- tición	PBM obtenida	PBM estimada	Diferencia (PBM _{obt} -PBM _{est})
	Esti- ércol	No- pal		(mL CH ₄ g ⁻¹ SV alimentados)	(mL CH ₄ g ⁻¹ SV alimentados)	
T1	5	95	a	151.07	142.62	8.45
			b	137.37	134.04	3.33
			c	129.61	115.66	13.95
T2	10	90	a	129.40	123.23	6.17
			b	108.50	102.94	5.56
			c	165.33	168.20	-2.87
T3	18	82	a	151.12	150.24	0.88
			b	120.69	119.97	0.72
			c	164.29	157.56	6.73
T4	25	75	a	159.12	154.86	4.26
			b	112.39	101.10	11.29
			c	149.90	146.68	3.22
T5	50	50	a	159.97	156.97	3.00
			b	146.15	144.52	1.63
			c	159.21	156.76	2.45

			a	74.04	67.44	6.60
T6	100	0	b	88.94	83.88	5.06
			c	90.40	87.40	3.00

Cuadro 5. Análisis del PBM de los tratamientos con el modelo de Gompertz.

En la tabla se observa el número de tratamiento así como su proporción de nopal- estiércol del 4% total dentro de los microcosmos. Las letras indican la repetición de cada microcosmos, pues se realizaron por triplicado. El PBM obtenido es el que se calculó de los resultados experimentales, y el PBM estimado fue el simulado con el modelo de Gompertz en Sigma Plot; con la diferencia entre estos dos, se puede apreciar en la tabla que no es significativa la discrepancia entre ambos por lo que el modelo se adapta a la realidad. Como se observó tanto el PBM obtenido directamente de los microcosmos así como los estimados con el modelo de Gompertz son semejantes.

5.10 Análisis de medias por Tukey

Como se observa en el Cuadro 6 el mejor tratamiento del PBM fue el que contenía 50% nopal y 50% estiércol pues su promedio fue el mayor a todos los tratamientos.

Sin embargo, el tratamiento con 82 % de nopal fue el segundo mayor en el PBM, y como se observa estos tratamientos muestran diferencia significativa con respecto a los restantes.

Otro aspecto importante es la duración de la fase de latencia de los microorganismos, como se observa en el Cuadro 6 el tratamiento con 50% de nopal es el segundo menor, seguido del tratamiento con 82% de nopal. Además, el tratamiento con 50% nopal posee la constante de velocidad de producción de metano mayor.

Tratamiento	Potencial bioquímico de metano		Duración de fase lag		Constante de velocidad de producción de metano	
	[mL CH ₄ g ⁻¹ SV alimentados]		[d]		[d ⁻¹]	
	Media	N	Media	N	Media	N
50% nopal 50% Estiércol	152.8 ^a	3	9.6 ^{b c}	3	7.6 ^a	3
82% nopal 18% Estiércol	142.6 ^a	3	13.2 ^{a b}	3	5.1 ^{b c}	3
75% nopal 25% Estiércol	134.2 ^{a b}	3	13.0 ^{a b}	3	5.9 ^{a b}	3
90% nopal 10% Estiércol	131.5 ^{a b}	3	18.9 ^a	3	6.3 ^{a b}	3
95% nopal 05% Estiércol	130.5 ^{a b}	3	14.8 ^{a b}	3	7.0 ^{a b}	3
00% nopal 100% Estiércol	79.6 ^b	3	1.7 ^c	3	3.0 ^c	3

Tratamientos con la misma letra en la misma columna no muestran diferencia significativa entre ellos.

Cuadro 6. Análisis ANOVA de la simulación por Gompertz.

6. Conclusiones

Se concluye que el nopal es degradable dado que todos los tratamientos con nopal generan metano y por lo tanto la co-digestión entre los sustratos nopal-estiércol es factible y óptima. Ya que tanto la disminución de ST, SV y DQO, afirman la degradación de la materia orgánica.

La co-digestión nopal-estiércol genera un aumento en el PBM del 92%, es decir, cercano a dos veces el rendimiento por la mono-digestión de estiércol vacuno, siendo el tratamiento con mejor PBM la proporción 50% nopal y 50% estiércol, al generar mayor volumen de metano en un menor tiempo y con mayor rapidez.

