



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**CENTRO MEXICANO PARA LA PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA
(CMP+L)**



***“EFECTO DE LA BIOAUMENTACIÓN EN LA
GENERACIÓN DE METANO EN UN PROCESO DE
DIGESTIÓN ANAEROBIA TERMÓFILA DE RESIDUOS
ORGÁNICOS”***

Presenta: M. en C. Aixa Kari Gállego Bravo

Directores de Tesis:

**Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez - Centro Interdisciplinario de
Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo CIIEMAD-IPN**

**Dr. Jaime García Mena – Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados CINVESTAV**

Ciudad de México

Junio 2021



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Junio del 2021 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CMP+L para examinar la tesis titulada: Efecto de la bioaumentación en la generación de metano en un proceso de digestión anaerobia termófila de residuos orgánicos del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	<u>Gállego</u>	Apellido Materno:	<u>Bravo</u>	Nombre (s):	<u>Aixa Kari</u>
-------------------	----------------	-------------------	--------------	-------------	------------------

Número de registro: B 1 7 0 7 4 8

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Energía

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 8 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.** Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** ☐ **NO** ☒ **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

El porcentaje de similitud corresponde tanto a frases de uso común como a conceptos técnicos que se manejan dentro del área del conocimiento.

**Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** ☒ **SUSPENDER** ☐ **NO APROBAR** ☐ la tesis por **UNANIMIDAD** ☒ o **MAYORÍA** ☐ en virtud de los motivos siguientes:
El documento final cumple con las características requeridas para una tesis de doctorado.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Director de Tesis
Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez

2º Director de Tesis
Dr. Jaime García Mena

Dra. María Eugenia Gutiérrez Castillo

Dra. Jossis Claudette Romero Ibarra

Dr. Abelardo I. Flores Nolasco

Dr. Abelardo I. Flores Nolasco
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día **16** del mes de **junio** del año **2021**, la que suscribe **Aixa Kari Gállego Bravo** alumna del Programa de **Doctorado en Energía** con número de registro **B170748**, adscrita al **Centro Mexicano para la Producción más Limpia**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez** y del **Dr. Jaime García Mena** y cede los derechos del trabajo titulado **"Efecto de la bioaumentación en la generación de metano en un proceso de digestión anaerobia termófila de residuos orgánicos"**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo electrónico: karigllego@gmail.com, ltovarg@ipn.mx y jgmena@cinvestav.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Aixa Kari Gállego Bravo

Índice

Resumen	1
1 Capítulo: Protocolo de Investigación.....	3
1.1 Introducción	3
1.2 Justificación	4
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivos.....	4
2 Capítulo 2 Marco teórico	6
2.1 Generación de residuos sólidos urbanos a nivel mundial y en México	6
2.2 Uso del biogás como fuente de energía limpia en México	7
2.3 Generalidades de la digestión anaerobia.....	9
2.4 Parámetros de operación	13
2.5 Configuración de digestores.....	15
2.6 Fallas y desequilibrios en la DA	16
2.7 Técnicas para el mejoramiento de la producción de biogás	17
2.8 Mejoramiento de biogás o “Biogas upgrading”	22
2.9 Importancia del seguimiento microbiológico en el proceso de DA	25
2.10 Experiencias en el uso de la bioaumentación.....	26
3 Capítulo 3: Metodología	34
3.1 Diseño experimental.....	34
3.2 Sustrato e Inóculo.....	35
3.3 Cultivo metanogénico para la bioaumentación	35
3.4 Prueba bioquímica de metanización (PBM)	36
3.5 Métodos de análisis.....	40
3.6 Análisis de comunidades microbianas	41
3.7 Análisis estadísticos	43
4 Resultados.....	45
4.1 Caracterización fisicoquímica.....	45

4.2	Rendimiento de biogás y metano	46
4.3	Características fisicoquímicas del digestato	63
4.4	Comunidades microbianas	67
4.4.1	Cultivo metanogénico hidrogenotrófico	67
4.4.2	Prueba bioquímica de metanización	69
5	Discusión	89
6	Conclusiones y recomendaciones.....	94
7	Anexos.....	96
7.1	Cálculos para determinar la prueba bioquímica de metanización	96
7.2	Productos de investigación	98
	Referencias bibliográficas	101

Lista de Tablas

Tabla 1. Plantas de biogás existentes en México.	8
Tabla 2. Géneros microbianos característicos de cada etapa de la digestión anaerobia.	12
Tabla 3. Clasificación de configuraciones de procesos de DA.	16
Tabla 4. Técnicas físicas, químicas y biológicas para la mejora del biogás.	23
Tabla 5. Componentes del medio base mineral.	35
Tabla 6. Descripción de los tratamientos empleados para bioaumentación.	37
Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación de las regiones del gen 16S rDNA con barcode.	42
Tabla 8. Condiciones para la amplificación de la región V3 (bacterias) y V5-V6 (arqueas).	43
Tabla 9. Características fisicoquímicas de la FORSU e inóculo.	45
Tabla 10. Características fisicoquímicas del consorcio	46
Tabla 11. Rendimiento acumulado de biogás de todos los tratamientos.	49
Tabla 12. Composición de metano en biogás durante el proceso de DA.	52
Tabla 13. Rendimiento acumulado de metano de todos los tratamientos.	53
Tabla 14. Composición de metano en biogás en picos de generación.	59
Tabla 15. Características fisicoquímicas del digestato.	64
Tabla 16. Características del digestato de los 3 experimentos.	65
Tabla 17. Características del digestato en el experimento de la digestión semiseca.	66
Tabla 18. Bacteria. Índices de alfa diversidad de todos los grupos y en cada tiempo.	74
Tabla 19. Arquea. Índices de alfa diversidad de todos los grupos y en cada tiempo.	83

Lista de Figuras

Figura 1. Composición de los residuos sólidos urbanos en México.	6
Figura 2. Distribución de la generación de energía primaria, 2017.	8
Figura 3. Etapas principales de la digestión anaerobia.	11
Figura 4. Estrategia experimental.	34
Figura 5. Reactor de acero inoxidable para pruebas de 2L.	40
Figura 6. Región amplificada del gen 16S rDNA para secuenciar. A) Dominio Bacteria. B) Dominio Arquea.	42
Figura 7. Generación de biogás por día de los tratamientos.	48
Figura 8. Rendimiento acumulado de biogás de todos los tratamientos.	51
Figura 9. Generación de metano por día de los tratamientos.	55
Figura 10. Rendimiento acumulado de metano de todos los tratamientos.	56
Figura 11. Rendimientos de biogás y metano de 3 experimentos.	57
Figura 12. Generación de metano por día de los experimentos adicionales.	58
Figura 13. Generación de metano por día en reactores de 2L.	61
Figura 14. Rendimiento acumulado de metano en reactores de 2L.	62
Figura 15. Reactores antes y después del proceso de digestión anaerobia termófila.	65
Figura 16. pH por día en tratamientos de 2L.	66
Figura 17. Reactores antes y después del proceso de digestión anaerobia termófila en reactor de mayor volumen.	67
Figura 18. Bacteria. Abundancia relativa del cultivo metanogénico hidrogenotrófico.	68
Figura 19. Arquea. Abundancia relativa del cultivo metanogénico hidrogenotrófico.	68
Figura 20. Abundancia relativa de los fila bacterianos dominantes de los tratamientos control y con consorcio activo durante 3 tiempos de muestreo.	71
Figura 21. Abundancia relativa de las clases bacterianas dominantes de los tratamientos control y con consorcio activo durante 3 tiempos de muestreo.	72
Figura 22. Abundancia relativa de las taxa bacterianas más abundantes desde clases hasta especies.	73
Figura 23. Bacteria. Índices de Alfa diversidad de todos los tratamientos, considerando todos los tiempos.	76
Figura 24. Bacteria. Análisis de coordenadas principales de todos los tratamientos y todos los días.	77
Figura 25. Bacteria. Análisis LEfSe.	79
Figura 26. Abundancia relativa de las clases de arqueas dominantes de los tratamientos control y con cultivo activo durante 3 tiempos de muestreo.	81

Figura 27. Abundancia relativa de las taxa de arqueas más abundantes desde clases hasta especies.	82
Figura 28. Arquea. Índices de Alfa diversidad de todos los tratamientos, considerando todos los tiempos.	85
Figura 29. Arquea. Análisis de coordenadas principales de todos los tratamientos y todos los días.	86
Figura 30. Arquea. Análisis LEfSe	88

Créditos

El trabajo de investigación que sustenta esta tesis de Doctorado fue realizado en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo del IPN, en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad Zacatenco bajo la dirección del Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez y del Dr. Jaime García Mena con el apoyo financiero de los proyectos de investigación: “Producción de alimentos utilizando composta o digestato en la planta de Composta de Bordo Poniente” SIP número 20172277, “Evaluación de materiales con alto contenido de celulosa y lignina para producir biogás y digestato” SIP número 20180942, “Producción de biogás, digestato y hongos comestibles a partir de biomasa lignocelulósica” SIP número 20195607 y “Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas en la Unidad Zacatenco del Cinvestav” CONACyT-163235 INFR-2011-01. Al apoyo de la beca: CONACyT-SENER Sustentabilidad Energética Agosto 2017 a Julio 2021 y la beca de estímulo institucional de formación de investigadores (BEIFI) de 2017 a 2021.

Agradecimientos

A mis padres y hermano: Por el amor y apoyo que a me han dado en cada paso de mi vida. Por dejarme ser.

Al Dr. Luis Raúl Tovar Gálvez: Por confiar en mí, por creer en mis ideas y por que nunca me negó nada. Gracias Dr. por permitirme estar en su equipo.

Al Dr. Jaime García Mena: Por aceptar ser mi segundo director, por compartir conmigo su conocimiento y porque siempre me hizo parte de su equipo.

A la Dra. María Eugenia Gutiérrez Castillo: Usted fue la primera quien vio potencial en mí, gracias Dra. porque por esa oportunidad, el rumbo de mi vida ha cambiado maravillosamente.

A la Dra. Issis Claudette Romero Ibarra: Por sus valiosas aportaciones y darme otra perspectiva. Por ayudarme en el momento más estresante.

Al Dr. Abelardo I. Flores Vela: Por sus acertados comentarios y ser parte del proyecto.

A la M. en C. Gloria López Jiménez: Por enseñarme un nuevo mundo dentro de la microbiología, por su paciencia, por todo lo que tuvo que hacer para que yo tuviera un lugar para trabajar.

A Andrea Reyes, Aydée Daniela Reséndiz Ramírez y Samara Garduño: Por su compromiso al proyecto, por su arduo trabajo, por su pasión por aprender.

A Mariana Abigail Muñón Díaz: Por permitirme compartirte mi conocimiento y experiencia, y, sobre todo, por ayudarme en un momento que era muy complicado para mí. GRACIAS INFINITAS MARI!!

A mis amigos del CIEMAD: Denise, Bárbara, Ana Lau, Mixtli, Ricardo, Gustavo, Laura y Carla, por su amistad, por su apoyo y por compartir historias.

A mis amigos del CINVESTAV: Fernando, Loan, Marcos, Karinita, Cintia, Daniel, Emmanuel, Arlene, Igrid, Rodrigo y Alberto, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por las risas, por las pláticas.

A Daniel Salcedo Serrano: A pesar de que escogimos diferentes posgrados, siempre has estado para mí, me has escuchado, entendido, y ayudado en todo lo que te he pedido, incluso cuando la distancia que nos separaba era de medio país y meses después en plena pandemia. Gracias a ti pude terminar la última parte del proyecto. Gracias por hacer hasta lo imposible para verme tranquila. Te admiro y estoy muy orgullosa de ti Dani, eres una gran persona.

A Alma Adriana Zárate Arroyo: Por siempre estar a mi lado, por contestar mis llamadas a las 2 am, por ser incondicional, por recordarme quién soy y hasta dónde he llegado, por escucharme y consolarme cuando he sentido que ya no puedo más. Eres mi mejor amiga, mi cómplice de aventuras, mi hermana.

A Juan Carlos Campos Benhumea: Por ser el amigo más apapachador, por tu sabiduría, por los consejos, porque sabes en qué momento necesito parar y tomar un descanso.

A Khemlal Nirmalkar: Si hay alguien quien puede entender a la perfección qué es hacer un doctorado y todo lo que conlleva, ese eres tú. Gracias Khem por estar en mis buenos, malos y terribles momentos. Gracias por entender cuando necesito estar a solas o cuando necesito estar con los míos. Agradezco que nos hayamos encontrado en este camino.

Resumen

En el presente trabajo se empleó la técnica de bioaumentación en un proceso de digestión anaerobia termófila de residuos orgánicos a nivel laboratorio, en el cual se aplicó un inóculo y un consorcio metanogénico hidrogenotrófico, esto a fin de conocer el efecto de su adición en la generación de metano.

La digestión anaerobia (DA) se basa en convertir compuestos orgánicos en biogás en presencia de una comunidad de microorganismos anaerobios. Sin embargo, es un proceso muy complejo tanto por el número de reacciones bioquímicas como por la cantidad de microorganismos involucrados en ellas, pues muchas de estas reacciones ocurren de forma simultánea.

Los microorganismos que se encuentran en el proceso de DA funcionan en sintrofia, es decir, dependen del producto del otro y la falta de un equilibrio adecuado entre los grupos microbianos es la causa principal en la inestabilidad de un reactor, lo que conduce a la disminución o incluso la inhibición del metano. Una de las alternativas para combatir los desequilibrios en los reactores es la técnica de la bioaumentación, la cual consiste en la adición de microorganismos específicos resistentes al estrés y/o más eficientes, en un esfuerzo por mejorar la capacidad de la comunidad microbiana para generar metano.

En este trabajo, el consorcio metanogénico hidrogenotrófico empleado estuvo conformado en su mayoría por el metanógeno *Methanoculleus* y las bacterias *Anaerobaculum* y *S1* (familia Thermotogaceae). A escala laboratorio, el uso del consorcio no aumentó la generación de metano en comparación con el control, sin embargo, el pico de metano se presentó de forma acelerada además de mejorar la calidad de biogás. Por otro lado, en el reactor de mayor volumen, existió un aumento en la producción de metano de un 31% en comparación con el control. Las comunidades microbianas también cambiaron derivado de la adición del consorcio, los metanógenos *Methanosarcina* y *Methanoculleus* estuvieron en mayor abundancia en los tratamientos que tuvieron una mejor generación de metano.

Palabras clave: Bioaumentación, digestión anaerobia, fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, metanógenos.

Abstract

In the present work, the bioaugmentation technique was used in a thermophilic anaerobic digestion process of organic waste at laboratory scale, in which an inoculum and a hydrogenotrophic methanogenic consortium were used, to know the effect of its addition on the generation of methane.

Anaerobic digestion (AD) is based on converting organic compounds into biogas in the presence of a community of anaerobic microorganisms. However, it is a very complex process due to the number of biochemical reactions and the many microorganisms involved in them, since most of these reactions occur simultaneously.

The microorganisms found in the AD process work in syntrophy, they depend on the product of the other microorganisms, and the lack of an adequate balance among the microbial groups is the main cause in the instability of a reactor, which leads to the decrease or even the inhibition of methane production. One of the alternatives to avoid imbalances in reactors is the bioaugmentation technique, which consists of the addition of specific microorganisms resistant to stress or more efficient or both, to improve the capacity of the microbial community to generate methane.

In this work, the hydrogenotrophic methanogenic consortium used consisted mostly of the methanogen *Methanoculleus* and the bacteria *Anaerobaculum* and *S1* (family Thermotogaceae). On a laboratory scale, the use of the consortium did not increase the generation of methane compared to the control, however, the methane peak occurred in an accelerated manner in addition to improving the quality of biogas. On the other hand, in the larger volume reactor, there was an increase of 31% in the production of methane compared to the control. The microbial communities also changed derived from the addition of the consortium, the methanogens *Methanosarcina* and *Methanoculleus* were in greater abundance in the treatments that had a better methane yield.

Keywords: Bioaugmentation, anaerobic digestion, organic fraction of urban solid waste, methanogens.

1 Capítulo: Protocolo de Investigación

1.1 Introducción

En la actualidad, el uso de los combustibles convencionales y el efecto de los gases de efecto invernadero en el medio ambiente han llevado a reforzar la investigación relacionada a la producción de combustibles alternativos a partir de recursos biológicos (Peng et al., 2014). La producción de biogás mediante digestión anaerobia (DA), es considerada una de las tecnologías más sustentables pues proporciona el considerable beneficio de generar energía a partir de biomasa, incluidas plantas y residuos vegetales (Mao et al., 2015; Strang et al., 2017).

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico y degradativo en el cual parte de los materiales orgánicos de un sustrato (residuos animales, vegetales, fracción orgánica, etc.) son convertidos en biogás por un consorcio microbiano que son sensibles o completamente inhibidas por el oxígeno (Varnero Moreno, 2011). El biogás es una mezcla de metano (CH_4) en un 50 – 80%, dióxido de carbono (CO_2) en un 20 – 50% y elementos traza como amoníaco (NH_3), sulfuro de hidrógeno (H_2S) e hidrógeno (H_2), (Demirbas & Ozturk, 2005), y puede ser valorizado para producir electricidad y calor (Goux et al., 2016).

No obstante, la DA a menudo sufre de inestabilidad en el proceso debido a: altos niveles de sustancias tóxicas inorgánicas como amonio (NH_4^+), fosfatos, sulfatos o iones de metales, variaciones en los parámetros de operación, como temperatura y pH, así como una falta de equilibrio adecuado entre los grupos microbianos (Nzila, 2017). Una de las alternativas para evitar estos desequilibrios es la bioaumentación, la cual consiste en la adición de microorganismos específicos a un sistema biológico a fin de mejorar su desempeño (Tale et al., 2015). A menudo, cepas puras o consorcios microbianos son utilizados para aumentar el rendimiento del biogás, el grado de digestión, o mejorar la degradabilidad de los sustratos (Neumann & Scherer, 2011).

En el presente trabajo se pretende emplear la técnica de bioaumentación, utilizando un consorcio metanogénico hidrogenotrófico proveniente de un inóculo conocido, para mejorar el rendimiento del metano en un proceso de digestión anaerobia termófilo que trate residuos orgánicos, a nivel laboratorio.

1.2 Justificación

La digestión anaerobia se ha convertido en un método atractivo para tratar residuos orgánicos dado su potencial para generar energía renovable mediante biogás y un digestato que puede ser usado como mejorador de suelos. Aunque la DA ofrece grandes beneficios, el arranque y operación del proceso suele ser complejo.

Con la técnica de bioaumentación, la cual consiste en añadir microorganismos específicos a un sistema para mejorar una determinada actividad, se ha podido tanto estabilizar reactores con alta carga orgánica, facilitar el establecimiento de poblaciones específicas en comunidades microbianas, así como mejorar el rendimiento del metano.

La realización de este trabajo contribuiría, en su mayoría, a la aportación de conocimiento referente al uso de la bioaumentación como técnica viable para el mejoramiento del rendimiento del metano mediante el empleo de un consorcio metanogénico enriquecido, junto con un inóculo conocido a nivel laboratorio. A pesar de que los datos a obtener correspondan a pruebas de laboratorio, se podrían establecer recomendaciones con respecto a la importancia del seguimiento de las comunidades microbianas, el manejo y preservación de consorcios microbianos, entre otros, con la finalidad de aportar la mayor información que ayude a la correcta operación de un digestor de mayores dimensiones.

1.3 Hipótesis

El uso de la bioaumentación en un proceso de digestión anaerobia termófila que trate una muestra de residuos orgánicos a nivel laboratorio, producirá mayor cantidad de metano.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Usar la técnica de bioaumentación en un proceso de digestión anaerobia termófila a nivel laboratorio, para obtener mayor producción de metano, mediante el empleo de un inóculo enriquecido con un consorcio metanogénico específico.

1.4.2 Específicos

1. Crear microorganismos metanógenos hidrogenotróficos a partir de un inóculo conocido con el uso de medios de cultivo y condiciones de crecimiento específicos, a fin de obtener un consorcio que será probado para el enriquecimiento.

2. Identificar el consorcio aislado mediante técnicas de biología molecular para conocer con mayor certeza qué microorganismos serán adicionados al enriquecimiento.
3. Preparar el consorcio de microorganismos que previamente fue aislado e identificado para obtener el inóculo que será empleado para el enriquecimiento.
4. Adicionar el consorcio de microorganismos en diferentes proporciones al inóculo que será enriquecido, para conocer el efecto que tendrá en la generación de metano, mediante una inoculación inicial.
5. Realizar la prueba de biometanización de los inóculos con y sin enriquecimiento para conocer la cantidad de metano generado mediante desplazamiento de columna y cromatografía de gases.
6. Caracterizar los dominios de Bacteria y Arquea mediante secuenciación masiva Ion Torrent, para conocer si existen cambios en las comunidades microbianas al usar la técnica de bioaumentación.

2 Capítulo 2 Marco teórico

2.1 Generación de residuos sólidos urbanos a nivel mundial y en México

La generación mundial de residuos sólidos urbanos (RSU) es aproximadamente 1.3 miles de millones de toneladas por año y se espera que incremente a aproximadamente 2.2 miles de millones para el año 2025. La generación de RSU está influenciada principalmente por el desarrollo económico, el grado de industrialización y hábitos de la población. Generalmente, a mayor desarrollo económico y tasa de urbanización, mayor la generación de residuos (Bong et al., 2018).

El incremento de la generación de los RSU y su manejo es una de las mayores preocupaciones en muchos países, por lo que la implementación de tecnologías para su manejo es fundamental. Entre los RSU generados, los residuos orgánicos son los más abundantes (Bong et al., 2018).

La generación de RSU en México, de acuerdo con cifras del 2015, fue de 53.1 millones de toneladas, lo que significó un aumento del 61.2% con respecto a 2003. La generación per cápita alcanzó 1.2 kg en promedio diariamente en el mismo año. En la Figura 1, se muestra la composición de los RSU de México, siendo los residuos orgánicos los predominantes con un 52.4% (SEMARNAT, 2015).

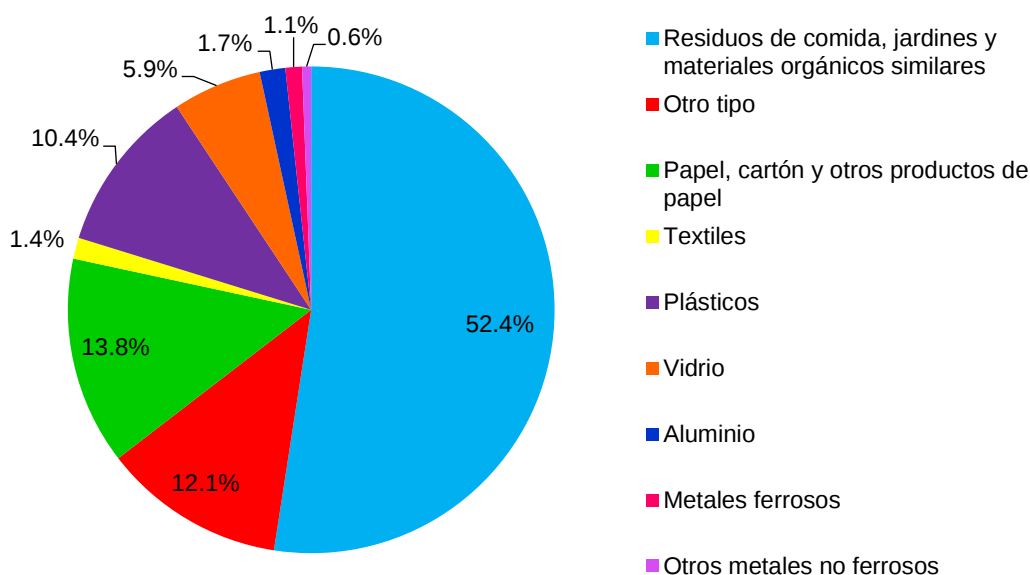


Figura 1. Composición de los residuos sólidos urbanos en México (SEMARNAT, 2015).

En el caso de la Ciudad de México, el último reporte indica que cada día se generan poco más de 13,000 toneladas. Si se consideran los porcentajes previamente mencionados, se puede asumir que la ciudad de México genera al día 6,850 toneladas de residuos orgánicos, de los cuales únicamente 1,383 toneladas son llevadas a las diferentes plantas de composta que se encuentran en la ciudad (SEDEMA-CDMX, 2019).

La Ciudad de México ha contemplado como meta, dentro del Programa de Gestión Integral de los residuos sólidos para la Ciudad de México 2016-2020, la biodigestión de residuos biodegradables susceptibles de ser aprovechados (2,500 ton/día) (Gaceta Oficial de la Ciudad de México, 2016).

2.2 Uso del biogás como fuente de energía limpia en México

La Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (LPDB) define a los bioenergéticos como “combustibles obtenidos de la biomasa provenientes de materia orgánica de las actividades agrícola, pecuaria, silvícola, acuacultura, algacultura, residuos de la pesca, domésticas, comerciales, industriales, de microorganismos y de enzimas, así como sus derivados, producidos por procesos tecnológicos sustentables que cumplan con las especificaciones y normas de calidad establecidas por la autoridad competente en los términos de la LPDB”.