El modelo de Gompertz se ajusta muy bien a los resultados obtenidos, al obtenerse valores similares a los reales, por lo que podría ser usado para simular otros experimentos con tratamientos de co-digestión nopal- estiércol.

7. Recomendaciones

El tratamiento con 82 % de nopal se inició como todos los tratamientos el mismo día, sin embargo, las tres repeticiones de este tratamiento tardaron 20 días más en generar metano, es decir, al día 30, por lo que se decidió iniciar el tratamiento con las tres repeticiones el día 25 de iniciar los demás tratamientos y monitoreando el tratamiento anterior.

Sin embargo, la repetición del tratamiento se realizó con cladodios diferentes a los utilizados en todos los tratamientos, lo cual puede haber sido factor en el PBM pues a pesar que fue uno de los mayores se nota un cambio en el patrón de los demás tratamientos con nopal, observándose diferentes comportamientos en los análisis.

Será recomendable estudiar un porcentaje menor al 50 % de nopal para conocer si el PBM será mayor al obtenido con este porcentaje, al igual que relaciones intermedias a las estudias para corroborar los datos obtenidos.

También es necesario conocer si el PBM se ve afectada por cladodios diferentes, por lo tanto, será necesario tener un lote grande de cladodios para evitar posibles diferencias entre tratamientos.

Es necesario realizar la co-digestión con inóculo adaptado a la presencia de nopal y estiércol, tal como se está estudiando en el laboratorio de Bioprocesos de Chapingo. Para conocer si el PBM mejora que al solo uso inóculo adaptado al estiércol.

8. Bibliografía

- ABUBAKAR, B. & ISMAIL, N. 2012. Anaerobic digestion of cow dung for biogas production. *ARP journal of engineering and applied sciences*, 7, 169-172.
- AKUZAWA, M., HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M. & IGARASHI, Y. 2011. Distinctive Responses of Metabolically Active Microbiota to Acidification in a Thermophilic Anaerobic Digester. *Microbial Ecology*, 61, 595-605.
- BARRA CARACCIOLO, A., BOTTONI, P. & GRENNI, P. 2013. Microcosm studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems. *Microchemical Journal*, 107, 126-130.
- BELOSTOTSKIY, D. E., ZIGANSHINA, E. E., SINIAGINA, M., BOULYGINA, E. A., MILUYKOV, V. A. & ZIGANSHIN, A. M. 2015. Impact of the substrate loading regime and phosphoric acid supplementation on performance of biogas reactors and microbial community dynamics during anaerobic digestion of chicken wastes. *Bioresource technology*, 193, 42-52.
- BOHUTSKYI, P., CHOW, S., KETTER, B., BETENBAUGH, M. J. & BOUWER, E. J. 2015. Prospects for methane production and nutrient recycling from lipid extracted residues and whole *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion. *Applied Energy*, 154, 718-731.
- BOMBARDIERE, J., ESPINOSA-SOLARES, T., DOMASCHKO, M. & CHATFIELD, M. 2007. Thermophilic anaerobic digester performance

- under different feed-loading frequency. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer.
- BOROWSKI, S., DOMAŃSKI, J. & WEATHERLEY, L. 2014. Anaerobic co-digestion of swine and poultry manure with municipal sewage sludge. *Waste Management*, 34, 513-521.
- BRAUN, R. & WELLINGER, A. Potential of co-digestion. IEA Bioenergy, Task, 2003.
- BUNTNER, D., SPANJERS, H. & VAN LIER, J. B. 2014. The influence of hydrolysis induced biopolymers from recycled aerobic sludge on specific methanogenic activity and sludge filterability in an anaerobic membrane bioreactor. *Water Research*, 51, 284-292.
- CARBALLA, M., REGUEIRO, L. & LEMA, J. M. 2015. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current opinion in biotechnology*, 33, 103-111.
- CIBOROWSKI, P. 2007. Anaerobic Digestion in the Dairy Industry, Minnesota Pollution Control Agency, Air Innovations Conference.
- CORD-RUWISCH, R. 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4, 33-36.
- CHYNOWETH, D. P. 1987. *Anaerobic digestion of biomass*.
- DOMÍNGUEZ-PUERTO, R. (2013). *Adaptación y Aplicabilidad del ADM1 a la Digestión Anaeróbica Termofílica de Pollinaza*. Maestro en Ciencias en Bioprocesos, Instituto Politécnico Nacional, México.