En México, se emplean dos tipos de bioenergía: biomasa (bagazo de caña y leña) y biogás para la generación de energía. Estas fuentes son otra alternativa para la sustitución de combustibles fósiles. A pesar de que en años recientes ha crecido su potencial, los datos revelan que estos dos tipos de bioenergía aportaron en 2017, el 5.2% de la producción total de energía primaria. En términos de Peta Joules, la biomasa aportó 367.18 PJ, mientras que el biogás únicamente 2.52 PJ (Pérez-Denicia et al., 2017; SENER, 2016, 2017).

La Figura 2 muestra la composición de la producción de energía primaria en México, en el año 2017.

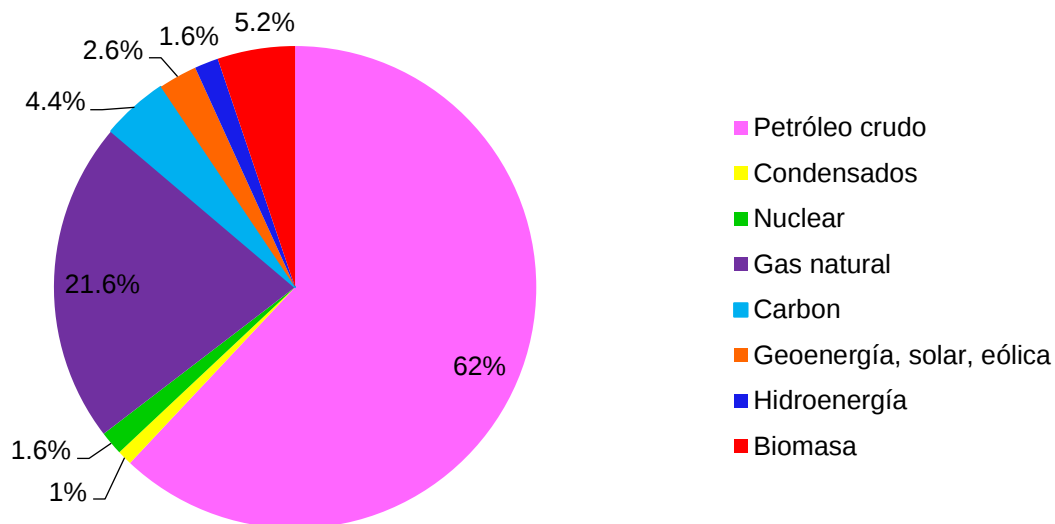


Figura 2. Distribución de la generación de energía primaria, 2017 (SENER, 2016).

De acuerdo con el trabajo realizado por Pérez-Denicia et al., 2017, en México existen 15 plantas de biogás, las cuales se describen en la Tabla 1. Cabe resaltar que hasta el momento, la Comisión Federal de Electricidad (CFE) no produce energía mediante biomasa (Pérez-Denicia et al., 2017).

Tabla 1. Plantas de biogás existentes en México.

Estado	Municipio	Nombre	Generación (GWh/año)
Aguascalientes	Aguascalientes	Energía Verde de Aguascalientes	12.33
Chihuahua	Delicias	Energía Lactea	0.11
	Juárez	Energía Eléctrica de Juárez	25.51
Durango	Durango	Ener-G	2.03
Estado de México	Ecatepec de Morelos	La Costeña y Jugomex	4.51
	Atizapán	Relleno Sanitario de Puerto de Chivos	3.5
Guanajuato	León	Ecosys III	1.36
Jalisco	Tlajomulco de Zúñiga	Atlatec, Planta El Ahogado	7.58
	Zapopan	Renova Atlatec	0
Nuevo León	San Nicolás de Los Garza	Planta Norte (Gob. De Nuevo León)	0

	Pesquería	Planta Dulces Nombres	0.59
	Salinas Victoria	Bioenergía de Nuevo León	101.58
Puebla	Nopalucan	Empacadora San Marcos	0
Querétaro	Santiago de Querétaro	Atlatec, Planta El Ahogado	2.42
	Querétaro	TMQ Generación Energía Renovable	0

Por otro lado, Rios & Kaltschmitt, 2016, realizaron un estudio para proporcionar una metodología para identificar el potencial teórico, técnico y económico de la generación de electricidad a través del biogás proveniente de los residuos orgánicos de México, del cual derivaron las siguientes conclusiones:

- El potencial teórico mostró que la mayoría de los municipios de México presentan condiciones para la recolección de biogás a partir de residuos orgánicos y su transformación en electricidad. Se estima que este potencial es alrededor de 168 TWh/año.
- El potencial técnico se calcula en alrededor de 10.2 TWh/año. Este potencial representa solo el 6% del potencial teórico estimado y puede ubicarse en alrededor del 65% de los municipios mexicanos (1596 municipios).
- El potencial económico muestra que alrededor de 391 municipios en México podrían proporcionar un promedio de 6.4 TWh/año si producen biogás a partir de sus residuos orgánicos y lo utilizan para la producción de electricidad con base en la tecnología comercial disponible y las tarifas de electricidad actuales en México.

2.3 Generalidades de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA) y el compostaje son tratamientos biológicos con enfoques plausibles para el manejo de residuos orgánicos y el reciclaje de nutrientes.

El compostaje descompone la materia orgánica de forma aerobia y produce composta además de liberación de calor y dióxido de carbono.

Por otro lado, la digestión anaerobia es el proceso más prometedor y sustentable para el tratamiento de residuos orgánicos pues convierte la materia orgánica en energía (en forma de biogás) y digestato. La DA es utilizada para degradar varios tipos de residuos orgánicos, incluyendo biomasa lignocelulósica, residuos de comida, residuos agroindustriales,

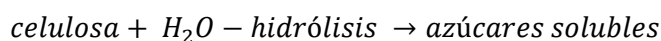
excretas de animales y aguas residuales (Campuzano & González-Martínez, 2016; Lin et al., 2018).

2.3.1 Proceso de la digestión anaerobia

La DA es un proceso bioquímico de múltiples etapas, en donde, macromoléculas se convierten en compuestos más pequeños y finalmente en metano. Los microorganismos son la esencia de los digestores y la eficiencia de la DA depende principalmente de una activa comunidad microbiana (Wang et al., 2018; Xu et al., 2018).

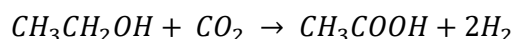
El proceso se divide en 4 etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, cada una de ellas, llevadas a cabo por diferentes comunidades microbianas específicas (Wang et al., 2018). Dependiendo de la composición del sustrato, la hidrólisis o la metanogénesis pueden ser las etapas limitantes, en caso de sustratos orgánicos complejos, la hidrólisis es la etapa limitante (Brémond et al., 2018).

Durante la hidrólisis, polímeros complejos como los carbohidratos, proteínas y lípidos son degradados en azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. Este proceso de descomposición ocurre principalmente por la actividad de enzimas extracelulares (lipasas, proteasas, celulasas y amilasas) secretadas por bacterias hidrolíticas:



Posteriormente, durante la acidogénesis, las bacterias acidogénicas transforman los productos de la hidrólisis en ácido acético y compuestos intermedios como etanol, ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta (C3-C6), hidrógeno y dióxido de carbono. Las metilaminas, el sulfuro de metilo, la acetona y el metanol pueden ser usados directamente para la metanogénesis.

Durante la acetogénesis, los productos intermedios de la acidogénesis se convierten en acetato, formato, dióxido de carbono e hidrógeno por bacterias acetogénicas sintróficas.



Finalmente, la metanogénesis puede llevarse a cabo mediante dos vías. La primera vía es la metanogénesis acetoclástica en donde los metanógenos rompen el ácido acético en metano, mientras que la segunda vía es mediante la reducción del dióxido de carbono con

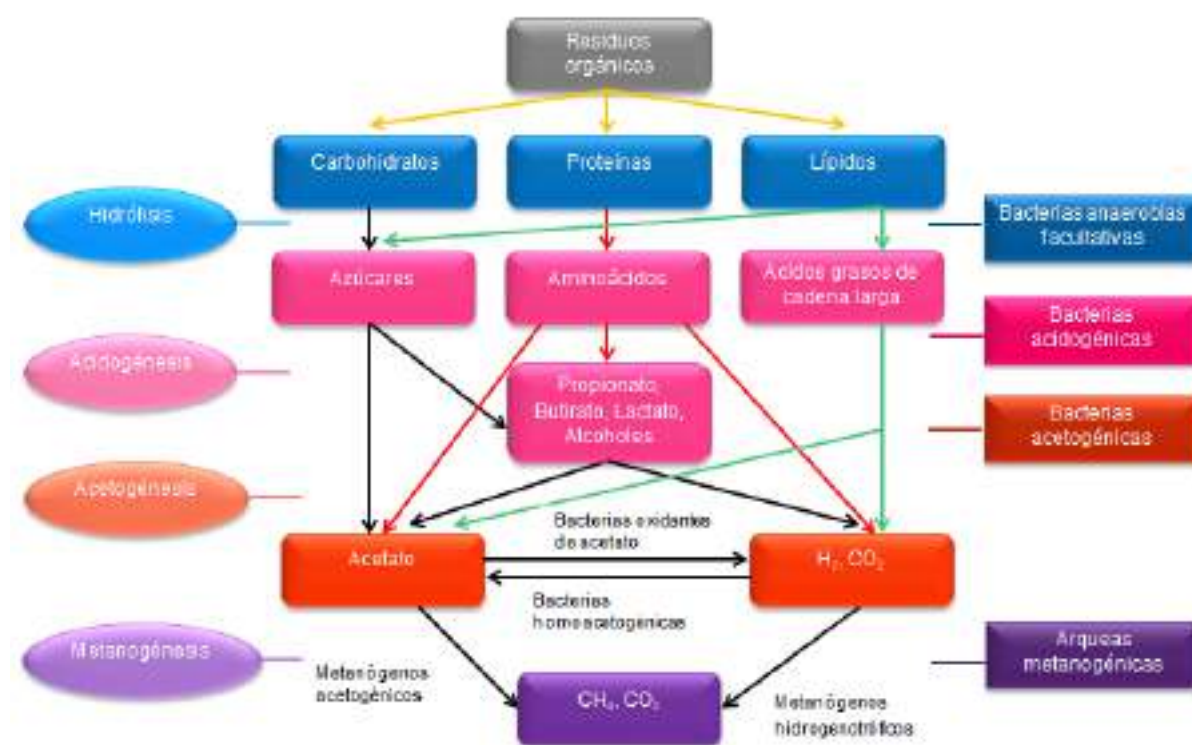
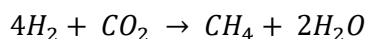


Figura 3. Etapas principales de la digestión anaerobia (Wang et al., 2018).

Tabla 2. Géneros microbianos característicos de cada etapa de la digestión anaerobia.

Hidrólisis	<i>Clostridium</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Bacillus</i> convierten proteínas a péptidos y aminoácidos.
	<i>Clostridium</i> , <i>Acetovibrio celluliticus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacteroides</i> transforman carbohidratos a azúcares solubles.
	<i>Clostridium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> convierten lípidos a ácidos grasos de cadena larga, o alcohol a glicerol.
	Otros: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteobacteria</i> .
Acidogénesis	<i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Sarcina</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulforomonas</i> transforman aminoácidos a ácidos grasos, acetato y amoníaco.
	<i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Streptococcus</i> convierten azúcares a ácidos grasos.
Acetogénesis	<i>Clostridium</i> , <i>Syntrophomonas wolfei</i> transforma ácidos grasos a alcoholes a hidrógeno y acetato.
	<i>Syntrophomonas wolfei</i> , <i>Syntrophomonas wolinii</i> convierten ácidos grasos volátiles y alcoholes a acetato e hidrógeno.
Metanogénesis	<i>Methanosaeta</i> , <i>Methanosarcina</i> (metanógenos acetoclásticos) convierten el acetato en metano y dióxido de carbono.
	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanospirillum</i> (metanógenos hidrogenotróficos) transforman el hidrógeno y el dióxido de carbono en metano.

Referencia: (Akunna, 2015)

2.3.2 Biogás

El biogás es considerado como uno de los recursos (dentro de las energías renovables) más viables en términos económicos y ambientales (Mirmohamadsadeghi et al., 2019). El biogás es el producto del proceso biológico de digestión anaerobia, y es una mezcla de gases compuesta por metano (CH_4) en un rango de 50-70% y dióxido de carbono (CO_2) entre un 30-50%. Aparte de estos dos gases, el biogás contiene pequeñas cantidades de otros compuestos como nitrógeno (N_2), vapor de agua (H_2O), oxígeno (O_2), ácido sulfhídrico (H_2S), amoníaco (NH_3) hidrocarburos y siloxanos, los cuales son considerados como contaminantes (Angelidaki et al., 2018).

El contenido energético del metano descrito por el poder calorífico inferior (PCI) es de 50.4 MJ/kg CH_4 o 36 MJ/m³ CH_4 a condiciones estándar (STP). El biogás que contiene un

porcentaje de metano de entre 60-65%, el PCI es aproximadamente 20-25 MJ/m³ CH₄ (Angelidaki et al., 2018).

Dependiendo del nivel de purificación del biogás, éste puede ser utilizado como fuente de energía calorífica, generación de energía eléctrica o como combustible para vehículos, sin embargo para las últimas dos aplicaciones, el biogás debe ser “limpiado” antes de inyectarlo a la red eléctrica o a los vehículos (Mirmohamadsadeghi et al., 2019; Nghiem et al., 2017). En las secciones posteriores se describirán algunas de las técnicas empleadas a fin de mejorar la calidad del biogás.

2.4 Parámetros de operación

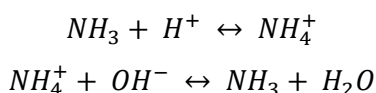
2.4.1 pH

El pH óptimo para que pueda darse la metanogénesis se encuentra en un rango de entre 6.8 – 8. La generación de metano puede suprimirse cuando los valores de pH son menores a 6, esto debido a la acumulación de ácidos grasos volátiles o cuando es mayor a 8.5 por acumulación de amoníaco. Sin embargo, existen dos sistemas naturales de amortiguamiento que mantienen el pH en valores neutros.

- Ácido carbónico / bicarbonato, previene valores bajos de pH.



- Amoníaco / amonio, previene valores altos de pH.



2.4.2 Temperatura

Los digestores pueden operar en condiciones psicrófilas (10-20°C), mesófilas (32-45°C) o termófilas (55-70°C). Mantener la temperatura constante en los reactores es muy importante pues los metanógenos son sensibles a las fluctuaciones de este parámetro, en particular, los metanógenos termofílicos son menos diversos que los mesofílicos. La DA termófila tiene ventajas sobre la mesofílica, pues con esta configuración no es necesaria la sanitización del digestato, hay menos solubilidad del oxígeno, menor inhibición por acumulación de amoníaco. Sin embargo, la DA mesofílica sigue siendo principalmente utilizada por su mayor estabilidad frente a cambios ambientales y menos gasto energético (Kothari et al., 2014; Mirmohamadsadeghi et al., 2019).

2.4.3 Tiempo de retención (TR) y carga orgánica (OLR)

El TR se define como el tiempo requerido para la completa degradación de la materia orgánica, mientras que la OLR se refiere a la cantidad de sustrato que se alimenta al sistema por día por el volumen del digestor esto en reactores continuos.

El TR es inversamente proporcional a la tasa de degradación; a baja tasa de degradación, mayor el TR. Un incremento en el TR conduce a una mayor reducción de sólidos volátiles, mayor volumen de digestor y mayor aclimatación a variaciones de pH y compuestos tóxicos. Sin embargo, los TR más bajos dan como resultado un menor volumen de digestor requerido y por lo tanto un menor costo de inversión. El TR óptimo depende de la temperatura, la carga orgánica y la composición del sustrato (Mirmohamadsadeghi et al., 2019). Un tiempo de retención óptimo debe permitir la degradación de al menos el 75% (SV) del sustrato (Croce et al., 2016).

LA OLR se expresa como kg de sólidos volátiles (SV) o demanda química de oxígeno (DQO) por día por m³ (kg SV/ m³/día).

$$OLR = \frac{\text{sólidos volátiles}}{\text{Tiempo de retención}}$$

$$\text{Tiempo de retención} = \frac{\text{Volumen del reactor}}{\text{Flujo de alimentación (sustrato) en el digestor}}$$

Este parámetro también influye en la comunidad microbiana involucrada en el proceso y por ende en el rendimiento del biogás. El aumento de la carga orgánica hasta cierto punto puede aumentar la producción de biogás, sin embargo, existe el riesgo de causar una acidificación irreversible y fracaso del proceso si se llegara a sobrepasar de este punto (Kothari et al., 2014; Mirmohamadsadeghi et al., 2019). Kaparaju et al., 2009 observó que al incrementar la OLR (2.8 a 6.97 kg SV/m³/día) la generación de biogás incrementó, sin embargo, la producción de metano bajó en un 11% (Kaparaju et al., 2009). A OLR mayores de 8 g SV/L/día se ha observado una falla en el proceso debido a la acumulación de ácidos grasos (Pohl et al., 2013).

Con base en la cantidad de sólidos del sustrato, los sistemas de DA se pueden clasificar en 3 categorías:

- Digestión anaerobia húmeda: menos del 15% de sólidos totales (ST).

- Digestión anaerobia seca: entre 15-20% de ST.
- Digestión anaerobia extra seca: entre 20-40% de ST.

2.4.4 Agitación

La agitación en el proceso de DA puede mejorar el contacto entre sustrato e inóculo acrecentando la hidrólisis, además de asegurar una distribución homogénea de sustrato y microorganismos, y se evita la formación de espuma (Yang et al., 2021).

Existen 3 tipos de agitación: mecánica, hidráulica (recirculación del licor) y recirculación de biogás.

La agitación mecánica puede mejorar en gran medida la desintegración del sustrato, debido a su gran radio de acción, sin embargo, en términos de costo de mantenimiento/operación es costosa en comparación con la recirculación de biogás y la agitación hidráulica. La mezcla hidráulica generalmente solo es adecuada para reactores pequeños con bajas concentraciones de sólidos, pues muestra dificultades para mezclar bien el sustrato y el lodo. Además, presenta ocurrencia de cortocircuitos y “zonas muertas” (zona sin agitación).

La agitación mediante recirculación de biogás logra una buena transferencia de masa y calor con bajo consumo de energía, además de necesitar una configuración simple dentro del digestor pues no tiene partes móviles. Sin embargo, este tipo de agitación puede no ser la mejor opción si la producción de biogás es baja. Por otro lado, es necesaria la instalación de motores a prueba de explosiones y dispositivos de seguridad para el bombeo de biogás, los cuales suelen ser costosos (Yang & Deng, 2020; Yang et al., 2021).

2.4.5 Inóculo

Para la DA, la calidad y cantidad de inóculo es un parámetro vital que afecta a las cuatro etapas de la DA y es indispensable para la puesta en marcha inicial de los digestores. Uno de los inóculos más apropiados son, aquellos lodos que ya están aclimatados al sustrato y a las mismas condiciones del proceso (Kothari et al., 2014; Meegoda et al., 2018; Mirmohamadsadeghi et al., 2019).

2.5 Configuración de digestores

En la Tabla 3 se presenta un resumen de las posibles configuraciones en las que se pueden operar los digestores. Cabe destacar que independientemente de la configuración, los reactores pueden operar a temperaturas mesofílicas o termofílicas.

Tabla 3. Clasificación de configuraciones de procesos de DA.

Sistema	Descripción
1. Alimentación al digesto	
Por lote (Batch)	Los reactores se cargan una vez con el sustrato y el inóculo. Se sellan y se dejan operar hasta que la digestión está completa. El digestor se vacía y se empieza de nuevo.
Continuo	Los reactores se alimentan continuamente y los materiales que no fueron completamente degradados se eliminan del fondo del reactor.
2. Etapas	
Etapas simple	Todos los pasos de la DA se llevan a cabo en un mismo reactor.
Etapas múltiples	Son varios reactores, a menudo se separa el proceso de fermentación (hidrólisis y acidogénesis) de la metanogénesis.
3. Sustrato	
Co-digestión	El material orgánico se mezcla con otros sustratos. Esta técnica podría mejorar el proceso de digestión y por ende el rendimiento del biogás.

Referencia: (Kothari et al., 2014)

2.6 Fallas y desequilibrios en la DA

Las causas típicas de la inestabilidad del proceso de DA incluyen sobrecarga orgánica, inhibición por amoníaco, acidificación e inhibición por ácidos grasos de cadena larga. Entre los indicadores de advertencia más efectivos se encuentran: la producción de biogás, el pH, la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y la alcalinidad.

Durante todo el proceso, los inhibidores de DA pueden clasificarse en dos grupos: sustancias introducidas en el sistema a través de la alimentación y componentes intermedios que son inhibidores a alta concentración.

Los sustratos de desechos de alimentos y desechos vegetales con una alta relación C/N, pueden acumular fácilmente AGV durante el proceso de degradación, lo que resulta en un pH más bajo y una disminución de la producción de biogás. Los sustratos con altas concentraciones de proteínas o nitrógeno, como el estiércol y los productos lácteos, pueden formar altos niveles de amoníaco libre, que es tóxico para los microorganismos

metanogénicos, lo que resulta en una baja producción de biogás. Los sustratos que contienen antibióticos o elementos pesados, como los lodos de aguas residuales municipales pueden inhibir los metanógenos, lo que resulta en la acumulación de intermediarios inhibidores. Además, la perturbación operativa, como la variación de temperatura, también puede interrumpir o parar el proceso de DA (Nguyen et al., 2019; Pramanik et al., 2019; Wu et al., 2019).

2.7 Técnicas para el mejoramiento de la producción de biogás

Como se ha descrito en las secciones anteriores, el proceso de DA es complejo y susceptible a presentar fallas o desequilibrios. En la presente sección se describirán algunas de las técnicas que se emplean a fin de mejorar la producción de biogás y/o rendimiento de metano.

2.7.1 Pretratamientos en la DA

Diferentes enfoques han sido aplicados para mejorar la producción de biogás tales como: co-digestión, pretratamientos para incrementar la biodegradabilidad de los residuos, mejora en la configuración y operación del reactor, dosis de aditivos para estimular la actividad de los microorganismos y/o reducir la concentración de agentes inhibidores (Romero-Güiza et al., 2016).

Los pretratamientos se consideran necesarios para manejar las limitaciones del sustrato hacia su uso óptimo en la DA. Se pueden distinguir 4 tipos diferentes de pretratamientos: mecánicos, térmicos, químicos y biológicos. Los dos primeros ya se aplican a gran escala para una variedad de sustratos, sin embargo, sus altas demandas de calor y/o electricidad están restringiendo sus beneficios. Los tratamientos químicos, por el momento están limitados a escala laboratorio debido a su costo y sus consecuencias ambientales, mientras que los tratamientos biológicos están ganando interés progresivamente (Brémond et al., 2018; Romero-Güiza et al., 2016).

2.7.1.1 Pretratamientos mecánicos

El pretratamiento mecánico desintegra y/o tritura partículas sólidas de los sustratos, liberando así compuestos celulares y aumentando el área superficial. Las técnicas incluyen: la sonicación, homogenización a alta presión y maceración para reducir el tamaño de partícula de sustrato. Varios estudios han verificado que con el tamaño reducido de las partículas se mejora la accesibilidad del área de superficie a los microorganismos, lo que

resulta en una mayor disponibilidad de nutrientes y aumenta el proceso anaerobio. Sin embargo, la reducción extrema del tamaño de partícula desencadena la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) con una disminución de la solubilidad y la producción de metano.

Con el tratamiento con ultrasonido, una sonda vibratoria interrumpe mecánicamente en la estructura celular, reduciendo el tamaño de partícula, a baja frecuencia (20-40 kHz) mejorando así la penetración microbiana a los sustratos.

Las ventajas del pretratamiento mecánico incluyen la no generación de olores, una fácil implementación, una mejor deshidratación del residuo final y un consumo moderado de energía. Mientras que las desventajas son la no eliminación de patógenos y la posibilidad de obstrucción del equipo (Ariunbaatar et al., 2014; Paritosh et al., 2018).

2.7.1.2 Pretratamientos térmicos

El pretratamiento térmico modifica la estructura de la parte insoluble del sustrato y los hace susceptibles de degradación. El impacto fundamental del tratamiento térmico es la ruptura de la pared celular y la solubilización del material orgánico. El tratamiento térmico a temperaturas significativamente altas ($> 170^{\circ}\text{C}$) puede dar lugar a la formación de enlaces y aglomeración de partículas. El principal efecto del pretratamiento térmico es la desintegración de las membranas celulares, lo que resulta en la solubilización de compuestos orgánicos. Con respecto a los sustratos lignocelulósicos, las temperaturas superiores a 160°C provocan no solo la solubilización de la hemicelulosa sino también de la lignina, sin embargo, se liberan compuestos fenólicos que pueden inhibir a las poblaciones microbianas (Ariunbaatar et al., 2014).

2.7.1.3 Pretratamientos químicos

El tratamiento químico se utiliza para romper los enlaces en la pared celular, utilizando una gama de agentes químicos (ácidos, bases y oxidantes).

Con el tratamiento alcalino sucede la saponificación, lo que provoca el aumento de los sólidos, por lo que la superficie se expande y los sustratos están disponibles para los microorganismos.

La ozonación es una técnica mediante la cual se puede lograr una mayor tasa de hidrólisis, sin embargo, se cree que este tratamiento es menos apropiado para sustratos fácilmente

biodegradables o menos recalcitrantes. Aunado a esto, se ha reportado que con esta técnica existe una disminución del pH, por lo tanto, el uso de un álcali para neutralizar el pH se considera un paso adicional antes del inicio de la DA.

El pretratamiento con ácido es atractivo para los sustratos lignocelulolíticos ya que solubiliza las hemicelulosas, condensa la lignina que precipita y ayuda a la hidrólisis. Sin embargo, una desventaja importante del tratamiento con ácidos fuertes es la formación de productos inhibidores como el furfural e hidroximetilfurfural (HMF) debido a la continua degradación de sustratos complejos. Además, hay que considerar el alto costo de los ácidos, y con este el costo adicional del álcali necesario para neutralizar el sustrato tratado.

Los pretratamientos químicos no son recomendables para sustratos fácilmente biodegradables que contienen altas cantidades de carbohidratos, debido a su degradación acelerada y posterior acumulación de AGV, lo que podría conducir al fracaso en la metanogénesis (Ariunbaatar et al., 2014).

2.7.1.4 Aditivos

2.7.1.4.1 Metales traza

La adición de metales traza como cobalto, molibdeno, selenio, hierro, tungsteno, cobre y níquel, juegan un papel en muchas reacciones bioquímicas en la DA ya que son cofactores cruciales en numerosas enzimas (Ariunbaatar et al., 2014; Romero-Güiza et al., 2016).

El hierro se ha convertido en uno de los aditivos más destacados para mejorar el rendimiento de la DA debido a sus propiedades conductores y a su bajo precio. Una de las ventajas del hierro incluye su capacidad para disminuir el potencial óxido-reducción, proporcionando un entorno más favorable para los metanógenos. Por otro lado, se ha encontrado que el Fe^0 puede acelerar las etapas de hidrólisis y fermentación debido a su acción como donador de electrones (Romero-Güiza et al., 2016).

2.7.1.4.2 Zeolitas

Son sólidos cristalinos permeables pequeños con estructura bien caracterizada que contienen silicio, aluminio y oxígeno, se usan en la DA por su capacidad de adsorber sales, o amoníaco, el cual actúa como inhibidor en el proceso (Paritosh et al., 2018).

2.7.1.4.3 Cenizas

La incineración de residuos sólidos urbanos es una tecnología para producir energía y reducir el volumen de los RSU hasta en un 90%. Las cenizas de fondo que no se consideran como residuos peligrosos pueden adicionarse a los digestores, debido a su contenido de óxido de calcio y sílice con un bajo contenido de metales pesados. Uno de los impactos beneficiosos de las cenizas es que puede proporcionar alcalinidad al sistema (Romero-Güiza et al., 2016).

2.7.1.5 Pretratamientos biológicos

Dado que la DA es un proceso llevado a cabo por microorganismos, existe una correlación entre la comunidad microbiana y el comportamiento del sistema. Por lo tanto, las mejoras en el rendimiento de la DA podrían lograrse potencialmente mediante la manipulación de ciertos grupos microbianos (Romero-Güiza et al., 2016).

Los pretratamientos biológicos se pueden dividir en 3: enzimático, aerobio y anaerobio. La bioaumentación no debe considerarse como un pretratamiento sino como una técnica de inoculación mejorada (Brémond et al., 2018).

2.7.1.5.1 Enzimático

Se ha reportado una mejora significativa en la producción de biogás cuando se utilizan enzimas como pretratamiento de materia orgánica compleja como los sustratos lignocelulolíticos y ricos en lípidos (Romero-Güiza et al., 2016).

La hidrólisis enzimática de los residuos orgánicos es bastante difícil debido a su composición heterogénea, por lo tanto, se requiere el desarrollo y la utilización de cocteles enzimáticos que descomponen sustratos complejos como carbohidratos (celulosa, hemicelulasa, pectinasa), lípidos (lipasa, acil hidrolasa lipolítica, lipoxigenasa) y proteínas (proteasa). Los productos resultantes son moléculas simples como azúcares, ácidos grasos y aminoácidos (Brémond et al., 2018).

La adición de enzimas exógenas a la DA para mejorar el proceso puede clasificarse en 4 formas:

- En un contenedor exclusivo para el pretratamiento
- Directamente en el digestor (una sola etapa)
- Directamente en el digestor de hidrólisis/acidificación
- En el lixiviado a recircular

Las enzimas son capaces de actuar en presencia de varios sustratos tóxicos y en una amplia gama de condiciones ambientales, además por su pequeño tamaño tienen un acceso más fácil a los sustratos que los microorganismos (Brémond et al., 2018; Romero-Güiza et al., 2016).

2.7.1.5.2 Procesos aerobios

El pretratamiento aerobio, como el compostaje o la aireación antes de la DA, puede ser eficaz para obtener una mayor tasa de hidrólisis en sustratos complejos debido a la mayor producción de enzimas hidrolíticas.

La presencia de oxígeno permite aprovechar al máximo las capacidades de descomposición de los microorganismos aerobios y facultativos. Estos microorganismos degradan la materia orgánica utilizando oxígeno como receptor final de electrones para asegurar su crecimiento. A través de su metabolismo, producen principalmente CO₂, agua, nitrato y sulfato. Este pretratamiento puede ser muy interesante en el caso de sustratos lignocelulósicos.

Los pretratamientos aerobios se pueden dividir en 3 categorías: Aireación simple donde el sustrato es únicamente sometido a condiciones aerobias, inoculación con cepas puras aerobias e inoculación de consorcios aerobios.

El cultivo con microorganismos hidrolíticos puros puede favorecer el aumento de la accesibilidad a los sustratos. Los hongos han despertado mucho interés debido a su capacidad para romper polímeros de difícil degradación como la lignina.

Por otro lado, el uso de consorcios o cultivos mixtos es una alternativa prometedora a los cultivos puros, ya que: (1) se produce mayor cantidad y variedad de enzimas que pueden actuar sinérgicamente y, por tanto, mejorar la eficiencia de la hidrólisis, (2) más tolerancia a los cambios ambientales, (3) capacidad para prosperar y desarrollarse en un ambiente no esterilizado.

Aunque los pretratamientos aerobios puedan considerarse beneficiosos, también tienen una gran desventaja, como lo es la reducción del potencial final de metano (Brémond et al., 2018).

2.7.1.5.3 Procesos anaerobios

Se pueden distinguir tres tipos de pretratamientos anaerobios: DA de dos etapas, DA mejorada mediante la adición de consorcios anaerobios hidrolíticos y ensilaje.

La DA de dos etapas consiste en la separación de los pasos hidrolíticos/acidogénicos de los pasos acetogénicos/metanogénicos, Generalmente se realiza usando dos recipientes separados, el primer paso puede considerarse como un pretratamiento a la metanogénesis. Sin embargo, algunos investigadores no consideran este método como un pretratamiento sino como una configuración del proceso. Las ventajas de tales sistemas incluyen: (1) mayor estabilidad con un mejor control del pH; (2) mayor velocidad de carga; (3) aumento de la actividad específica de los metanógenos resultando en un mayor rendimiento de metano; (4) aumento en la reducción de SV y (5) alto potencial para eliminar patógenos. Entre las desventajas: (1) acumulación de hidrógeno que resulta en la inhibición de bacterias formadoras de ácido, (2) eliminación de posibles requerimientos interdependientes para las bacterias formadoras de metano; (3) complejidad técnica y (4) mayores costos.

La DA mejorada, se considera como una bioaugmentación que se aplica en la etapa hidrolítica; los microorganismos pueden provenir de orígenes diferentes a fin de alcanzar una mejora en el sistema.

En ensilaje es un método muy convencional y ampliamente aplicado para el almacenamiento eficiente de cultivos en granjas. Se basa en la aplicación de condiciones anaerobias y húmedas que favorecen las fermentaciones de ácido láctico y acético, transformando azúcares libres, hemicelulosas y celulosa principalmente en ácidos orgánicos. No se recomienda para la degradación de lignina pues no sería eficiente (Ariunbaatar et al., 2014; Brémond et al., 2018).

Aunque los pretratamientos puedan mejorar el rendimiento de la DA, el alto costo de capital así como el alto consumo de energía, los productos químicos requeridos y las condiciones de operación son los factores principales que dificultan su aplicación a gran escala (Ariunbaatar et al., 2014).

2.8 Mejoramiento de biogás o “Biogas upgrading”

Dentro de la composición del biogás pueden encontrarse contaminantes, como se describió en el apartado 2.3.2. Por tal razón, existen tratamientos que pueden “limpiar” o “mejorar” la calidad del biogás a fin de expandir sus aplicaciones.

El primer tratamiento está relacionado con la “limpieza” del biogás e incluye la eliminación de compuestos nocivos y/o tóxicos (H_2S , silicio, compuestos orgánicos volátiles, siloxanos, CO y NH_3). Sin embargo, en muchas plantas de biogás actuales, el objetivo principal es solo la eliminación del H_2S mediante el uso de bacterias oxidantes de sulfato (Angelidaki et al., 2018).

El “biogas upgrading” o “mejora del biogás” tiene como objetivo aumentar el poder calorífico del biogás para convertirlo en un combustible de mejor calidad. En la Tabla 4, se enlistan algunas de las técnicas para la mejora del biogás.

Tabla 4. Técnicas físicas, químicas y biológicas para la mejora del biogás.

Clasificación	Técnica	Descripción
Físicos	Absorción (lavado con agua)	Se basa en la separación de CO_2 y H_2S dada su mayor solubilidad en agua en comparación con el CH_4 . El biogás se presuriza (6-10 bar, hasta $40^\circ C$) y se inyecta en la columna del lado inferior del tanque, mientras que el agua se suministra desde la parte superior.
	Absorción (solventes orgánicos)	El principio es el mismo que el del lavado con agua, sin embargo, se utilizan solventes como una mezcla de metanol con dimetil éteres de polietilenglicol. La ventaja de los solventes en comparación con el agua radica en la solubilidad considerablemente más alta de CO_2 que se puede alcanzar. Sin embargo, los solventes son difíciles de regenerar lo que constituye un obstáculo importante.
Químicos	Absorción usando soluciones de amina	Los depuradores químicos usan soluciones de amina acuosa (mono, di o tri-etanolamina) para unir las moléculas de CO_2 . Una de las ventajas es que el H_2S también puede ser absorbido completamente. Las principales desventajas incluyen la toxicidad de los solventes para el humano y el medio ambiente, la gran cantidad de energía que se necesita para la regeneración de las soluciones, el costo inicial de los solventes y su pérdida debido a la evaporación.
	Pressure swing adsorption	Se separan los diferentes gases del biogás basándose en sus características moleculares y la afinidad del material adsorbente. Estos pueden ser tamices moleculares de carbono, carbón activado, zeolitas y otros materiales con alta superficie. Una vez que la columna está saturada, el material adsorbente se regenera mediante un proceso de desorción, la presión disminuye y se liberan los gases atrapados. Este método presenta varias ventajas debido al equipo compacto requerido, bajo costo de inversión y simplicidad de operación.

	Separación de membrana	Se basa en las propiedades de permeabilidad selectiva de las membranas que permiten la separación de los componentes del biogás. Dependiendo de los medios de separación, el proceso puede realizarse con técnicas secas (gas/gas) o húmedas (gas/líquido). El proceso seco utiliza membranas específicas (principalmente poliméricas). Una membrana ideal debe tener una gran diferencia de permeabilidad entre CH_4 y CO_2 para minimizar las pérdidas de metano. Las principales desventajas de esta tecnología son el alto costo de las membranas además de su fragilidad.
	Separación criogénica	Se lleva a cabo a través de una disminución gradual de la temperatura del biogás que separa el CH_4 licuado del CO_2 y demás componentes. La separación se realiza inicialmente secando y comprimiendo el biogás hasta 80 bar, seguido de una caída gradual de la temperatura hasta -110°C. A pesar de los resultados prometedores, el proceso de separación criogénica todavía está en desarrollo y solo unas pocas instalaciones están operando a escala comercial.
	Hidrogenación química	La reducción de CO_2 con H_2 puede realizarse químicamente según la reacción de Sabatier. Se utilizan varios catalizadores, siendo el níquel y el rutenio los más utilizados en aplicaciones industriales, probando a temperaturas elevadas (300°C) y niveles de presión (5-20 MPa). Aunque es un proceso altamente eficiente, aún persisten inconvenientes, por ejemplo, la presencia de gases traza degrada los catalizadores, generando una necesidad de reemplazo periódico.
	Métodos quimioautotróficos	Se basa en la acción de los metanógenos hidrogenotróficos que pueden convertir H_2 y CO_2 en CH_4. El H_2 requerido debe derivar de una fuente renovable. Este método también sirve para almacenar la energía excedente generada por las turbinas eólicas o los módulos fotovoltaicos creando una nueva tecnología llamada energía al gas (Power to gas - P2G).
Biológicos	In-situ biological biogas upgrading	El H_2 se inyecta dentro de un reactor para ser acoplado con el CO_2 endógeno que se produce en el digestor y se convierte en CH_4 por la acción de los metanógenos autóctonos. Un desafío principal está relacionado con el incremento del pH a valores superiores a 8.5 lo que lleva a la inhibición de la metanogénesis. La elevación del pH se atribuye a la eliminación del bicarbonato.
	Ex-situ biological biogas upgrading	El CO_2 se provee de una fuente externa y el H_2 de un cultivo hidrogenotrófico, resultando en su conversión posterior a CH_4. Entre las ventajas se encuentra: la mejora que se produce en una unidad separada, el proceso bioquímico es más simple pues no hay degradación de sustrato, es un proceso independiente de la biomasa.

Métodos fotoautotróficos		Este proceso biotecnológico es catalizado por organismos fototróficos como las algas en fotobiorreactores cerrados (tubulares) o abiertos (estanques de algas de alta velocidad). Los sistemas cerrados tienen un alto rendimiento fotosintético y bajos requisitos en términos de necesidades de tierra y agua, pero altos costos de inversión y demandas de energía. Por el contrario, en los fotobiorreactores abiertos se necesitan recursos insignificantes para la construcción y operación, pero tienen una menor absorción de CO ₂ fotosintético y mayores requisitos de fuentes naturales. Un beneficio adicional de este método es la producción de biomasa activa que puede usarse para la extracción de productos de alto valor agregado o como materia prima para la producción de biogás orientada a la economía circular. Por ejemplo, algunos compuestos sintetizados por microalgas han demostrado poseer características antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y antitumorales, las cuales son de gran interés en el mercado farmacéutico (Guedes et al., 2011).
Procesos fermentación	de	Aunque el CO ₂ en el biogás puede convertirse biológicamente en metano con la adición de H ₂ para lograr la mejora del biogás, la producción de líquidos valiosos (por ejemplo, acetato, etanol, butirato, butanol, etc.) a partir de CO ₂ en el biogás es más atractiva. Los ácidos grasos producidos como el acetato y el butirato también son precursores importantes para la producción de biocombustibles líquidos. Existen procesos de fermentación alternativos donde el CO ₂ se combina con azúcares para producir ácidos carboxílicos.
Métodos electroquímicos microbianos		En una celda de electrólisis microbiana, los electrones liberados por las bacterias oxidativas de los orgánicos en el ánodo pueden combinarse con protones para generar hidrógeno en la cámara del cátodo.

Referencia:(Angelidaki et al., 2018)

2.9 Importancia del seguimiento microbiológico en el proceso de DA

Los microorganismos son el núcleo de los digestores pues la DA es un proceso bioquímico que involucra una gran variedad de grupos microbianos. Los microorganismos “centrales” (aquellos que se encuentran en todos los digestores durante su operación) juegan un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad de un digestor anaerobio, pues también tienen gran capacidad para resistir perturbaciones. La identificación de los microorganismos puede dar una idea de los parámetros que producen un funcionamiento invariable, sin embargo, también es necesario conocer aquellos microorganismos presentes en un proceso donde existen fallas (De Vrieze et al., 2016; Koo et al., 2019; Wang et al., 2018).

Li et al., 2016 incrementó la carga orgánica (ORL) de 3 g SV/L/día a 4 y 6 g SV/L/día en un digestor mesofílico de residuos de comida, para conocer si las comunidades microbianas

cambiarían al someterlas a un proceso de estrés. Los autores encontraron que el aumento de la OLR provocó la proliferación de bacterias acidógenas (Tenericutes y Actinobacteria) y bacterias acetogénicas sintróficas (Clostridia). Por otro lado, la abundancia de metanógenos hidrogenotróficos disminuyó (45.24% a 37.68%) y hubo una transición del metanógeno *Methanospirillum* a *Methanoculleus*. Por otra parte, se ha observado este tipo de comunidades en los digestores con un rendimiento estable, lo que dificulta la formulación de tendencias o relaciones entre la respuesta de la comunidad microbiana y el rendimiento del digestor (Ferguson et al., 2018; Goux et al., 2015).

La DA ha sido operada comercialmente en todo el mundo a gran escala durante muchas décadas. Sin embargo, algunas instalaciones sufren largos tiempos de arranque o inestabilidad en el sistema en respuesta a choques operativos o incluso fallas en el proceso. Estos problemas resaltan la necesidad de comprender los procesos biológicos que subyacen al rendimiento de DA con mayor profundidad. Un reactor de DA puede albergar interacciones sinérgicas complejas que se llevan a cabo por los cuatro grupos funcionales. El equilibrio entre cada grupo microbiano es crítico para la eficiencia y la estabilidad de los reactores de DA. Además, el impacto de diferentes sustratos y la inoculación en el rendimiento y la estabilidad de diferentes configuraciones de reactores aún no se ha entendido completamente. El rendimiento de DA generalmente depende de la estabilidad y resistencia de su microbiota (Tao et al., 2019).

La invención de tecnologías de secuenciación como next-generation sequencing (NGS) permite una visión profunda de las comunidades microbianas a partir de diversas matrices ambientales. Los métodos de secuenciación han permitido la identificación de los microorganismos en la DA. El perfil microbiano puede ser identificado mediante el gen 16S rDNA como un marcador filogenético. Por lo tanto, la investigación de los microorganismos “centrales” en la DA de diversos residuos orgánicos, se vuelve factible mediante el uso de los métodos de secuenciación (De Vrieze et al., 2016).

2.10 Experiencias en el uso de la bioaumentación

Uno de los principales factores que conducen a la falla del proceso es el cambio de comunidades microbianas que ocurren durante las fases de transición o en respuesta a condiciones de estrés. La bioaumentación puede servir como mecanismo para recuperar la eficiencia de los sistemas debido a la mayor diversidad y abundancia microbiana. Sin embargo, debido a las incertidumbres y riesgos económicos, la bioaumentación se ha

investigado únicamente a escala laboratorio, siendo su aplicación a gran escala escasa (Romero-Güiza et al., 2016).

La bioaumentación es la adición de cultivos microbianos especializados que generalmente se cultivan por separado en condiciones bien definidas, para realizar una tarea específica en un entorno determinado. Esta técnica se ha considerado como una estrategia útil, ya que desempeña un papel excelente para mejorar el rendimiento y la recuperación en los sistemas bajo diversas condiciones de estrés. La bioaumentación se ha utilizado para recuperar los digestores de una sobrecarga orgánica, optimizar las tasas de digestión, disminuir el retraso durante el período de inicio del proceso, aliviar la inhibición debido a compuestos tóxicos y mejorar el rendimiento del metano (Fotidis et al., 2014; Lebiocka et al., 2018; Yang et al., 2016).

En la última década, muchos estudios se han centrado en la bioaumentación con cepas funcionales específicas o con consorcios microbianos. Sin embargo, aunque los estudios han demostrado la supervivencia y persistencia de los microorganismos añadidos a los reactores, aún se carece de evidencia para aclarar si la mejora del desempeño se atribuyó a éstos, pues pocas veces se realiza el seguimiento a las comunidades microbianas a lo largo del proceso (Yang et al., 2016).

Diferentes grupos de trabajo han empleado distintas estrategias de bioaumentación como la inoculación con cepas puras (hidrolíticas, acetogénicas, productoras de hidrógeno o metanógenos) o también con mezclas de microorganismos llamados consorcios. La bioaumentación con consorcios es una opción más conveniente que el uso de cepas puras pues se permite su adaptación al proporcionar interacciones sinérgicas (Yang et al., 2016).

En la Tabla 5 se presentan algunos trabajos en el que se ha empleado la técnica de bioaumentación para aumentar el rendimiento del metano.

Tabla 5. Investigaciones de bioaumentación para la mejora en la producción de metano.

Referencia	Técnica de bioaumentación	Resultado obtenido
(Peng et al., 2014)	Uso de la bacteria celulolítica <i>Clostridium cellulolyticum</i> .	Incremento del 13% en la generación de metano.
(Fotidis et al., 2014)	Uso del metanógeno <i>Methanoculleus bourgensis</i> .	Incremento en la producción de metano del 31.3%.

(Čater et al., 2015)	Empleo de las bacterias <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> , <i>Fibrobacter succinogenes</i> y <i>Clostridium cellulovorans</i> , en cultivos puros y cocultivos.	Se logra un aumento en la producción de metano en un 17.8% usando <i>P. xylanivorans</i> .
(Tale et al., 2015)	Empleo de microorganismos metanógenos estrictos y aerotolerantes.	Incremento en la producción de metano en un 50-120%.
(Ács et al., 2015)	Inoculación con la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> .	Aumento de metano en un 20%.
(Zhang et al., 2015)	Uso de la cepa <i>Acetobacteroides hydrogenigenes</i> .	Incremento del potencial de metano en un 19-23%.
(Zhiman Yang et al., 2015)	Uso de un consorcio microbiano y nanopartículas de magnetita.	Aumento de producción de metano en un 61.2%.
(Martin-Ryals et al., 2015)	Consortio celulolítico.	Incremento en la producción de metano en un 56%.
(Venkiteshwaran et al., 2016)	Cultivo metanogénico.	Producción de metano en un 11%.
(Yang et al., 2016)	Uso de consorcio microbiano, adición una sola vez y rutinario (inoculación de 3 ciclos).	Aumento de la producción de metano en un 15% (rutinario), 10% (una sola vez).
(Tsapekos et al., 2017)	Uso de <i>Clostridium thermocellum</i> .	Incremento en un 34% la producción de metano.
(Fotidis et al., 2017)	Cultivo enriquecido (<i>Methanoculleus</i> spp., <i>Tepidimicrobium</i> spp., <i>Aminobacterium</i> spp., <i>Petrimonas</i> spp. y <i>Deffluviitoga</i> spp.).	Mejora en la producción de metano en un 40%.
(Strang et al., 2017)	Uso de <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> .	El rendimiento de metano aumentó entre un 22-24%.
(Zhu et al., 2018)	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> y <i>Methanosarcina thermophila</i> .	40% más de producción de metano.
(Ecem Öner et al., 2018)	<i>Clostridium thermocellum</i> .	Rendimiento de metano incrementó en un 39%.
(Ferraro et al., 2018)	<i>Neocallimastix</i> sp. y <i>Orpinomyces</i> sp.	Incremento de metano en 126.2% en un sistema de dos etapas.
(Lebiocka et al., 2018)	<i>Methanosaeta</i> (36%), <i>Exiguobacterium</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Acinetobacter</i> y <i>Stenotrophomonas</i> (59%).	No existió aumento estadísticamente significativo.
(Akyol et al., 2019)	Hongo anaerobio <i>Orpinomyces</i> sp.	Rendimiento de metano aumentó entre 15-33% en codigestión.
(Tian, Mancini, et al., 2019)	Uso de <i>Methanoculleus bourgensis</i> .	Incremento en la producción de metano en un 28% después de bioaumentación.
(Jiang et al., 2020)	<i>Methanotherrix</i> y <i>Methanobacterium</i> .	Producción aumenta entre 8 y 12 veces con respecto al control.

(Lee et al., 2020)	<i>Clostridium cellulolyticu</i> , <i>Clostridium cellulovorans</i> , <i>Clostridium aceticum</i> , <i>Mesotoga infera</i> , <i>Mehtanosarcina barkeri</i> y <i>Methanosaeta concilii</i> .	Incremento de metano del 20.7%.
--------------------	---	---------------------------------

En las siguientes secciones se discutirán algunos de los trabajos descritos en esta Tabla.

2.10.1 Bioaugmentación hidrolítica

La bioaugmentación con microorganismos hidrolíticos tiene como objetivo reforzar la despolimerización de la biomasa, aprovechando las capacidades de la comunidad añadida para codificar enzimas celulolíticas específicas (p. ej. Celulosa, β -glucosidasa) o complejos multienzimáticos (p. ej. celulosoma).