- GUNASEELAN, V. N. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 26, 389-399.
- JIGAR, E., SULAIMAN, H., ASFAW, A. & BAIRU, A. 2011. Study on renewable biogas energy production from cladodes of *Opuntia ficus indica*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44-48.
- KUNDU, K., SHARMA, S. & SREEKRISHNAN, T. 2012. Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic bioreactor. *Bioresource technology*, 118, 502-511.
- LEE, S.-H., KANG, H.-J., LEE, Y. H., LEE, T. J., HAN, K., CHOI, Y. & PARK, H.-D. 2012. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *Journal of Environmental Monitoring*, 14, 1893-1905.
- LI, Q., LI, Y.-Y., QIAO, W., WANG, X. & TAKAYANAGI, K. 2015a. Sulfate addition as an effective method to improve methane fermentation performance and propionate degradation in thermophilic anaerobic co-digestion of coffee grounds, milk and waste activated sludge with AnMBR. *Bioresource technology*, 185, 308-315.
- LI, W.-Z., QIAN, Y., CHANG, C.-C. & JU, M. 2015b. Anaerobic Process. *Water Environment Research*, 87, 1075-1094.
- LÓPEZ, N., Lemus, V. (2013). *Análisis elemental de estiércol y nopal*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- MATA-ALVAREZ, J., DOSTA, J., ROMERO-GÜIZA, M. S., FONOLL, X., PECES, M. & ASTALS, S. 2014. A critical review on anaerobic co-digestion

- achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 412-427.
- MATA-ALVAREZ, J., MACÉ, S. & LLABRÉS, P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74, 3-16.
- MORAES, B., TRIOLO, J. M., LECONA, V., ZAIAT, M. & SOMMER, S. G. 2015. Biogas production within the bioethanol production chain: use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. *Bioresource technology*, 190, 227-234.
- MSHANDETE, A., KIVAIISI, A., RUBINDAMAYUGI, M. & MATTIASSON, B. 2004. Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes. *Bioresource Technology*, 95, 19-24.
- NIE, H., JACOBI, H. F., STRACH, K., XU, C., ZHOU, H. & LIEBETRAU, J. 2015. Mono-fermentation of chicken manure: Ammonia inhibition and recirculation of the digestate. *Bioresource technology*, 178, 238-246.
- NIU, Q., HOJO, T., QIAO, W., QIANG, H. & LI, Y.-Y. 2014. Characterization of methanogenesis, acidogenesis and hydrolysis in thermophilic methane fermentation of chicken manure. *Chemical Engineering Journal*, 244, 587-596.
- NIU, Q., KOBAYASHI, T., TAKEMURA, Y., KUBOTA, K. & LI, Y.-Y. 2015. Evaluation of functional microbial community's difference in full-scale and lab-scale anaerobic digesters feeding with different organic solid waste: Effects of substrate and operation factors. *Bioresource Technology*, 193, 110-118.

- NIU, Q., QIAO, W., QIANG, H. & LI, Y.-Y. 2013. Microbial community shifts and biogas conversion computation during steady, inhibited and recovered stages of thermophilic methane fermentation on chicken manure with a wide variation of ammonia. *Bioresource Technology*, 146, 223-233.
- PASCUAL, A. & FUERTES, B. R. 2008. Desarrollo de sistemas sostenibles de producción y uso de biogás agroindustrial en España: el proyecto Probiogás. *Retema: Revista técnica de medio ambiente*, 21, 8-20.
- RAMOS-SUÁREZ, J. L., MARTÍNEZ, A. & CARRERAS, N. 2014. Optimization of the digestion process of *Scenedesmus* sp. and *Opuntia maxima* for biogas production. *Energy Conversion and Management*, 88, 1263-1270.
- RIVERA-SALVADOR, V., ARANDA-BARRADAS, J. S., ESPINOSA-SOLARES, T., ROBLES-MARTÍNEZ, F. & TOLEDO, J. U. 2009. El Modelo de Digestión Anaeróbica IWA-ADM1: una revisión de su evolución. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 1, 109-118.
- SOTO, M., VÁZQUEZ, M., DE VEGA, A., VILARIÑO, J., FERNÁNDEZ, G. & DE VICENTE, M. 2015. Methane potential and anaerobic treatment feasibility of *Sargassum muticum*. *Bioresource technology*, 189, 53-61.
- STEPHANOPOULOS, G. 2007. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, 315, 801-804.
- SUNDBERG, C., AL-SOUD, W. A., LARSSON, M., ALM, E., YEKTA, S. S., SVENSSON, B. H., SØRENSEN, S. J. & KARLSSON, A. 2013. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS microbiology ecology*, 85, 612-626.