Martin-Ryals et al., 2015 investigaron la bioaugmentación de manera rutinaria en la fase ácida en un proceso de DA de dos etapas, usando como sustrato residuos de maíz. Se empleó un cultivo celulótico patentado por Microbial Energy Systems Inc. a fin de aumentar la tasa de hidrólisis y así mejorar el rendimiento del metano. La bioaugmentación rutinaria tuvo mayor producción de metano (+ 15%) en comparación con la bioaugmentación de una sola dosis, y fue mucho más eficiente en términos de generación de metano (+ 56%) comparando con el digestor que no contó con bioaugmentación. Por otro lado, Strang et al., 2017, de igual forma trabajaron con residuos de maíz, sin embargo el consorcio usado para la bioaugmentación provino de un lodo anaerobio alimentado con α -celulosa por 10 semanas, promoviendo así el crecimiento de microorganismos celulolíticos. En esta investigación también se trabajó con las cepas *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* y *Clostridium cellulolyticum*. Los resultados indicaron que existió una mejora del metano en un 22-24% cuando se empleó el consorcio, mientras que sólo se mejoró el rendimiento del metano entre 10-11% al emplear las cepas.

En el trabajo de Čater et al. 2015 se emplearon distintas cepas hidrolíticas para conocer su efecto en la producción de biogás al tratar los residuos provenientes de una cervecería. Una peculiaridad en esta investigación fue el empleo de cocultivos, es decir, una mezcla de dos cepas. Los cultivos utilizados fueron *Pseudobutyribrio xylanivorans* Mz5T, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Clostridium cellulovorans* y *Ruminococcus flavefaciens* 007C. Los resultados mostraron que la cepa *P. xylanivorans* Mz5T fue la más exitosa en elevar la producción de metano (+17.8%), seguida por el cocultivo de *P. xylanivorans* Mz5T y *F.*

succinogenes S85 (+6.9%) y finalmente por el cocultivo de *C. cellulovorans* y *F. succinogenes* S85 (+4.9%). Así mismo se determinó que los diferentes tipos de bioaumentación causaron cambios notablemente más significativos en la comunidad de bacterias que en la de arqueas.

Tsapekos et al., 2017 investigaron la eficiencia de las cepas *Clostridium thermocellum* y *Melioribacter roseus* en la degradación la materia lignocelulósica y por ende ver su efecto en la producción de metano. Los resultados arrojaron que *Clostridium thermocellum* aumentó el rendimiento de metano en un 34% en ensayos por lotes, mientras que en los digestores continuos el efecto fue notablemente menor (+ 7.5%). Por el contrario *M. roseus* no promovió el rendimiento de metano. El análisis microbiano mostró que la bioaumentación con estas cepas no alteraron de manera significativa las comunidades microbianas.

2.10.2 Bioaumentación con bacteria acetogénicas

La fermentación de acetato que produce hidrógeno tiene una ventaja para el rendimiento de metano, ya que sus productos, H_2 / CO_2 y acetato podrían convertirse directamente en metano mediante metanógenos, por lo tanto, este tipo de bacterias parecen ser microorganismos prometedores para aumentar la producción de metano (Zhang et al., 2015).

Zhang et al., 2015 estudiaron el efecto de la bioaumentación empleando la bacteria acetogénica *Acetobacteroides hydrogenigenes* en un reactor con residuos de maíz. Los autores comentan que esta cepa fue escogida ya que se caracteriza por su tasa de crecimiento relativamente alta, su tolerancia al hidrógeno y acetato, además de que puede fermentar un amplio espectro de pentosas, hexosas y polioles principalmente en acetato e hidrógeno. Los resultados mostraron que debido a la bioaumentación hubo un incremento del 23% en el rendimiento del metano en comparación con el control. Así mismo, se señaló que la cepa *A. hydrogenigenes* pudo aumentar las tasas de remoción de celulosa y hemicelulosa de los residuos de maíz en un 12% y 5%, respectivamente. Los autores no presentan análisis microbiológicos que puedan indicar un cambio considerable en las comunidades microbianas del reactor.

Ács et al., 2015 emplearon la cepa acetogénica *Enterobacter cloacae* a fin de conocer si existen cambios en la comunidad microbiana productora de biogás. Los resultados mostraron que debido a la bioaumentación un grupo desconocido de Clostridiales y un

pariente cercano de *Clostridium pasteurianum* aumentaron considerablemente en abundancia relativa, además se considera se desarrolló una relación sintrófica entre *Clostridia* productora de H₂ y *E. cloacae*.

Por otro lado Aydin, 2016, examinó cómo la bioaumentación con *Clostridium thermocellum* representa un método viable para mejorar la producción de metano al tratar microalgas (*Haematococcus pluvialis*). Esta cepa es anaerobia, acetogénica y termófila, con alta propensión a sintetizar hidrógeno y degradar celulosa. Los resultados de la investigación revelaron que la bioaumentación con *C. thermocellum* aumentó la degradación de la biomasa de *H. pluvialis* y dio como resultado un aumento del 18-38% en la producción de metano como resultado de una mayor disrupción celular.

2.10.3 Bioaumentación con bacterias del rumen

Los microorganismos en los sistemas digestivos de los herbívoros son conocidos como microorganismos del rumen, los cuales son capaces de digerir de manera efectiva compuestos lignocelulósicos (Akyol et al., 2019).

Ferraro et al., 2018, probaron la bioaumentación con hongos de rumen y bacterias fermentadoras productoras de hidrógeno en residuos de trigo, con el objetivo de mejorar el rendimiento de la DA. Se realizaron pruebas en lote usando configuraciones de proceso de una y dos etapas, empleando volúmenes de 120 y 1200 ml. Los resultados arrojaron que, en ambos volúmenes, el rendimiento fue mejor cuando la configuración fue de dos etapas. La producción de metano aumentó +290% en residuos de trigo en comparación con los controles que no fueron bioaumentados. Mediante el análisis de las comunidades microbianas, se concluyó que la eficacia del tratamiento se relacionó principalmente con el aumento de *Methanosaeta*. Por otro lado, Akyol et al., 2019 evaluó el efecto de la bioaumentación con *Orpinomyces sp* en la producción de metano usando cultivo de cereales (cebada, trigo y centeno) y estiércol de vaca como co-sustrato para equilibrar la relación C/N. Los resultados indicaron que hubo un aumento en el rendimiento de metano entre un 15-33%, también se encontró que existió una abundancia relativamente mayor de *Synergistetes*, al que se le atribuyó una fermentación más eficiente y, por el contrario, la composición de metanógenos no cambió y la mayoría de estos pertenecieron al género *Methanosarcina*.

2.10.4 Bioaumentación con metanógenos

Diversos autores han empleado la bioaumentación con metanógenos no solo para mejorar la producción de metano, sino también cuando hay reactores con altas cargas orgánicas, con altas relaciones C/N o existe inhibición por amoníaco.

Autores como Tale et al., 2015 y Venkiteshwaran et al., 2016 emplearon cultivos aerotolerantes o anaeróbicos estrictos. Aunque los autores no mencionan el nombre específico de los microorganismos que fueron usados, los resultados mostraron que hubo un incremento en la generación de metano. Tale et al. 2015 encontraron que organismos relacionados con *Methanospirillum hungatei* tuvieron una mayor abundancia relativa en reactores bien operados, mientras que *Methanolinea* se encontró en mayores cantidades en los digestores “estresados” y que no fueron bioaumentados. Por otro lado, Venkiteshwaran et al. 2016 encontraron que después de la bioaumentación la producción de metano incrementó y esto fue correlacionado con el incremento en la abundancia relativa de *Methanosaeta* y *Methanospirillum*, sin embargo, este incremento fue solamente temporal (7-11 días).

Tian et al, 2019 emplearon el metanógeno *Methanoculleus bourgensis* para aliviar la inhibición por amoníaco en un proceso alimentado con microalgas (sustrato rico en proteínas). Los resultados mostraron un incremento del 28%, en la generación de metano, inmediatamente después de la bioaumentación, mientras que los datos de secuenciación demostraron que *M. bourgensis* duplicó su abundancia relativa después de la bioaumentación, desencadenando el efecto “dominó microbiológico” (establecimiento de una nueva comunidad microbiana de alta eficiencia).

Li et al, 2018, trabajaron con un cultivo metanogénico tolerante a ácidos con el propósito de restaurar el proceso de DA causada por una sobrecarga orgánica. Los hallazgos demostraron que con la bioaumentación rutinaria se recuperó el desempeño del digestor al degradar los ácidos grasos volátiles acumulados, aumentando así el pH. A nivel de comunidades microbianas, también se encontraron cambios, pues las poblaciones de *Methanotrix* (metanógeno acetoclástico) y *Methanolinea* (metanógeno hidrogenotrófico) incrementaron significativamente, pudiendo ser los principales contribuyentes en la producción de metano.

Finalmente en el trabajo realizado por Bhattad et al, 2017 se empleó para la bioaumentación un cultivo metanogénico liofilizado a fin de mejorar el desempeño de un proceso de DA alterado por la presencia de oxígeno. Los resultados arrojaron que no hubo diferencia significativa en cuanto a producción de metano, sin embargo, los reactores que fueron bioaumentados se recuperaron más rápido a la exposición de oxígeno en comparación a los controles. Las comunidades de metanógenos también cambiaron después de la bioaumentación, encontrándose que el género *Methanospirillum* estuvo relacionado con la mejora del rendimiento.

2.10.5 Aplicaciones a gran escala

De Vrieze et al., 2012 describe que el uso de la bioaumentación a nivel industrial se sigue considerando como un reto ya que normalmente el control operacional de los digestores se hace mediante el seguimiento de parámetros químicos y físicos, los cuales son fáciles de realizar, mientras que el seguimiento de las comunidades microbianas rara vez se aplica para controlar la estabilidad de los reactores a gran escala, sin embargo, herramientas como PCR (Polymerase Chain Reaction/Reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real, podrían servir para monitorear estas comunidades. Esta información es relevante, pues aún se desconocen las implicaciones de la adición de un consorcio específico a un reactor de gran escala y en donde los riesgos económicos podrían ser muy altos.

Diversos autores como Ariunbaatar et al. 2017; Li et al. 2018; Tale et al. 2015 concuerdan que investigaciones del uso de la bioaumentación a nivel industrial son sumamente necesarias, pues parámetros como la dosis de cepas y/o consorcios así como su frecuencia de adición, aún no están establecidos y podrían variar dependiendo el caso. En el trabajo realizado por Lins et al. 2014 mencionan que aunque las investigaciones en reactores a nivel industrial son poco frecuentes, se encuentran las investigaciones de Reuter et al. 2008 y Schmack y Reuter 2010 quienes reportaron que la bioaumentación en plantas de biogás a escala industrial, ya sea con *Methanoculleus bourgensis* o *Clostridium sartagoformum*, (ambos productores de H₂), resultaron en una mayor producción de biogás bajo condiciones mesofílicas. Estos dos inóculos están disponibles comercialmente (SCHMACK BIOGAS GMBH, Alemania), y su productor recomienda una inoculación inicial, seguido de un intervalo de aplicación diaria o semanal, basado en el volumen del digestor y los recuentos de células, sin embargo, se requiere más investigación relacionada al empleo de la técnica de bioaumentación a nivel industrial.

3 Capítulo 3: Metodología

3.1 Diseño experimental

La Figura 4 muestra la estrategia experimental que se siguió a fin de cumplir con los objetivos específicos de la investigación. El experimento consistió en probar un consorcio de metanógenos hidrogenotróficos en diferentes proporciones, en un proceso de DA termófila en la que se trataron residuos orgánicos, esto con la finalidad de conocer el efecto de la bioaumentación en el rendimiento del metano. En las secciones siguientes se describen los detalles metodológicos.

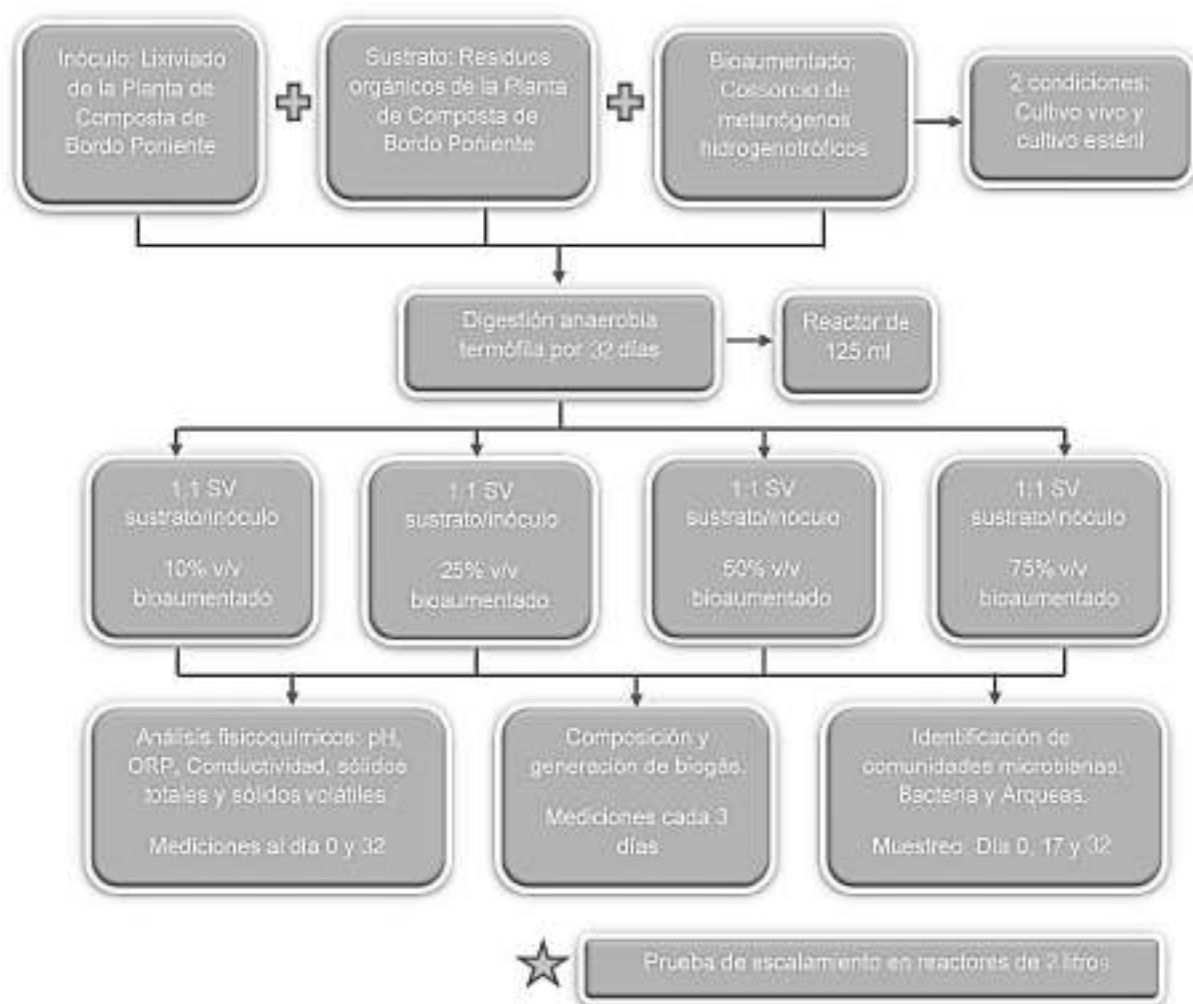


Figura 4. Estrategia experimental.

3.2 Sustrato e Inóculo

El inóculo empleado para realizar las pruebas de DA, fue el lixiviado proveniente de la Planta de Composta de “Bordo Poniente” (PCBP). Previo a su utilización, éste se sometió a un proceso de estabilización a 55°C por 15 días. La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), fue usada como sustrato para la realización de los experimentos y fue traída de la misma PCBP. Para correr las pruebas, la FORSU fue cortada en tamaños de partícula de 1-1.5 cm.

3.3 Cultivo metanogénico para la bioaumentación

3.3.1 Medio de cultivo

Para aislar y crecer el cultivo metanogénico se empleó un medio base mineral. Los componentes del medio se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes del medio base mineral.

Compuesto	Cantidad	Solución de elementos traza	
		Compuesto	Cantidad
Cloruro de amonio	1.0 g	Cloruro de magnesio sexta-hidratado	2.5 g
Fosfato de potasio monobásico	0.3 g	Cloruro de manganeso tetrahidratado	0.6 g
Fosfato de potasio dibásico	0.3 g	Cloruro de sodio	1.0 g
Cloruro de magnesio sexta hidratado	0.2 g	Cloruro ferroso tetrahidratado	0.1 g
Cloruro de sodio	2.0 g	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.1 g
Cloruro de calcio dihidratado	0.1 g	Cloruro de aluminio	0.01 g
Cloruro de potasio	0.1 g	Ácido bórico	0.01 g
Solución de elementos traza	10 ml	Molibdato de sodio dihidratado	0.01 g
Cisteína-HCl	0.5 g	Cloruro cúprico dihidratado	0.01 g
Resarzurina 0.1%	1 ml	Cloruro de calcio dihidratado	0.1 g
Extracto de levadura	1 g	Cloruro de zinc	0.1 g
Peptona	1 g	Agua destilada	1 L
Agua destilada	1 L		

3.3.2 Preparación de cultivo

Para preparar el medio de cultivo se disolvieron cada uno de los componentes, uno por uno para evitar la precipitación, en el volumen de agua correspondiente. Una vez disueltas las sales se ajustó el pH del medio a 7 utilizando hidróxido de potasio (KOH) 5 M. Una vez ajustado el pH, al medio se le adiciona el 20% más de agua destilada con respecto al volumen total a preparar. SE DEJA UNA MARCA DEL VOLUMEN ORIGINAL A PREPARAR.

Posteriormente se tapó el recipiente del medio con papel aluminio (el cual tenga de 2 a 3 orificios) y se deja ebulir hasta que el volumen se reduzca, llegando a la marca puesta previamente. El medio se enfría mediante burbujeo con nitrógeno. Una vez que el medio está a temperatura ambiente se vacía en los frascos a utilizar. Los frascos se sellan con septos de goma y se procede a la esterilización a 121°C por 15 minutos. Previo al uso del medio, se vuelve a ajustar el medio a un pH de 7 empleando bicarbonato de sodio estéril al 10%.

3.3.3 Aislamiento de consorcio metanogénico

El inóculo estabilizado de la PCBP se empleó para aislar el consorcio metanogénico hidrogenotrófico, siguiendo los siguientes pasos.

Se tomaron alícuotas de 5 ml de inóculo de la PCBP y se adicionaron a frascos conteniendo 45 ml del medio que se describió en la sección anterior. Posteriormente los frascos con los consorcios se purgaron con una mezcla de gases de H_2/CO_2 (80%-20%) a 20 psi por 3 minutos. Los frascos se dejaron incubando a 55°C de 3 a 4 semanas.

Al término del periodo de incubación, a los cultivos se les determinó la presencia de metano mediante cromatografía de gases (sección 3.5.2). Si en los frascos se registraba metano, éstos se empleaban como inóculo para inocular nuevos frascos.

3.4 Prueba bioquímica de metanización (PBM)

La PBM consiste en conocer la cantidad de metano que un sustrato orgánico puede generar por unidad de masa de sólidos volátiles añadidos al inicio del experimento. Para la presente

experimentación se utilizaron viales de 125 ml con un volumen de trabajo de 60 ml y para mantener las condiciones anaeróbicas, los viales fueron sellados con septas de goma y anillos de aluminio, además de ser purgados con helio por 15 segundos.

3.4.1 Bioaumentación

Para conocer si el consorcio metanogénico tuvo un efecto en la generación de metano se corrieron 3 grupos diferentes: control, consorcio activo y consorcio estéril. En la Tabla 6 se detallan los tratamientos que se emplearon en cada grupo.

Tabla 6. Descripción de los tratamientos empleados para bioaumentación.

Grupo	Tratamiento	Abreviación	Descripción
Control	Negativo	CN	Inóculo + agua
	Positivo	CP	Inóculo + celulosa
	Consortio 0%	C_00	Inóculo + FORSU (no bioaumentado)
Consortio activo	Consortio 10%	C_10	Inóculo + FORSU + consorcio activo 10% v/v
	Consortio 25%	C_25	Inóculo + FORSU + consorcio activo 25% v/v
	Consortio 50%	C_50	Inóculo + FORSU + consorcio activo 50% v/v
	Consortio 75%	C_75	Inóculo + FORSU + consorcio activo 75% v/v
Consortio estéril	Consortio 10%	CE_10	Inóculo + FORSU + consorcio estéril 10% v/v
	Consortio 25%	CE_25	Inóculo + FORSU + consorcio estéril 25% v/v
	Consortio 50%	CE_50	Inóculo + FORSU + consorcio estéril 50% v/v
	Consortio 75%	CE_75	Inóculo + FORSU + consorcio estéril 75% v/v

FORSU: Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos; CN: Control negativo; CP: Control positivo; C: Consortio; C: Consortio estéril.

3.4.1.1 Procedimiento

Los viales se llenaron usando una relación 1:1 SV sustrato/inóculo, esto correspondió a 2.90 g de FORSU y 57.10 ml de inóculo.

La adición del consorcio metanogénico se realizó a diferentes concentraciones volumen-volumen (v/v) tomando como base el volumen total de inóculo a añadir en cada vial. Ejemplo: Si a los viales había que añadirles un volumen total de 60 ml, al vial que contenía 10% de consorcio se añadían 54 ml de inóculo y 6 ml de consorcio; 25%: 45 ml inóculo y

15 ml consorcio; 50%: 30 ml inóculo y 30 ml consorcio y 75%:15 ml inóculo y 45 ml consorcio. Primeramente, los viales fueron llenados con la cantidad de sustrato e inóculo, se sellaron con septas y anillos de aluminio, se purgaron con helio y posteriormente se añadió el consorcio. Una vez que los viales fueron purgados con helio, el consorcio fue adicionado a éstos usando jeringas y agujas estériles, los cuales previamente fueron purgados con N₂ estéril a fin de mantener condiciones anaerobias.

Para el consorcio estéril, éste se metió en autoclave a 121°C por 15 minutos. El propósito de añadir un grupo con consorcio estéril fue conocer si existía alguna influencia de la biomasa y los nutrientes del medio en la generación de metano.

El proceso de digestión se corrió a condiciones termófilas (55°C) con agitación constante (70 rpm) y duró hasta que la generación de biogás se detuvo por completo. Cada tratamiento tuvo un triplicado, además de que la caracterización fisicoquímica de cada tratamiento se realizó al inicio y al final del proceso. La determinación de la generación y composición de biogás se realizó cada tres días hasta que la generación fue menor al 1% del gas total acumulado por al menos 3 días consecutivos (Holliger et al., 2016).

3.4.2 Prueba de bioaugmentación a mayor volumen

En condiciones reales (nivel industrial), la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos es tratada mediante procesos de digestión anaerobia seca (> 15% ST), por lo que, para simular estas condiciones, se bosquejó y construyó un reactor de 2 L con las siguientes características:

- Reactor hecho de acero inoxidable 360 con 1/8" de grosor, cuenta con una tapa bridada con domo, además de tener empaques de neopreno, conexiones en bronce y válvulas de PVC hidráulico
- El reactor posee ciertas adaptaciones para la adición de soluciones y/o reactivos, tomar muestras, así como para hacer mediciones en tiempo real de parámetros como pH, ORP, presión, temperatura y generación de biogás (Figura 5).

Cabe resaltar que el reactor fue diseñado y construido por el M en C. Daniel Salcedo Serrano, estudiante del doctorado en Ciencias Agrarias de la Universidad Agraria Antonio Narro.

El sistema se trabajó a condiciones termófilas y semisecas ($\approx 10\%$ sólidos totales) con un volumen de trabajo de 1.2 L. Una vez lleno y sellado el reactor, éste se purgó por 1 minuto con helio para mantener las condiciones de anaerobiosis. La generación de biogás se determinó de manera diaria, mientras que la composición, 2 veces por semana. El reactor no contó con sistema de agitación, sin embargo, éste se agitaba manualmente por 10 segundos diariamente.

En este experimento, únicamente se trabajaron 2 tratamientos, un reactor control (sin bioaumentar) y uno bioaumentado (10% v/v de consorcio), cada uno de ellos sin réplica.

En esta ocasión, el consorcio no se añadió al inicio del experimento, sino que fue adicionado cuando el pH mantuvo valores cercanos a la neutralidad de manera constante (pasando la etapa acidogénica). En ambos tratamientos se adicionó 1% m/m (masa/masa) de bicarbonato de sodio para prevenir una caída drástica de pH.

En el caso del control, en vez de usar consorcio, se empleó agua destilada, a fin de mantener ambos reactores en las mismas condiciones de operación. Los experimentos tuvieron una duración de 35 días.

Los parámetros fisicoquímicos se determinaron al inicio y final del experimento, y para este caso, no se recolectaron muestras para análisis de comunidades microbianas.

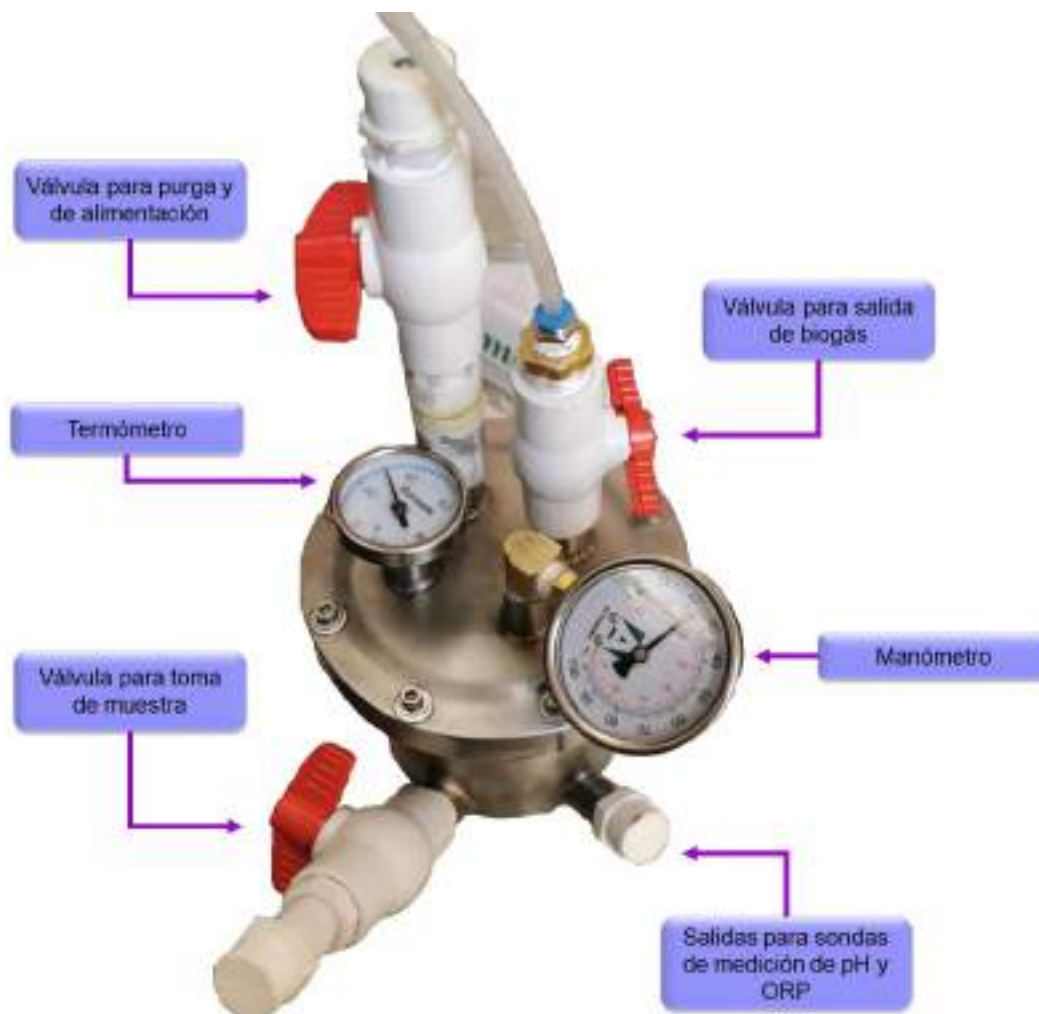


Figura 5. Reactor de acero inoxidable para pruebas de 2L.

3.5 Métodos de análisis

3.5.1 Parámetros fisicoquímicos

A cada uno de los tratamientos se les determinó pH, potencial óxido reducción (ORP), conductividad eléctrica (CE), sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV). Para la medición de pH y ORP se empleó el potenciómetro Hanna Instruments HI98191 y para el caso de la CE se utilizó el electrodo Hanna Instruments HI99300 haciendo una dilución 1:40.

La determinación de sólidos fue mediante la técnica gravimétrica. En el caso de sólidos totales (ST) las muestras se secaron a 70°C por 24 horas, y para los sólidos volátiles, las muestras secas se calcinaron a 550°C por 2 horas.

3.5.2 Composición y generación de biogás

La composición del biogás se determinó empleando un cromatógrafo de gases (PerkinElmer Autosystem, Waltham, MA, USA) con un detector de conductividad térmica (TCD), equipado con la columna Porapak QS SS 80/100 12' x 1/8" x 0.085" (Alltech), y usando helio como gas de arrastre a un flujo de 35 mL/min. Asimismo, la generación se midió mediante desplazamiento de columna (Kawai et al., 2014; Martin-Ryals et al., 2015).

3.6 Análisis de comunidades microbianas

Para el análisis de comunidades microbianas, se examinaron únicamente los siguientes tratamientos: CN (Control Negativo), C_00 (Consorcio 0%, sin bioaumentar), C_10 (Tratamiento con 10% v/v de consorcio), C_25 (Tratamiento con 25% v/v de consorcio), C_50 (Tratamiento con 50% v/v de consorcio), C_75 (Tratamiento con 75% v/v de consorcio), además del consorcio metanogénico hidrogenotrófico. Las muestras se recolectaron a los días 0, 17 y 32 del proceso de DA. Cada muestra se analizó por triplicado.

3.6.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN total de cada muestra utilizando el kit (DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit 100, Cat# 12855-100, QIAGEN, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificaron las concentraciones de ADN y se evaluó su integridad (coeficiente A260/280) usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

3.6.2 Preparación de genotecas del gen 16S rDNA

Para la generación de genotecas del gen 16S rDNA se utilizaron los siguientes primers: Bacteria V3-341F y V3-518R para la región hipervariable V3 y para Arqueas Arc787F y Arc1059R para la amplificación de las regiones V5 y V6 (Figura 6). Los primers tienen una región específica que reconoce las muestras durante el proceso de secuenciación masiva, llamados Barcode.

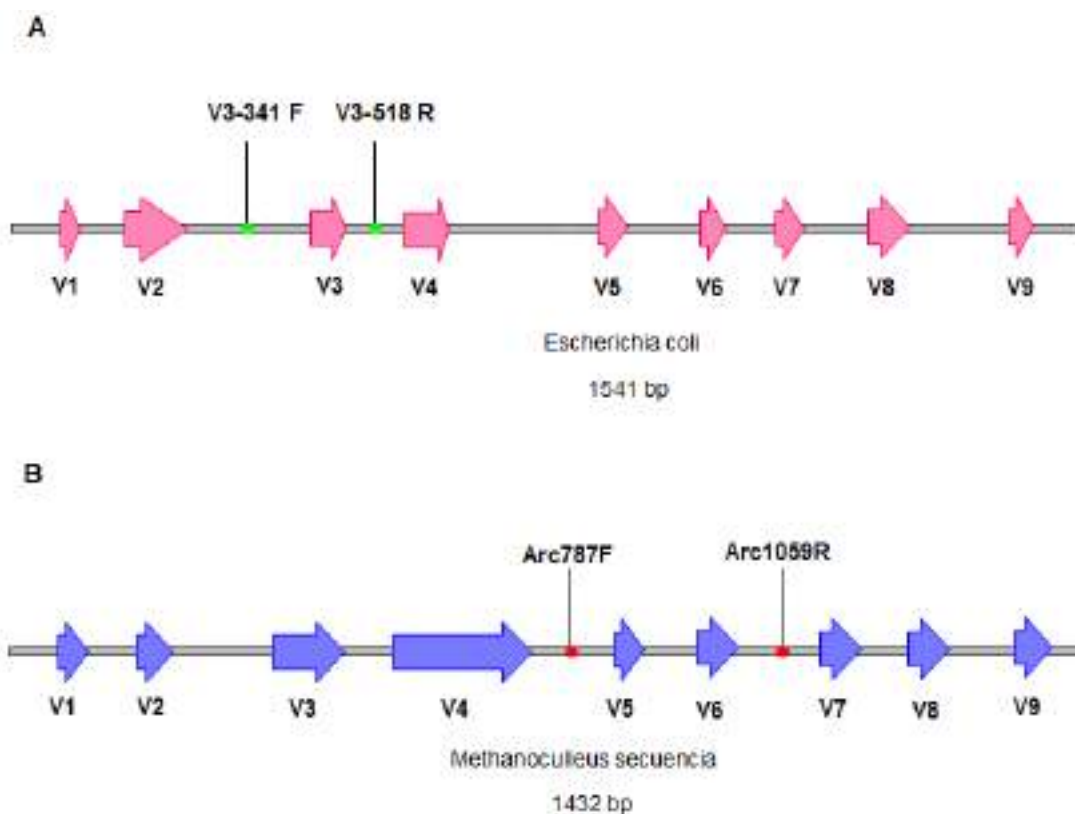


Figura 6. Región amplificada del gen 16S rDNA para secuenciar. A) Dominio Bacteria. B) Dominio Arquea.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se describe en las Tablas 8 y 9. Al término de cada PCR se comprobó que el producto tuviera el tamaño esperado (281 pb para bacterias y 358 pb para arqueas) a través de electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación de las regiones del gen 16S rDNA con barcode.

Reactivos	Stock	Reacción	Volumen
Buffer	10x	1 x	5 µL
MgCl	25 mM	2 mM	4 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µL
Primer Forward	10 µM	0.2 µM	1 µL
Primer Reverse	10 µM	0.2 µM	1 µL
Taq polimerasa	5 unidades/µL	0.05 unidades/µL	0.25 µL
ADN	-	10 ng/µL	Variable

Agua

-

-

Variable

Volumen total 50 µL

Tabla 8. Condiciones para la amplificación de la región V3 (bacterias) y V5-V6 (arqueas).

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	15 segundos*
Alineamiento	62°C (bacterias)	15 segundos*
	56°C (arqueas)	
Extensión	72°C	15 segundos*
Extensión final	72°C	7 minutos
	10°C	10 minutos

*25 ciclos.

3.6.3 Secuenciación

La secuenciación de cada genoteca se realizó utilizando el equipo Ion Torrent con el Chip 318. Los resultados se analizaron empleando QIIME 2 pipeline (v. 2019.10 <https://qiime2.org/>) y comparándolos contra las bases de datos 16S rDNA GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov>).

3.7 Análisis estadísticos

Para los parámetros fisicoquímicos y los rendimientos tanto de biogás y metano, se realizaron las pruebas de ANOVA unifactorial. La diferencia estadísticamente significativa se consideró cuando $p < 0.05$.

La diversidad microbiana fue estimada mediante los análisis de alfa y beta diversidad. La Alfa diversidad se define como la diversidad dentro de un sitio en particular y se emplearon los índices de Chao (riqueza), Simpson y Shannon (diversidad). Por otro lado, la beta diversidad se usa para conocer la diferencia en composición entre comunidades y fue calculada mediante el análisis UniFrac, de igual forma, se realizó la prueba PERMANOVA, el cual prueba si dos o más grupos son estadísticamente diferentes.

Se efectuó también el análisis LEfSe (Linear discriminant analysis effect size), el cual encuentra taxones que tengan una relevancia biológica entre 2 o más grupos usando abundancias relativas. El gráfico que se genera presenta barras que representan el tamaño del efecto (LDA) para un taxón en particular de un grupo dado. Las barras de colores representan qué grupo de taxones fueron más abundantes en comparación con otros grupos.

4 Resultados

4.1 Caracterización fisicoquímica

4.1.1 Sustrato e inóculo

En la Tabla 9 se presentan las características fisicoquímicas de la FORSU y del inóculo que se emplearon para la realización de la PBM en condiciones termofílicas.

Tabla 9. Características fisicoquímicas de la FORSU e inóculo.

Parámetros	FORSU	Inóculo
pH	4.31 ± 0.18	8.19 ± 0.04
ORP (mV)	153.60 ± 11.15	-324.10 ± 0.85
CE (mS/cm)	3.11 ± 0.27	49.37 ± 2.73
ST (g/kg)	230.08 ± 35.31	28.59 ± 1.39
SV (g/kg)	209.35 ± 38.54	10.65 ± 0.91
Relación SV/ST (%)	90.70 ± 3.24	37.22 ± 1.88

FORSU: fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos; ORP: potencial óxido-reducción; CE: conductividad eléctrica ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles.

La FORSU presentó un pH ácido (4.31) lo que indica que necesariamente el inóculo debe poseer la capacidad de amortiguar el pH del sustrato, a fin de que el proceso de digestión no se inhiba. Favorablemente, el inóculo posee un pH ligeramente alcalino (8.19) además de un ORP altamente negativo (-324.10 mV) indicando que el inóculo es un medio reducido y por lo tanto puede fomentar la metanogénesis. Por otra parte, la relación SV/ST de la FORSU (90.70%) muestra que ésta tiene un gran contenido de materia orgánica, siendo un sustrato apto para la DA.

4.1.2 Cultivo de metanógenos hidrogenotróficos

La Tabla 10 muestra las características fisicoquímicas del consorcio empleado para la bioaumentación. El pH es cercano a la neutralidad (6.54) mientras que el valor de ORP indica que es un medio reducido (anaerobiosis).

Tabla 10. Características fisicoquímicas del consorcio

Parámetro	Valor
pH	6.54 ± 0.01
ORP (mV)	-323.20 ± 0.50
CE (mS/cm)	0.14 ± 0.01
ST (g/kg)	3.24 ± 0.03
SV (g/kg)	0.68 ± 0.14
Relación SV/ST (%)	21.05 ± 3.56

ORP: potencial óxido-reducción; CE: conductividad eléctrica ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles.

El pH cercano a 7 indica que el consorcio es apropiado para el crecimiento y desarrollo de los metanógenos. Por otro lado, el inóculo tiende a ser alcalino y podría pensarse que los metanógenos podrían no sobrevivir en este medio durante el proceso de bioaumentación, sin embargo, por conocimiento previo se sabe que el inóculo es capaz de mantener a estos microorganismos activos (Gállego Bravo et al., 2019).

Por otro lado, los valores de CE y ST del consorcio son al menos 100 y 10 veces menores con respecto al inóculo, por lo que se asume su influencia dentro de este, es insignificante.

4.2 Rendimiento de biogás y metano

4.2.1 Prueba bioquímica de metanización

Los 11 grupos que se mencionaron en la sección 3.4.1 se sometieron a un proceso de digestión anaerobia termófila por 42 días, sin embargo, para determinar los rendimientos, la generación tanto de biogás como de metano del control negativo, se restó de los demás tratamientos.

4.2.1.1 Biogás

En la Figura 7 se muestra el rendimiento de biogás por día de cada tratamiento, en donde se observa que el tratamiento C_50 tuvo un pico de generación al día 8 produciendo 187.16 ml /g SV_{añadido}, mientras que el tratamiento C_25 tuvo su pico de generación en el día 13 (155.08 ml /g SV_{añadido}). Por otro lado, el control C_00 tuvo 2 picos de generación, al día 13 (96.47 ml /g SV_{añadido}) y al día 18 (77.32 ml /g SV_{añadido}). Los demás tratamientos tuvieron un

rango de generación de entre 36.92 – 148.75 ml /g SV_{añadido} durante el periodo de los días 8 al 13.

Sin embargo, la generación de biogás del tratamiento C_25 cayó considerablemente al día 15 con un rendimiento de 19.87 ml /g SV_{añadido}, y en C_50 al día 13 hubo una generación de 45 ml /g SV_{añadido} y para el día 15, 15.48 ml /g SV_{añadido}. El rendimiento del resto de los tratamientos fue aminorando al día 18, y para el día 21 la generación de biogás fue mínima para todos los tratamientos.

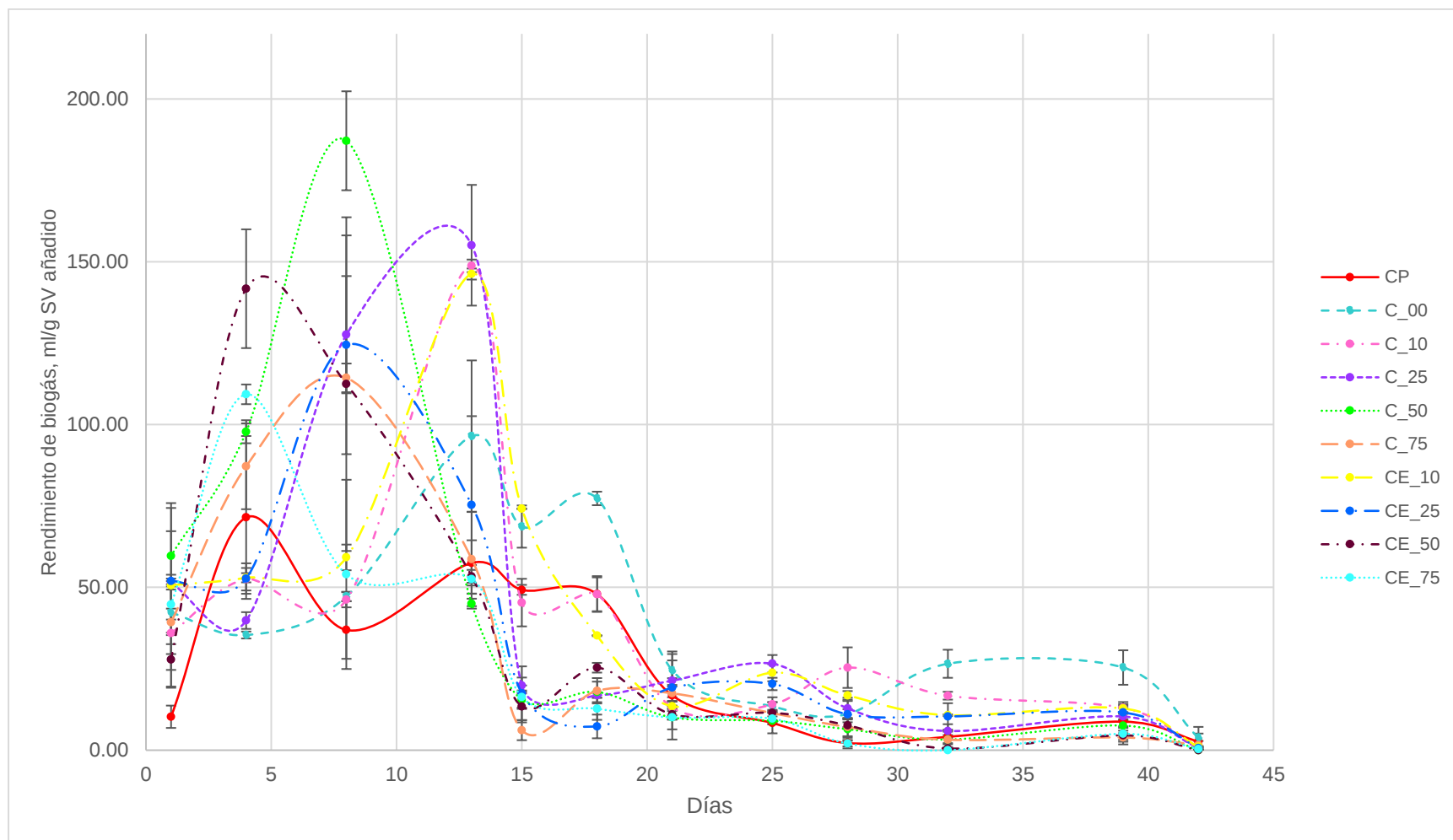


Figura 7. Generación de biogás por día de los tratamientos. CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

En la Figura 8 y en la Tabla 11 se expone el rendimiento acumulado de biogás de todos los tratamientos. Los tratamientos CE_10 y C_25 alcanzaron los rendimientos mayores con una generación acumulada de 497.08 y 488.21 ml /g SV_{añadido} respectivamente, sin embargo, entre estos dos valores no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$).

Por otra parte, existió un incremento en la generación de biogás con respecto al tratamiento control (C_00) de un 5.27% con el tratamiento CE_10 y de un 3.39% con C_25, mientras que con el resto de los tratamientos hubo un decremento, siendo el tratamiento CE_75 el que presentó un menor rendimiento con un valor de -32.94% de producción de biogás.

Tabla 11. Rendimiento acumulado de biogás de todos los tratamientos.

Tratamiento	Rendimiento de biogás (ml /g SV _{añadido})
CP	316.26 ± 34.10
C_00	472.18 ± 58.89
C_10	458.11 ± 33.73
C_25	488.21 ± 20.43
C_50	459.39 ± 17.56
C_75	368.51 ± 60.93
CE_10	492.86 ± 13.77
CE_25	402.44 ± 31.41
CE_50	413.10 ± 30.29
CE_75	316.62 ± 27.95

CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

El contenido de metano en el biogás en todos los tratamientos se presenta en la Tabla 12. Se puede observar que para el día 1, el contenido de metano es bajo, pues todas las muestras oscilan entre 12-28% de metano en el biogás, sin embargo, para el día 4 algunas muestras aumentan su contenido de metano entre 27-58%. En el tratamiento C_50, el cual tuvo su pico de generación de biogás al día 8, tuvo ese día un contenido de metano del 75.03%, mientras que C_25 en el día 13 presentó un contenido de metano del 79.03%. En aquel tratamiento donde no se adicionó consorcio (C_00), en sus picos de metano, día 13 y 18, el biogás tuvo un contenido de metano del 68.53% y 76.50%.

A partir del día 13, la mayoría de las muestras presentan en promedio un contenido de alrededor del 70%, sin embargo, no significa que la generación de biogás haya sido abundante en todas ellas.

En la siguiente sección, se presentan a detalle los rendimientos de metano de cada una de las muestras.

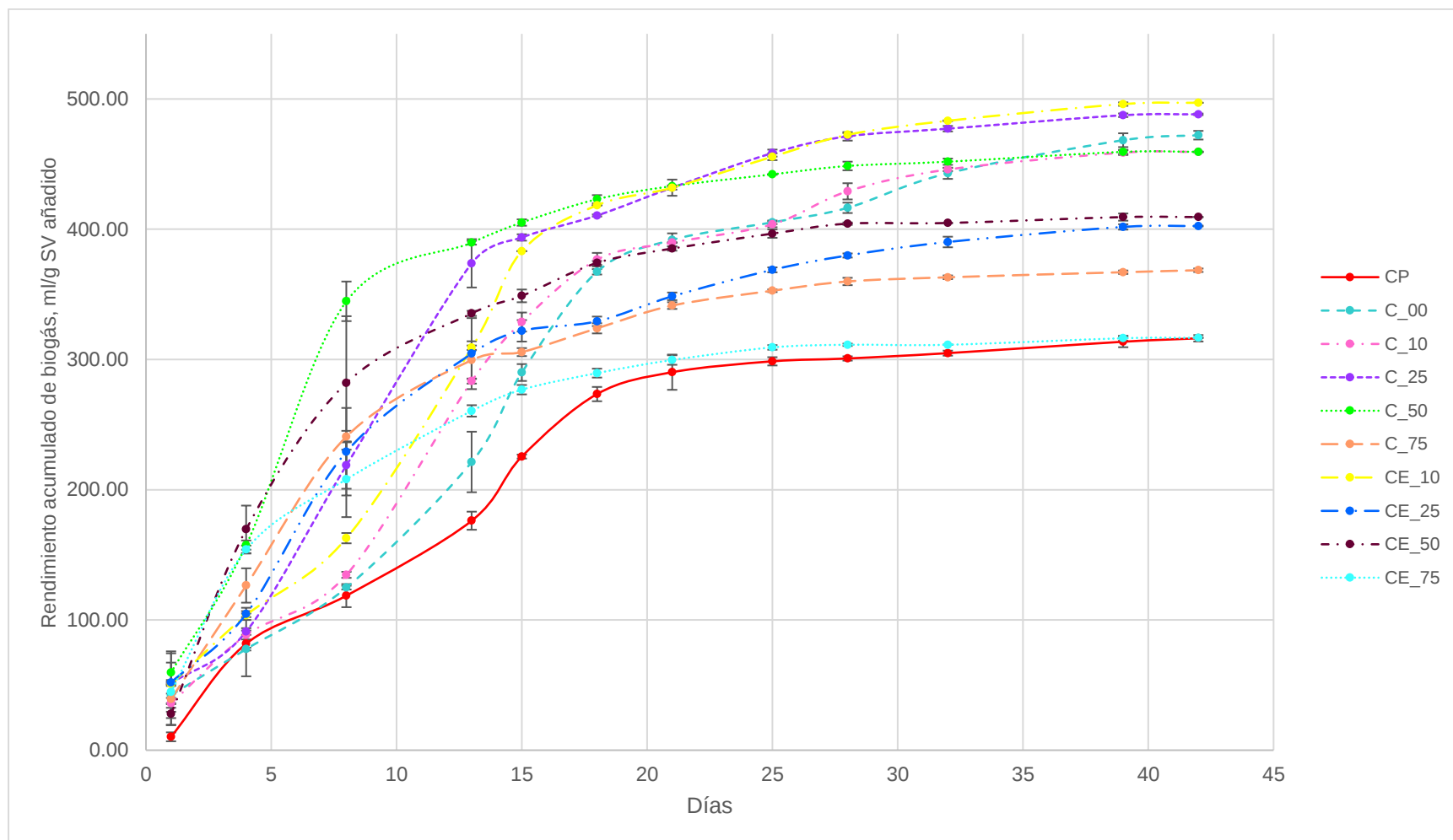


Figura 8. Rendimiento acumulado de biogás de todos los tratamientos. CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

Tabla 12. Composición de metano en biogás durante el proceso de DA.