- TORRES-LÓPEZ, O. (2015). *Caracterización físicoquímica del nopal, microalga y purines para determinar el potencial de metano usando digestión anaeróbica*. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- TRINIDAD-SANTOS A. (2007) Utilización de estiércoles. SAGARPA: pp.5.
- VEEKEN, A. & HAMELERS, B. 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technology*, 69, 249-254.
- VERMA, S. 2002. *Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes*. Columbia University.
- WEF, A. A. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Washington, DC*.
- YANG, L., LU, M., CARL, S., MAYER, J. A., CUSHMAN, J. C., TIAN, E. & LIN, H. 2015. Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 76, 43-53.
- ZWIETERING, M., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. & VAN'T RIET, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56, 1875-1881.

9. Anexos

Anexo 1. Código de Sigma Plot para realizar la simulación con el modelo de Gompertz.

Equation	Variables
$f = \text{BMP} \cdot \exp(-\exp(((\text{Rm} \cdot 2.71828) / \text{BMP}) \cdot (\text{lam} - x) + 1))$ fit f to y "fit f to y with weight reciprocal_y "fit f to y with weight reciprocal_ysquare "fit f to y with weight reciprocal_x "fit f to y with weight reciprocal_xsquare "fit f to y with weight reciprocal_pred "fit f to y with weight reciprocal_predsqr "fit f to y with weight weight_Cauchy	$x = \text{col}(1)$ ' {{prevmin: 0.000000}} {{prevmax: 5.000000}} {{intervals: 100}} $y = \text{col}(2)$ reciprocal_y = $1/\text{abs}(y)$ reciprocal_ysquare = $1/y^2$ reciprocal_x = $1/\text{abs}(x)$ reciprocal_xsquare = $1/x^2$ reciprocal_pred = $1/\text{abs}(f)$ reciprocal_predsqr = $1/f^2$ weight_Cauchy = $1/(1+4 \cdot (y-f)^2)$ 'Automatic Initial Parameter Estimate Functions $F(q) = \text{ape}(x, \ln(-\ln((y-\min(y))/(\max(y)-\min(y))))), 1, 0, 1)$
Initial parameters	Constrains
BMP = $\max(y) - \min(y)$ "Auto {{previous: 67.4396}} {{MinRange: 0}} {{MaxRange: 222.129}} Rm = $F(0)[2]$ "Auto {{previous: 2.19091}} {{MinRange: 0}} {{MaxRange: 0.0543394}} $x_0 = \text{if}(F(0)[2] < 0, -F(0)[1]/F(0)[2], 1)$ "Auto {{previous: 0}} $\text{lam} = 1$ ' {{previous: 4.64972e-010}} {{MinRange: 0}} {{MaxRange: 3}}	$\text{lam} > 0$ $\text{BMP} > 0$ $\text{Rm} > 0$

Anexo 2. Código de SAS para el análisis ANOVA con media de Tukey de los resultados obtenidos.

```
data pbm;
input var rep bmp Rm lamda;
datalines;
1      1      142.6229  7.5075  13.3966
1      2      134.038   6.0045  12.532
1      3      115.6553  7.5276  18.446
2      1      123.2274  7.7197  21.1947
2      2      102.9366  5.928   22.6348
2      3      168.1972  5.1781  13.012
3      1      150.242   5.7783  10.9266
3      2      119.9744  4.1964  17.1113
3      3      157.56    5.2458  11.4917
4      1      154.857   6.6408  11.2774
4      2      101.0976  5.1861  16.7868
4      3      146.6795  5.8886  11.0318
5      1      156.9726  7.7788  10.3752
5      2      144.5198  7.3689  10.816
5      3      156.7556  7.7784  7.5961
6      1      67.4396   2.1909  4.727E-10
6      2      83.879   3.1318  2.1247
6      3      87.3978  3.6277  2.9056
;
proc anova;
class var rep;
model bmp Rm lamda=var;
means var/tukey;
run;
```