Tratamiento	Días de proceso									
	1	4	8	13	15	18	21	25	28	32
CP	12.40 ± 1.91	27.63 ± 0.64	26.27 ± 0.57	53.47 ± 1.14	70.03 ± 0.35	76.40 ± 0.46	75.83 ± 3.97	73.43 ± 1.06	73.13 ± 2.05	72.67 ± 3.79
C_00	20.17 ± 1.56	29.63 ± 3.65	35.57 ± 1.33	68.53 ± 4.17	76.50 ± 0.50	76.50 ± 1.65	72.47 ± 2.18	70.60 ± 0.26	70.87 ± 1.40	70.03 ± 1.97
C_10	19.20 ± 5.63	31.97 ± 1.92	39.43 ± 4.21	75.93 ± 0.31	77.47 ± 4.95	75.60 ± 6.84	71.97 ± 6.01	71.70 ± 5.20	72.87 ± 5.12	72.63 ± 5.80
C_25	21.63 ± 4.10	36.83 ± 0.29	64.90 ± 4.87	79.03 ± 3.48	66.93 ± 3.74	65.70 ± 1.42	67.07 ± 3.80	67.30 ± 3.94	64.80 ± 3.80	65.03 ± 2.87
C_50	28.43 ± 4.16	54.47 ± 1.70	75.03 ± 0.40	66.87 ± 1.35	64.63 ± 2.76	64.87 ± 0.87	61.93 ± 2.32	61.57 ± 2.70	60.97 ± 0.75	63.87 ± 0.86
C_75	28.27 ± 3.18	54.67 ± 4.37	71.20 ± 2.31	70.77 ± 4.31	64.63 ± 1.18	66.00 ± 0.17	65.90 ± 1.83	65.23 ± 1.72	63.73 ± 0.55	63.27 ± 1.88
CE_10	19.23 ± 2.77	30.17 ± 5.44	43.73 ± 3.59	77.57 ± 2.75	76.77 ± 1.50	69.40 ± 5.29	67.23 ± 5.13	70.40 ± 5.51	72.27 ± 5.92	71.07 ± 3.10
CE_25	18.80 ± 2.55	36.97 ± 3.04	63.60 ± 15.57	72.87 ± 4.34	64.97 ± 3.71	63.30 ± 2.31	66.03 ± 1.21	70.03 ± 1.18	69.80 ± 3.68	67.37 ± 2.05
CE_50	26.20 ± 4.40	50.20 ± 13.80	71.70 ± 4.80	70.10 ± 4.80	67.40 ± 4.30	68.95 ± 1.35	65.95 ± 1.55	64.35 ± 0.35	63.10 ± 0.20	63.55 ± 0.75
CE_75	13.40 ± 3.67	58.07 ± 2.76	71.17 ± 0.86	73.37 ± 2.58	69.43 ± 2.83	67.13 ± 3.78	65.93 ± 3.06	65.33 ± 3.06	64.93 ± 1.99	63.60 ± 2.29

CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

4.2.1.2 Metano

En la Figura 9 se presenta los rendimientos diarios de metano de todos los tratamientos. Al igual que en los rendimientos del biogás, el tratamiento C_50 tuvo su pico de generación al día 8 (140.51 ml /g SV_{añadido}) mientras que C_25 al día 13 (123.38 ml /g SV_{añadido}). El tratamiento C_00 en sus picos de metano alcanzó valores de 66.37 y 59.17 ml /g SV_{añadido}, respectivamente. Los demás tratamientos tuvieron un rendimiento de entre 9.67 – 115.49 ml /g SV_{añadido} durante el periodo de los días 8 al 13. Cabe resaltar que el tratamiento C_50 para el día 13 tuvo una caída considerable de generación, alcanzando un valor de 30.11 ml /g SV_{añadido}, mientras que C_25 tuvo su caída al día 15 (13.37 ml /g SV_{añadido}). Para el resto de los tratamientos, el rendimiento de metano fue decreciendo a partir del día 15.

En la Figura 10 y Tabla 13 se presentan los rendimientos acumulados de cada uno de los tratamientos. El tratamiento CE_10 tuvo la mayor generación de metano con 303.51 ml /g SV_{añadido} seguido de C_25 con 303.19 ml /g SV_{añadido}. Entre estos dos valores no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$).

El incremento en la generación de metano con respecto al tratamiento control (C_00) fue de 4.34% con el tratamiento CE_10 y de un 4.23% con C_25, mientras que con el resto de los tratamientos hubo un decremento, siendo CE_75 el que presentó un menor rendimiento con -30.23% de producción de metano.

Tabla 13. Rendimiento acumulado de metano de todos los tratamientos.

Tratamiento	Rendimiento de metano (ml CH ₄ /g SV _{añadido})
CP	166.19 ± 16.02
C_00	290.90 ± 32.00
C_10	281.79 ± 6.18
C_25	303.19 ± 7.71
C_50	288.08 ± 15.43
C_75	228.74 ± 28.06
CE_10	303.48 ± 16.78
CE_25	274.27 ± 19.88
CE_50	247.49 ± 58.50

CE_75

202.96 ± 28.70

CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

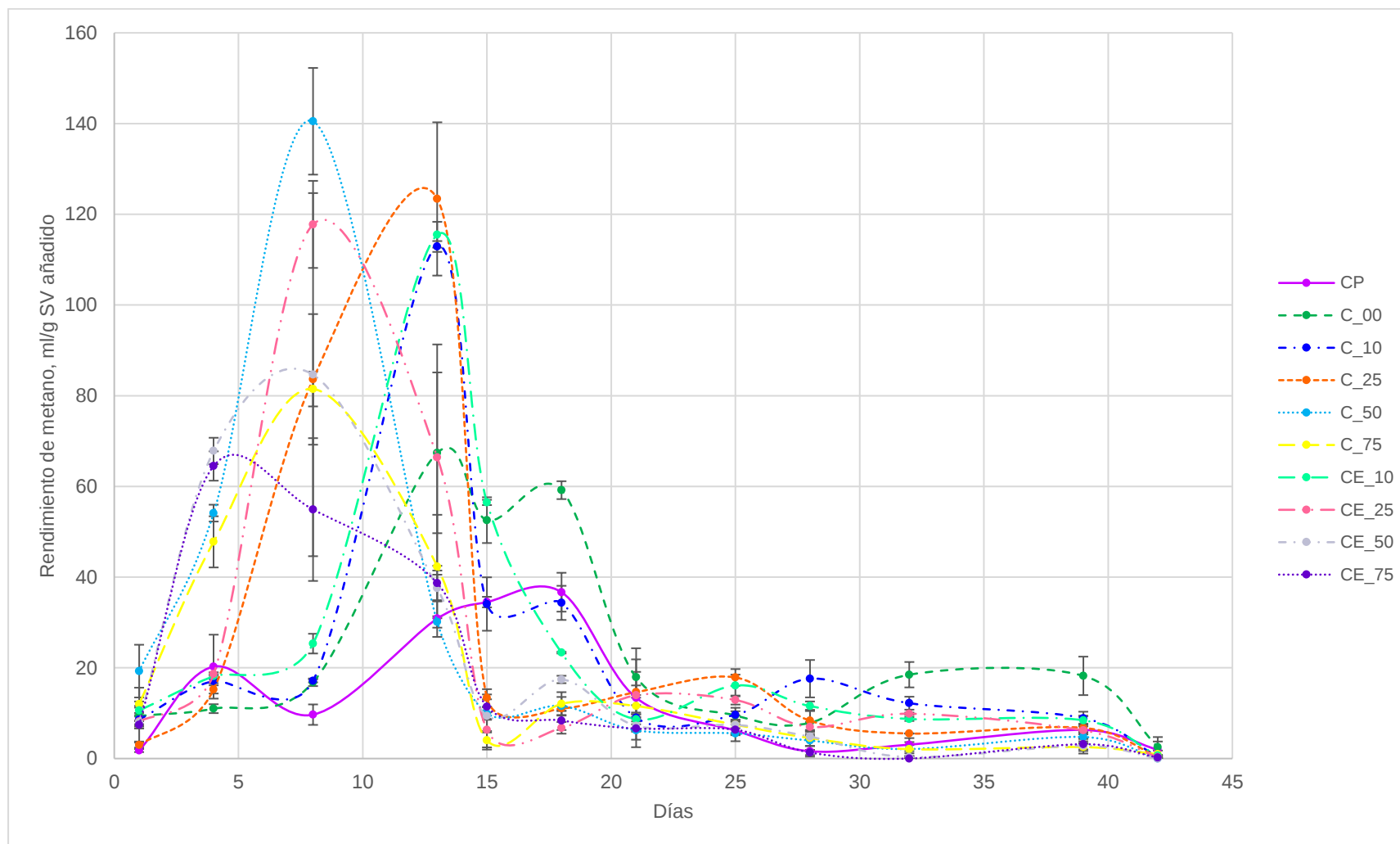


Figura 9. Generación de metano por día de los tratamientos. CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

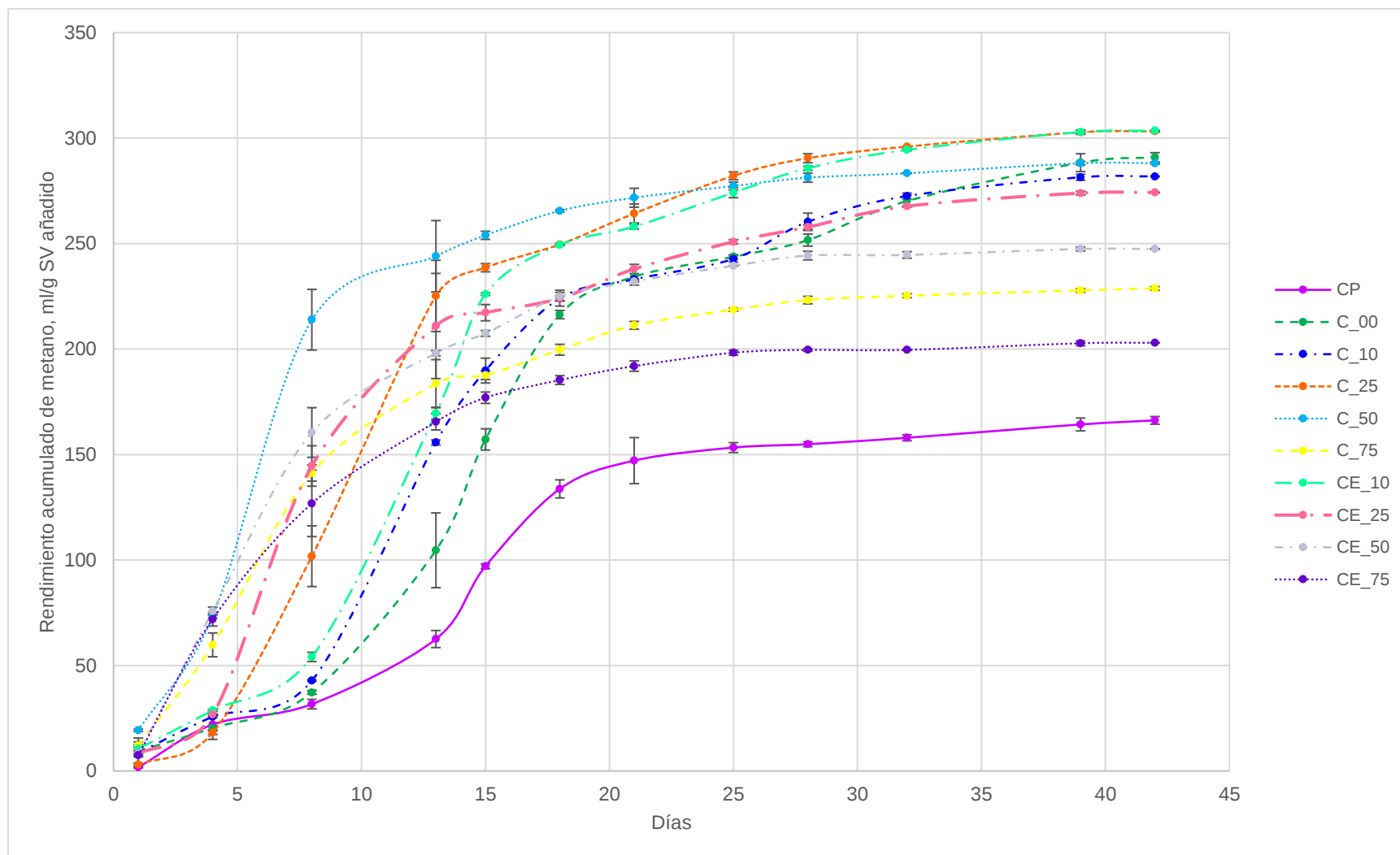


Figura 10. Rendimiento acumulado de metano de todos los tratamientos. CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril.

4.2.2 Prueba bioquímica de metanización de 3 experimentos

Después de obtener los resultados de generación de metano del primer experimento empleando el consorcio metanogénico activo, se tuvo la inquietud por conocer si este comportamiento se replicaría, por lo que la PBM se repitió dos ocasiones más (experimentos independientes), únicamente considerando los tratamientos C_00, C_25 y C_50, pues fueron éstos los que presentaron picos anticipados en la generación de metano en comparación con el control.

En la Figura 11 se muestran los rendimientos tanto de biogás como de metano de los 3 tratamientos, promediando los resultados de los 3 experimentos. En términos de biogás, los rendimientos de C_00, C_25 y C_50 fueron: 478.43, 485.60 y 431.27 ml biogás/ g SV_{añadido} respectivamente. Para el caso del metano los rendimientos fueron, en el mismo orden, 320.63, 292.56 y 269.80 ml CH₄/ g SV_{añadido}. Tanto en términos de biogás como de metano no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

El rendimiento de biogás aumentó en un 1.43% (C_25) en comparación con el control, mientras que, en términos de metano, no hubo incremento en comparación con C_00.

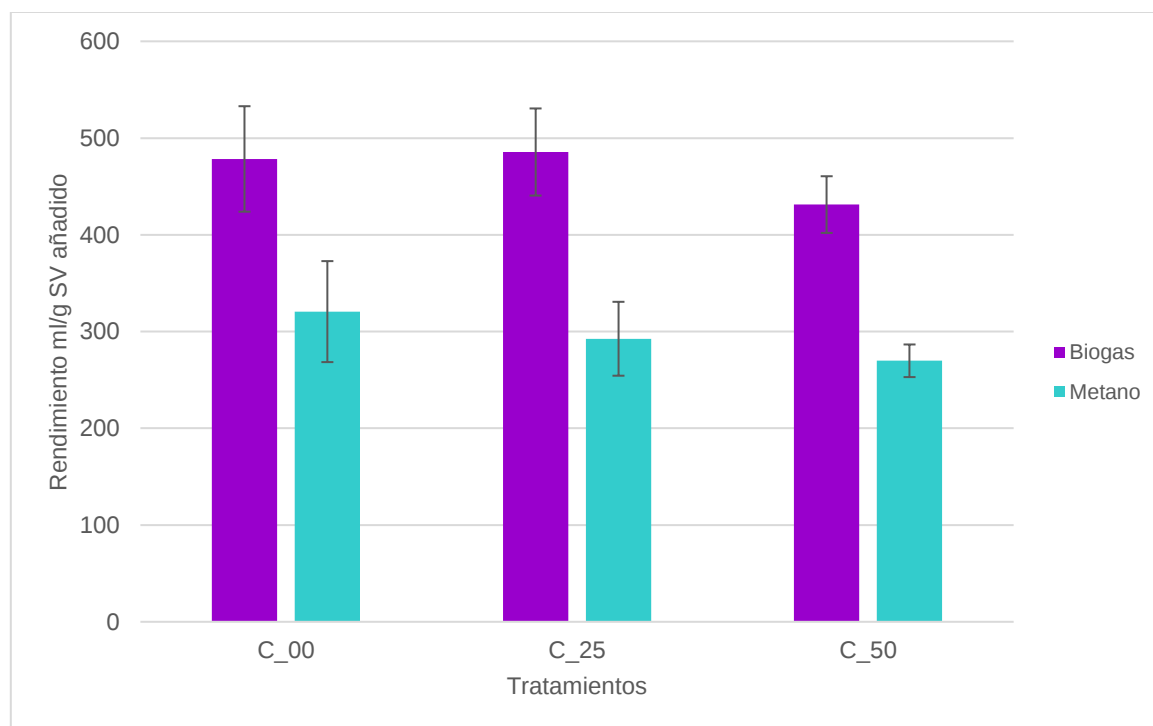


Figura 11. Rendimientos de biogás y metano de 3 experimentos.

A pesar de que, en términos de rendimiento acumulado, la adición del consorcio no influyó en el incremento ni de biogás ni de metano, se replicó un comportamiento previamente visto en el primer experimento. El tratamiento C_50 presentó en ambas ocasiones, primero su pico de generación (día 3, 74.70; día 3, 80.75 ml/g SV_{añadido}), seguido de C_25 (día 8, 69.73; día 10, 59.28 ml/g SV_{añadido}) y finalmente C_00 (día 19, 117.02; día 22, 80.99 ml/g SV_{añadido}), (Figura 12).

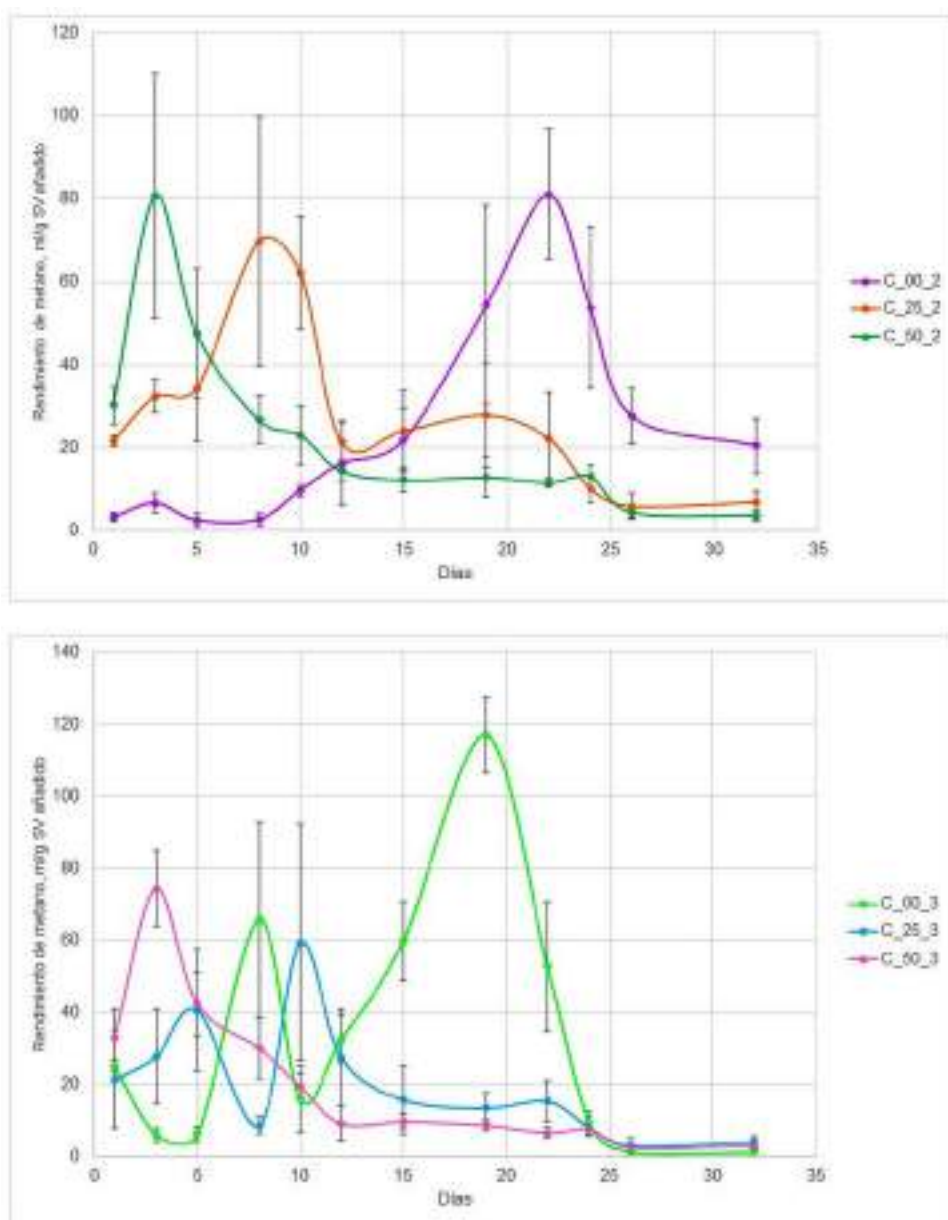


Figura 12. Generación de metano por día de los experimentos adicionales.

De igual forma que en el primer experimento, en aquellos tratamientos donde hubo adición de consorcio, la calidad del biogás se vio mejorada en los picos de generación en comparación con el control. En la tabla 14 se muestra la composición de metano en el biogás en cada tratamiento.

Tabla 14. Composición de metano en biogás en picos de generación.

2do experimento			3er experimento	
C_00	Día 22	79.63%	Día 19	82.57%
C_25	Día 10	73.40%	Día 8	71.77%
C_50	Día 3	66.83%	Día 3	67.13%

Se puede observar que en C_50 ambos picos se presentaron al día 3, con una composición de metano cercano a 70%, sin embargo, es de resaltar que, en ese día, los otros dos tratamientos tuvieron menos de 50% de composición: C_25 (42.73% y 47.83%) y C_00 (22.60% y 25.83%).

El control (C_00) en ambos experimentos presentó los mayores valores de composición de metano, sin embargo, sus picos se presentaron ~19 días después de C_50 y ~12 días después de C_25. Dado estos resultados, es entendible por qué este tratamiento tuvo el mayor rendimiento de metano.

4.2.3 Digestión anaerobia semiseca

Para que la realización de este experimento fuera posible, el diseño y la construcción del reactor fue pensado para que la adición del consorcio pudiera incorporarse días después del inicio del proceso de digestión, una vez pasada la etapa acidogénica, por lo que el seguimiento del pH fue determinante los primeros días del proceso.

La producción de metano en el reactor control, tuvo una generación débil en los primeros días y a partir del día 17 el metano empezó a aumentar (9.39 ml/g SV) hasta llegar al pico al día 28 (54.46 ml/g SV, 72.60% CH₄), sin embargo, para el día 31 la generación tuvo una caída abrupta (22.67 ml/g SV). Por el contrario, el reactor con 10% v/v de consorcio tuvo desde el inicio del proceso, un crecimiento constante hasta alcanzar el pico de generación al día 14 (62.11 ml/g SV, 68%) y un decaimiento evidente a partir del día 21 (41.85 ml/g SV) (Figura 13).

En términos de calidad del biogás, el tratamiento control tuvo una composición de metano del 64-74% a partir del día 21 de operación, mientras que en los días previos los valores oscilaron entre 28-45%. Por el contrario, el tratamiento con consorcio tuvo a partir del día 10 una composición del 61% llegando a un máximo de 71%.

En la Figura 14 se muestran los rendimientos acumulados de ambos reactores, en donde el control alcanzó 194.01 ml/g SV y el tratamiento 254.91 ml/g SV, esto representó un incremento del 31.39% en comparación con el control.

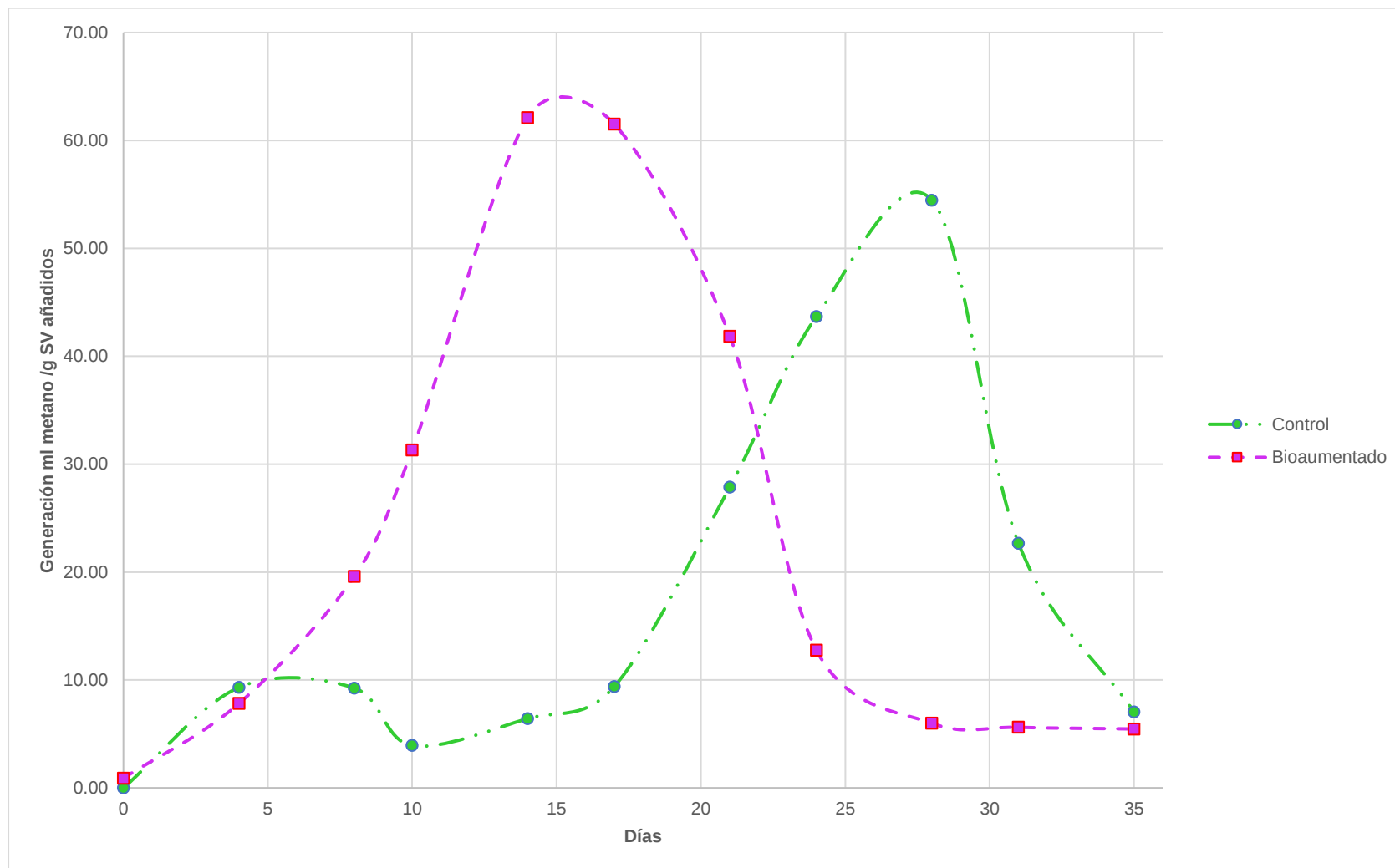


Figura 13. Generación de metano por día en reactores de 2L.

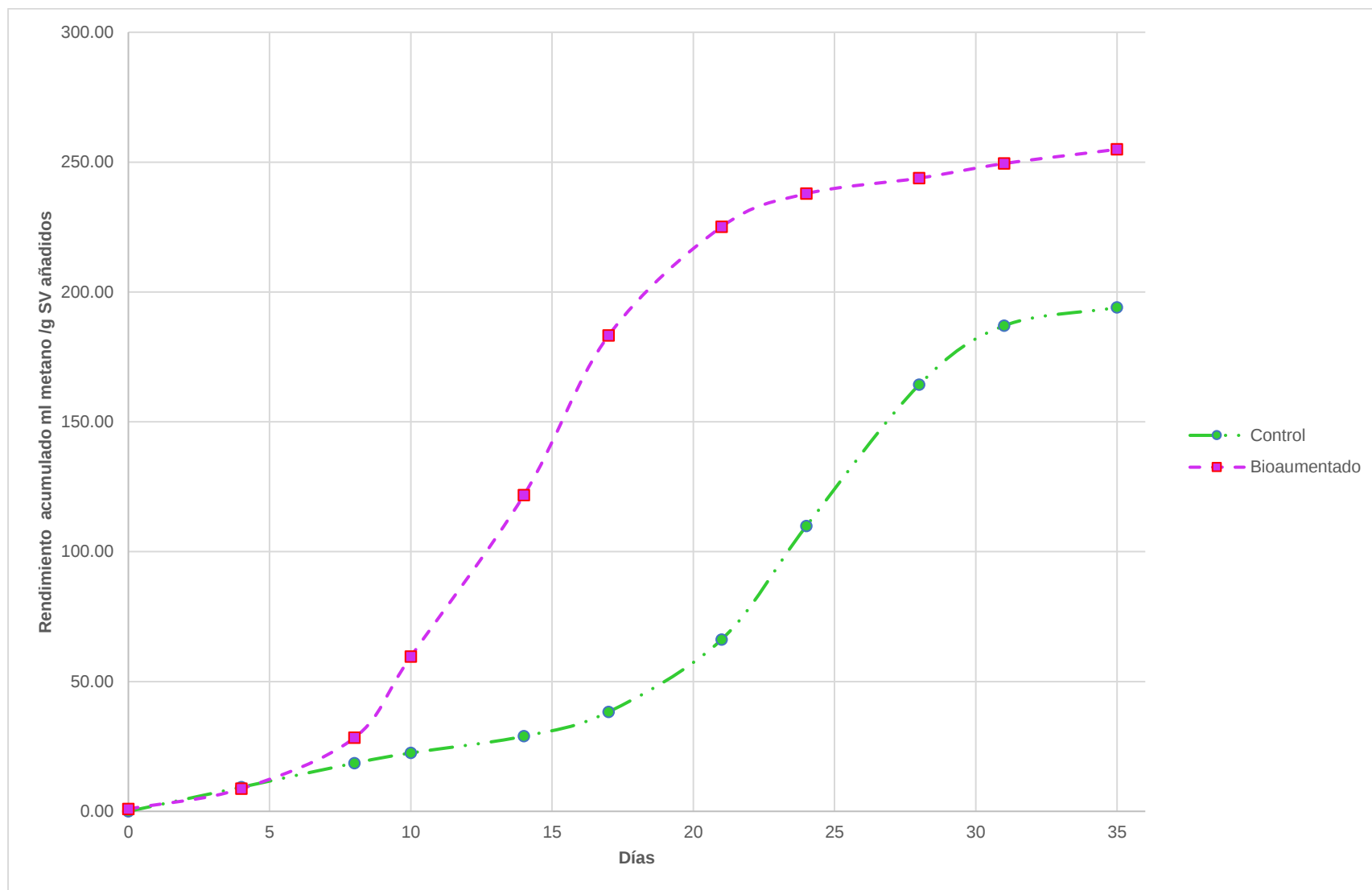


Figura 14. Rendimiento acumulado de metano en reactores de 2L.

4.3 Características fisicoquímicas del digestato

4.3.1 Prueba bioquímica de metanización

Al término de los 42 días de experimentación, se realizaron las determinaciones fisicoquímicas del digestato (producto final), las cuales se presentan en la Tabla 15. El pH de todos los tratamientos fue ligeramente alcalino (7.80 – 8.49), mientras que el ORP no fue tan reducido como se esperaba, el valor más negativo (más reducido) se encontró en el tratamiento CE_10 (-103.75 mV) y el tratamiento que obtuvo incluso valores positivos (posible entrada de oxígeno) fue C_75 con un valor de 5.40 mV.

En términos de sólidos totales, CP tuvo la mayor concentración con 31.27 g/kg mientras que los tratamientos C_75 y CE_75 presentaron los menores valores con 7.25 y 7.97 g/kg respectivamente. La mayor reducción de sólidos volátiles se vio reflejada en el tratamiento CE_50 (75.80%), y en cuanto a los tratamientos que obtuvieron mejores rendimientos tanto de biogás como de metano se encontró que en C_25 la reducción fue de 67.95% y en CE_10 fue de 74.93%. La menor reducción se encontró en CP con 31.18%. En cada uno de los parámetros se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

4.3.2 Prueba bioquímica de metanización de 3 experimentos

En la Tabla 16 se muestran los parámetros fisicoquímicos de los 3 experimentos independientes. Los valores de pH como del ORP fueron muy similares al que se describió en la sección anterior, el pH fue ligeramente alcalino y el ORP poco reducido. Sin embargo, en estos dos parámetros no existió diferencia significativa entre los tratamientos. En los parámetros de CE, ST, SV y relación de SV/ST se observa que los valores de cada parámetro van disminuyendo conforme se adiciona más volumen de cultivo activo; en los primeros 3 parámetros, existe diferencia significativa entre los tratamientos. Finalmente, la reducción de SV fue mayor en el tratamiento C_50 (73.25%) y la menor en C_00 (71.07%), en este caso no existieron diferencias significativas.

Tabla 15. Características fisicoquímicas del digestato.

Parámetros							
Tratamientos	pH	ORP (mV)	CE (mS/cm)	ST (g/kg)	SV (g/kg)	Relación VS/TS (%)	Reducción de SV (%)
CP	8.49 ± 0.06	-43.60 ± 9.32	47.67 ± 2.88	31.27 ± 4.33	15.02 ± 2.00	48.40 ± 6.94	31.18 ± 8.18
C_00	8.45 ± 0.03	-83.70 ± 0.90	51.15 ± 6.28	22.54 ± 4.66	7.71 ± 0.83	34.79 ± 5.32	63.12 ± 8.63
C_10	8.20 ± 0.10	-33.17 ± 3.35	46.29 ± 4.97	17.27 ± 1.50	4.06 ± 0.45	23.51 ± 0.69	72.50 ± 1.06
C_25	8.21 ± 0.11	-21.23 ± 1.45	38.12 ± 5.29	21.45 ± 1.22	5.04 ± 0.33	23.50 ± 1.41	67.95 ± 6.30
C_50	7.91 ± 0.07	-5.45 ± 1.25	30.18 ± 1.06	12.19 ± 1.10	2.98 ± 0.30	24.42 ± 0.26	71.10 ± 0.41
C_75	7.82 ± 0.04	5.40 ± 1.20	22.71 ± 3.00	7.25 ± 1.04	1.67 ± 0.28	22.92 ± 0.78	73.38 ± 1.17
CE_10	8.38 ± 0.05	-103.75 ± 20.55	41.61 ± 4.35	19.21 ± 1.08	4.21 ± 0.26	21.89 ± 0.21	74.93 ± 0.30
CE_25	8.28 ± 0.05	-54.73 ± 8.35	36.82 ± 4.50	17.56 ± 0.83	3.92 ± 0.41	22.31 ± 1.55	74.51 ± 2.66
CE_50	7.80 ± 0.48	-69.45 ± 3.95	27.88 ± 3.52	10.42 ± 0.90	2.23 ± 0.41	21.25 ± 2.16	75.80 ± 3.07
CE_75	7.81 ± 0.02	-53.37 ± 3.07	16.98 ± 2.02	7.97 ± 1.25	1.92 ± 0.43	23.84 ± 2.01	71.94 ± 3.07
Valor de <i>p</i>	0.002 ^a	<0.001 ^a	<0.001 ^b	0.001 ^a	0.001 ^a	0.012 ^a	<0.001 ^b

ORP: potencial óxido-reducción; CE: conductividad eléctrica; ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles. CP: Control Positivo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo; CE_10: 10% consorcio estéril; CE_25: 25% consorcio estéril; CE_50: 50% consorcio estéril; CE_75: 75% consorcio estéril. a: Kruskal-Wallis; b: ANOVA-Unifactorial.

Tabla 16. Características del digestato de los 3 experimentos.

Parámetros	Tratamientos			Valor de <i>p</i>
	C_00	C_25	C_50	
pH	8.17 ± 0.27	8.07 ± 0.13	7.80 ± 0.12	0.112 ^a
ORP (mV)	-68.90 ± 3.29	-36.23 ± 5.05	-61.42 ± 17.48	0.100 ^b
CE (mS/cm)	47.22 ± 4.05	36.00 ± 1.86	32.29 ± 4.57	0.006 ^a
ST (g/kg)	24.77 ± 2.04	20.84 ± 0.81	14.03 ± 1.67	<0.001 ^a
SV (g/kg)	7.79 ± 0.90	5.88 ± 0.76	4.07 ± 0.95	0.006 ^a
Relación SV/ST (%)	31.67 ± 3.80	28.31 ± 4.16	28.70 ± 3.72	0.439 ^b
Reducción de SV (%)	71.07 ± 7.59	72.29 ± 3.75	73.25 ± 1.88	0.835 ^a

ORP: potencial óxido-reducción; CE: conductividad eléctrica; ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles; C_00: Consorcio 0%; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo. a: ANOVA-Unifactorial; b: Kruskal-Wallis.

La Figura 15 muestra la apariencia de los residuos orgánicos usados como sustrato en el antes y después del proceso de DA termófila.



Figura 15. Reactores antes y después del proceso de digestión anaerobia termófila.

4.3.3 Digestión anaerobia semiseca

La Tabla 17 muestra los parámetros del digestato después del proceso de DA semiseca. El pH en ambos casos fue ligeramente alcalino, sin embargo, al día 8 del proceso, el control tuvo una fuerte caída de pH (5.2) recuperándose al día 10 (6.8). En el caso del tratamiento, el pH tuvo una ligera caída al día 4 (6.53) y recuperándose al día 8 (7.34) (Figura 16).

El ORP en los dos reactores se mantuvo con valores negativos (-400 mV) mientras que la conductividad eléctrica fue más alta en el control que en el tratamiento.

En términos de reducción de sólidos volátiles, el control fue ligeramente más eficiente con una degradación del 85.41% mientras que el tratamiento fue de 84.12%, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 17. Características del digestato en el experimento de la digestión semiseca.

Parámetros	Tratamientos		Valor de p^a
	Control	Bioaumentado	
pH	8.14 ± 0.03	8.23 ± 0.02	0.008
ORP (mV)	-408.40 ± 10.42	-401.90 ± 17.73	0.613
CE (mS/cm)	44.23 ± 1.65	33.74 ± 1.95	0.002
ST (g/kg)	37.68 ± 1.22	30.93 ± 3.39	0.032
SV (g/kg)	13.37 ± 1.19	11.57 ± 1.08	0.124
Relación SV/ST (%)	35.44 ± 3.80	37.44 ± 0.64	0.179
Reducción de SV (%)	85.41 ± 1.31	84.12 ± 0.43	0.182

ORP: potencial óxido-reducción; CE: conductividad eléctrica; ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles. ^a t-student.

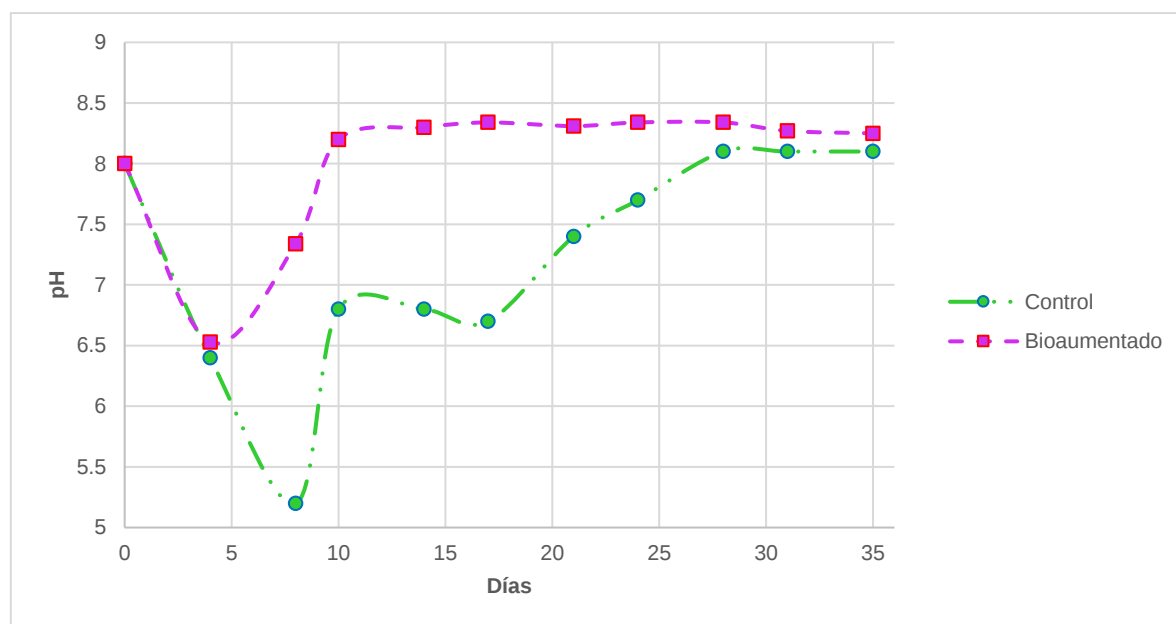


Figura 16. pH por día en tratamientos de 2L.

La Figura 17 muestra la apariencia de los residuos orgánicos usados como sustrato en el antes y después del proceso de DA termófila en el reactor de mayor tamaño. Al final del proceso se pudo apreciar residuo de difícil degradación como hojas y pequeñas ramas.



Figura 17. Reactores antes y después del proceso de digestión anaerobia termófila en reactor de mayor volumen.

4.4 Comunidades microbianas

En esta sección, se describirán las comunidades microbianas que estuvieron involucradas en el proceso de DA termofílica cuando se añadieron diferentes volúmenes, únicamente de consorcio activo, así como el control.

4.4.1 Cultivo metanogénico hidrogenotrófico

En la Figura 18 y 19 se presentan las comunidades de bacterias y arqueas respectivamente. En el dominio de Bacteria, se observa que las taxa más dominantes fueron: género *Anaerobaculum* (40.94%), el género *S1* de la familia *Thermotogaceae* (15.75%) y el orden *Clostridiales* (7.23%); las demás taxa se encontraron en menos de un 6%.

En términos de Arqueas, el género *Methanoculleus* tuvo una abundancia de 74.10%, la familia *Methanomicrobiaceae* de 11.59% y el género *Methanomassiliicoccus* de 5.95%. Las demás taxa estuvieron presentes en menos de 5%.

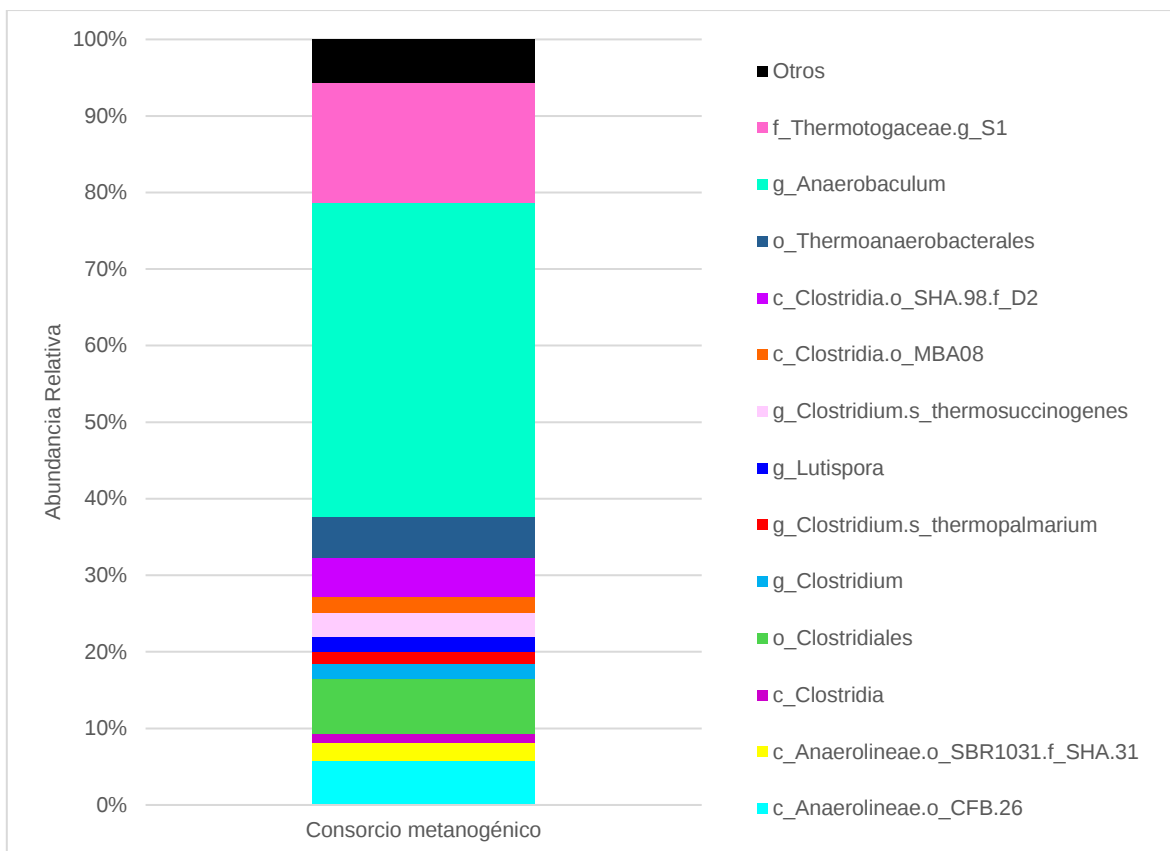


Figura 18. Bacteria. Abundancia relativa del cultivo metanogénico hidrogenotrófico.

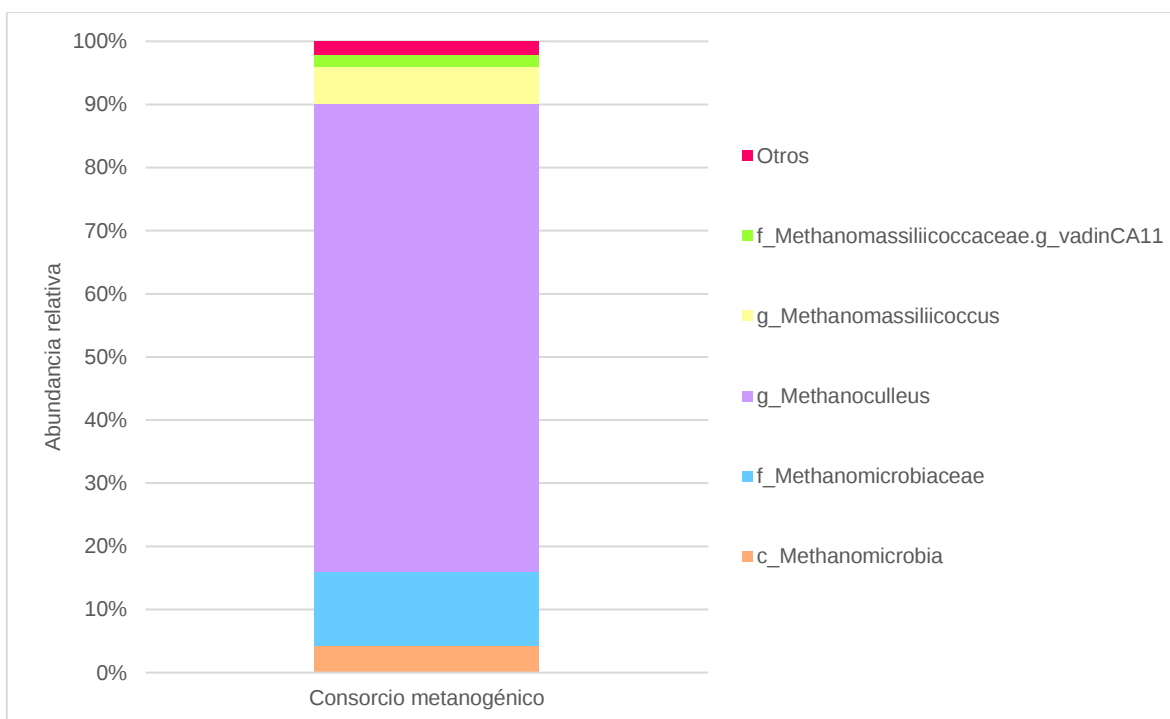


Figura 19. Archaea. Abundancia relativa del cultivo metanogénico hidrogenotrófico.

4.4.2 Prueba bioquímica de metanización

En las siguientes figuras se presentarán los datos de las taxa encontradas durante el proceso de digestión anaerobia. En las gráficas se muestran 3 barras por cada tratamiento, las cuales representan los días 0, 17 y 32. Además, cada barra expone el promedio de 3 réplicas.

4.4.2.1 Bacteria

En la Figura 20 se presentan los fila bacterianos, encontrando que, en todos los tratamientos, en todos los periodos de muestreo, el filum más predominante fue *Firmicutes*, seguido de *Thermotogae* y *Synergistetes*. A lo largo de los 32 días, los tratamientos CN, C_00, C_10 y C_25 no presentaron variaciones considerables, sin embargo, en C_50 se aprecia que, al paso de los días, las abundancias de *Thermotogae* van en aumento pues al día 0 se registró 0.21% y a los días 17 y 32, 8.41% y 10.33% respectivamente. Caso similar se presenta en C_75 con dos fila, *Thermotogae* registra al día 0, 1.06%, para posteriormente 25.08% al día 17 y finalmente al día 32, 33.86%, mientras que el filum *Synergistetes* va en aumento empezando con 2.34% hasta 5.62% y 8.68%.

La Figura 21 muestra las clases bacterianas más abundantes. En todos los tratamientos predominó la clase *Clostridia* (del 75% hasta 98.62%), sin embargo, su abundancia fue decayendo al pasar de los días en el tratamiento C_75 (78.93 % a 55.62%). La clase *Bacilli* estuvo presente en todos los tratamientos al día 0 entre un 5.77-22.48%, pero al paso del tiempo su abundancia disminuyó notablemente hasta alcanzar valores de menos de 1%, excepto en el CN que al día 32 la abundancia fue de 10.33%. La clase *Synergistia* se encontró de manera casi insignificante en los tratamientos CN, C_00, C_10 y C_25 (0.13 – 2.56%), pero en los casos de C_50 y C_75 su abundancia aumentó gradualmente conforme el paso del tiempo, pasando de 1.15 – 3.42% y 2.34-8.68% respectivamente. Una tendencia similar se encontró con la clase *Thermotogae* en donde en C_50 se detectó al día 0 en un 0.21% y para el día 32 en un 10.33% y en el caso de C_75 pasó de 1.06% a 33.86%. Las clases *Actinobacteria*, *Bacteroidia* y *Spirochaetes* estuvieron en menos de 5%.

La Figura 22 muestra las taxa bacterianas más predominantes, considerando desde clases hasta especies. El orden *MBA08* de la clase *Clostridia*, fue de las taxa más abundantes en todos los tratamientos y en todos los días. La abundancia relativa de esta taxa en CN se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo (32.88 – 45.46%), mientras que en C_00 la abundancia fue incrementando gradualmente (10.16%, 15.64% a 29.45%). En los

tratamientos en donde se adicionó el cultivo activo (C_10, C_25 y C_50), el orden *MBA08* aumentó considerablemente al paso de los días, desde abundancias menores al 5% en el día 0 a abundancias de más del 30% para el día 32. Sin embargo, en el caso del tratamiento C_75, las abundancias en todos los días fueron menores del 5%. El orden *OPB54* también de la clase *Clostridia* se encontró en proporciones menores del 18% en todos los tratamientos durante todos los tiempos de muestreo, sin embargo, en el tratamiento C_75, la abundancia aumentó considerablemente del día 0 al 17 (0.04% - 29.05%) para descender a 19.24% para el día 32.

En términos de familias, predominaron *Lachnospiraceae* y *Tissierellaceae* en todos los tratamientos, excepto en CN. La abundancia máxima de *Lachnospiraceae* alcanzó 17.43% en C_00 al día 17, mientras que la abundancia máxima alcanzada por *Tissierellaceae* fue de 18.57% en C_10 al día 0.

El género *Cellulosibacter alkalithermophilus* fue prácticamente insignificante en los tratamientos CN, C_50 y C_75 durante todos los tiempos (menor del 1%). Sin embargo, en los grupos C_00, C_10 y C_25, su abundancia creció de manera considerable al día 17, pasando de valores menores de 1 % a abundancias de entre 21 - 37%, para finalmente al día 32 volver a descender, llegando a valores menores del 20%.

El género *Defluviitalea saccharophila*, se presentó en mayor proporción al día 0 únicamente en los tratamientos en donde se añadió el consorcio activo (C_10: 4.09%, C_25: 5.98%, C_50: 6.48% y C_75: 14.31%) y descendió a valores insignificantes con el paso de los días.

El género *Clostridium* también predominó en mayor cantidad al día 0 en todos los tratamientos, en un rango de 5.85% - 37.31%, y al paso de los días bajó su abundancia a valores de entre 0.2% -12.21%.

Finalmente, los géneros *Anaerobaculum* y *S1* (familia *Thermotogaceae*), que también predominaron en el consorcio metanogénico, se presentaron en mayor proporción en los tratamientos C_50 y C_75. En el caso de *Anaerobaculum* en C_50 la abundancia creció de 1.07% a 3.37%, mientras que en C_75 de 2.32% a 8.64%. El género *S1* pasó de 0.21% - 10.33% y de 1.06% - 33.86% en el tratamiento C_50 y C_75, respectivamente.

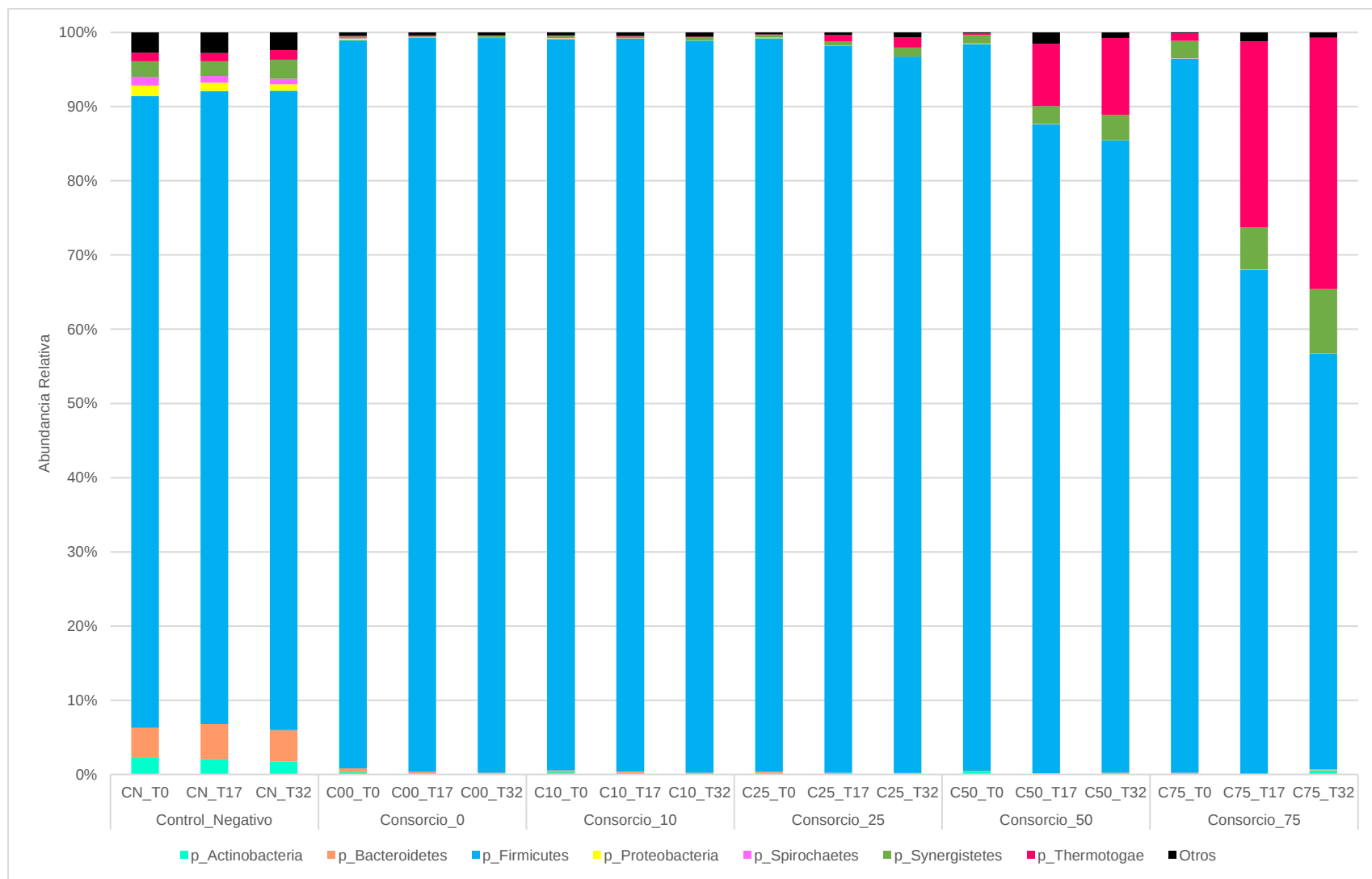


Figura 20. Abundancia relativa de los fila bacterianos dominantes de los tratamientos control y con consorcio activo durante 3 tiempos de muestreo.

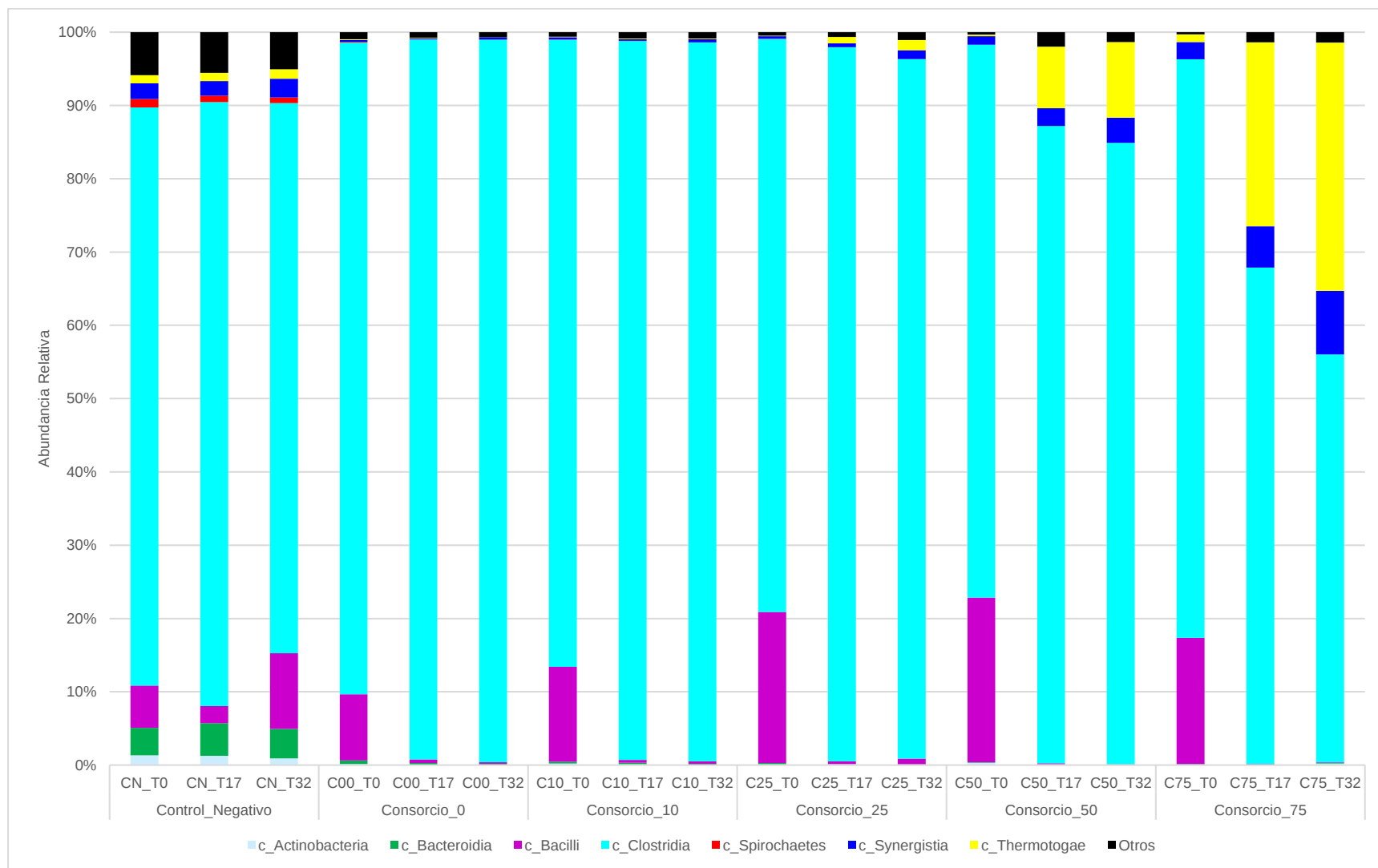


Figura 21. Abundancia relativa de las clases bacterianas dominantes de los tratamientos control y con consorcio activo durante 3 tiempos de muestreo.

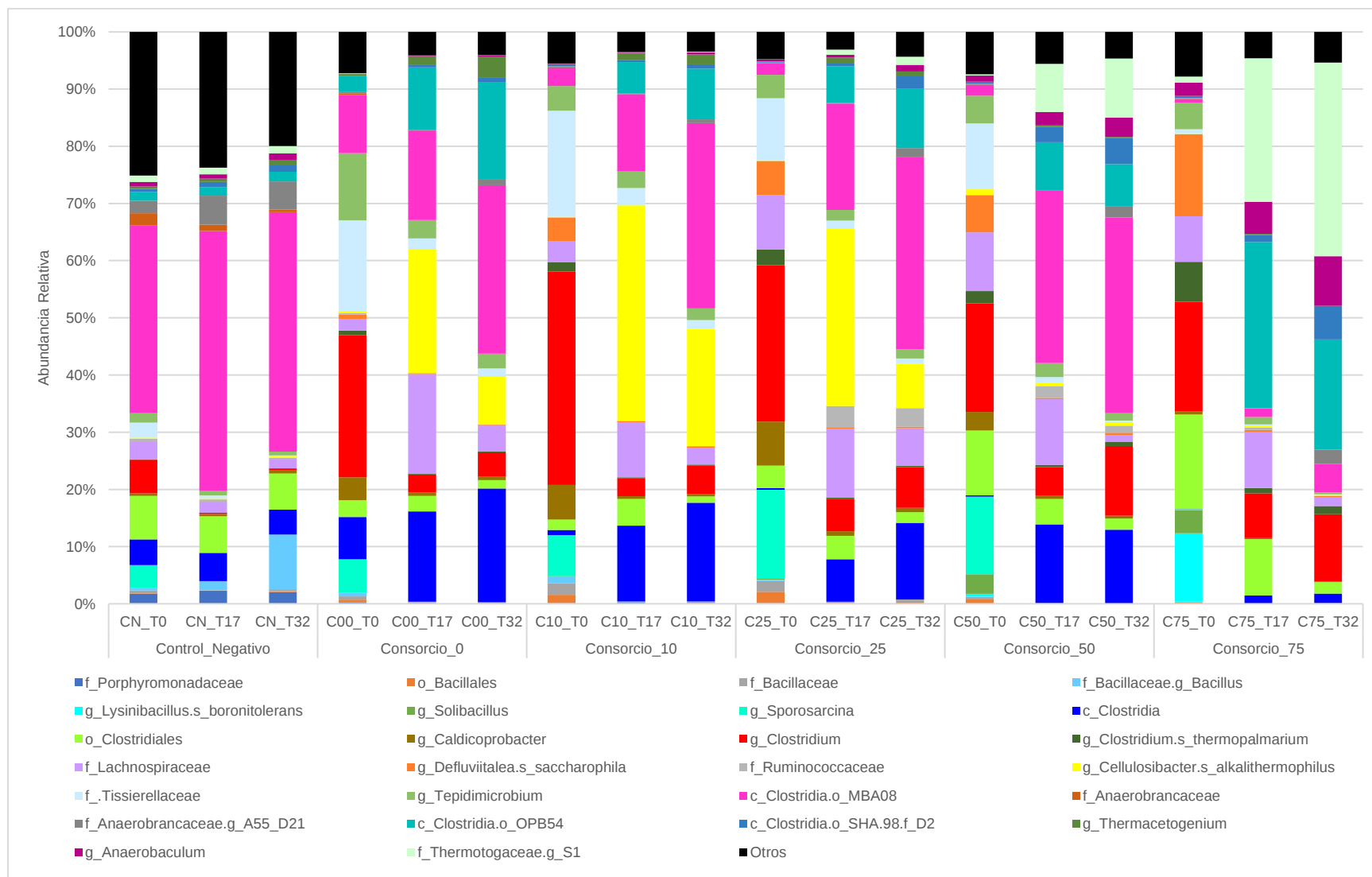


Figura 22. Abundancia relativa de las taxa bacterianas más abundantes desde clases hasta especies.

4.4.2.1.1 Diversidad

Además de conocer las taxa que estuvieron presentes durante el proceso de digestión anaerobia, se analizaron los índices de diversidad dentro de cada tratamiento (Alfa diversidad) y entre tratamientos (Beta diversidad).

Adicionalmente, se realizó el análisis LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size), el cual indica si en cada tratamiento existen taxa cuyas abundancias son estadísticamente diferentes en un grupo con respecto a los demás.

La Tabla 18 presenta los valores de los índices de alfa diversidad de cada tratamiento y en cada tiempo de muestreo, además se indica si existieron diferencias significativas en cada caso, por otro lado, en la Figura 23 se muestran los mismos valores, pero de forma gráfica. Los valores de “Observados” calcula el número total de taxa por muestra, mientras que el índice Chao 1 estima la riqueza (número de especies). Los índices de Shannon y Simpson determinan la diversidad y toman en cuenta tanto la riqueza de especies como la uniformidad (Chong et al., 2020).

Los valores de Observados y Chao1 son iguales en todos los casos, lo que quiere decir que no se perdió ninguna taxa durante los procesos de análisis bioinformáticos. En términos generales, el grupo que presentó más riqueza fue el control negativo mientras que los valores fueron descendiendo conforme se añadía más volumen de cultivo activo. De igual forma, los índices de diversidad fueron más altos en el CN, y éstos fueron descendiendo conforme se aumentó el cultivo metanogénico, sin embargo, el grupo C_50 presentó valores más altos en comparación con el resto, pero no más altos que el CN. Al hacer comparaciones entre grupos para cada índice, se encontró que en los 4 casos las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$).

Tabla 18. Bacteria. Índices de alfa diversidad de todos los grupos y en cada tiempo.

Grupo	Días	Observados	Chao1	Shannon	Simpson
CN	Día 0	418 ± 74.64	418 ± 74.64	4.49 ± 0.01	0.94 ± 0.01
	Día 17	412 ± 19.01	412 ± 19.01	4.11 ± 0.10	0.90 ± 0.01
	Día 32	329 ± 47.75	329 ± 47.75	3.87 ± 0.14	0.90 ± 0.004
Valor de p		0.242 ^a	0.242 ^a	0.002 ^a	0.006 ^a

	Día 0	254 ± 30.38	254 ± 30.38	3.35 ± 0.31	0.89 ± 0.05
C_00	Día 17	181 ± 7.79	181 ± 7.79	2.84 ± 0.17	0.86 ± 0.04
	Día 32	133 ± 2.87	133 ± 2.87	2.90 ± 0.17	0.89 ± 0.01
	Valor de p	0.002 ^a	0.002 ^a	0.124 ^a	0.690 ^a
	Día 0	146 ± 5.72	146 ± 5.72	2.52 ± 0.59	0.76 ± 0.12
C_10	Día 17	151 ± 27.19	151 ± 27.19	2.59 ± 0.22	0.79 ± 0.07
	Día 32	147 ± 20.24	147 ± 20.24	2.69 ± 0.14	0.85 ± 0.01
	Valor de p	0.932 ^a	0.932 ^a	0.895 ^a	0.557 ^a
	Día 0	161 ± 49.20	161 ± 49.20	2.84 ± 0.26	0.86 ± 0.06
C_25	Día 17	124 ± 17.75	124 ± 17.75	2.64 ± 0.35	0.81 ± 0.09
	Día 32	142 ± 38	142 ± 38	2.99 ± 0.07	0.88 ± 0.02
	Valor de p	0.634 ^a	0.634 ^a	0.424 ^a	0.486 ^a
	Día 0	130 ± 35.52	130 ± 35.52	3.19 ± 0.15	0.92 ± 0.01
C_50	Día 17	216 ± 3.68	216 ± 3.68	3.22 ± 0.08	0.91 ± 0.01
	Día 32	124 ± 6.02	124 ± 6.02	2.87 ± 0.20	0.87 ± 0.02
	Valor de p	0.005 ^a	0.005 ^a	0.102 ^a	0.068 ^a
	Día 0	111 ± 14.70	111 ± 14.70	2.84 ± 0.19	0.88 ± 0.03
C_75	Día 17	130 ± 41.61	130 ± 41.61	2.80 ± 0.28	0.86 ± 0.05
	Día 32	116 ± 9.10	116 ± 9.10	2.60 ± 0.14	0.83 ± 0.02
	Valor de p	0.749 ^a	0.749 ^a	0.505 ^a	0.410 ^a
	Valor de p (grupos)*	<0.001 ^a	<0.001 ^a	<0.001 ^a	0.004 ^b

CN: Control Negativo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo. a) ANOVA-Unifactorial, b) Kruskal-Wallis. * Análisis estadísticos, considerando todos los grupos.

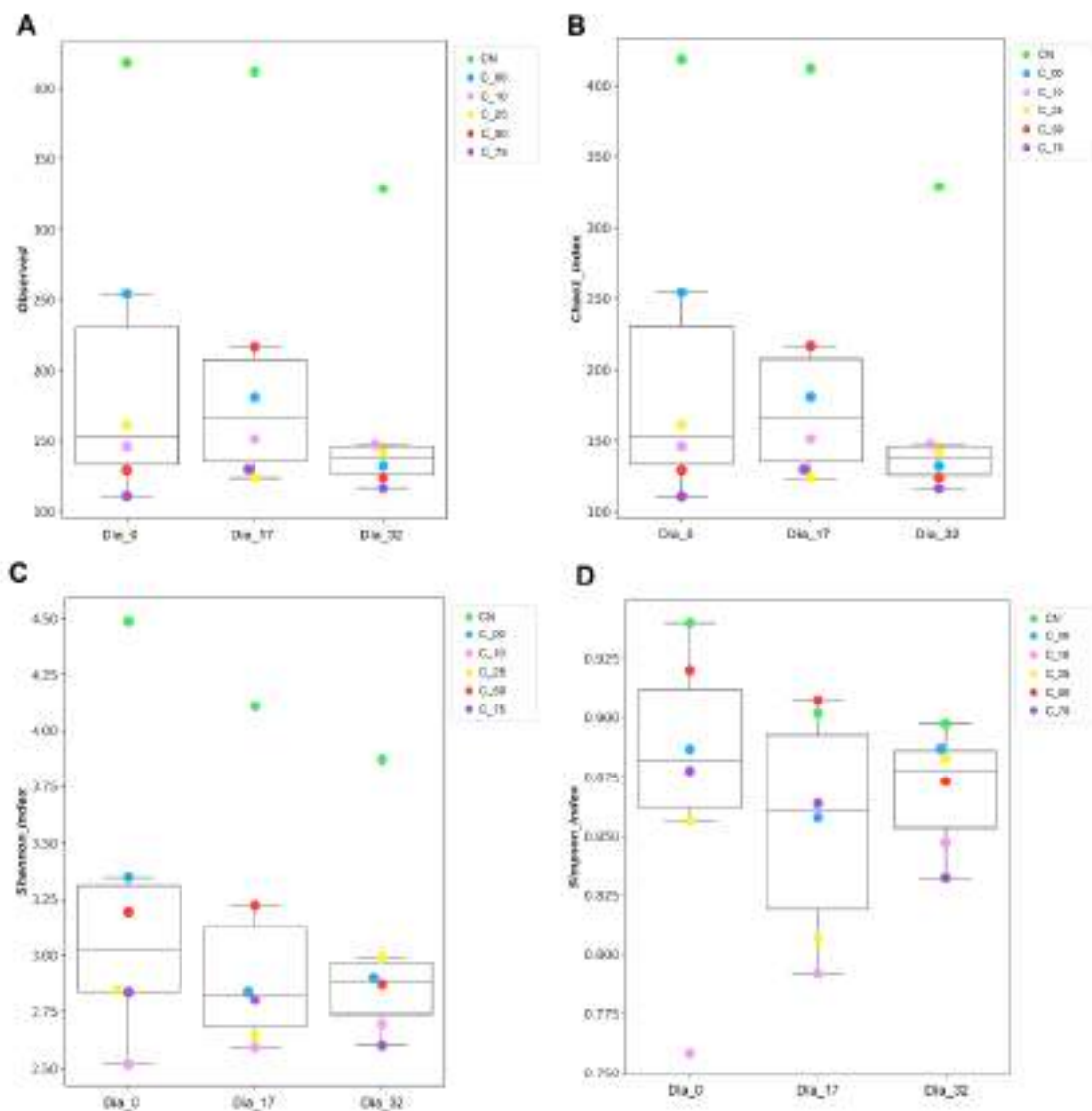


Figura 23. Bacteria. Índices de Alfa diversidad de todos los tratamientos, considerando todos los tiempos.

Para conocer si existieron diferencias entre comunidades bacterianas, se realizó un análisis de Beta diversidad. En la Figura 24 se muestra el análisis de coordenadas principales en donde se observan todos los grupos junto con todos los días de muestreo. Se puede apreciar que el CN está alejado del resto de los tratamientos, haciendo una agrupación, sin embargo, con el resto de los grupos no es posible definir conjuntos tan claros. Por otra parte, la mayoría de las comunidades de los tratamientos al día 0 se congregan, pero aquellas comunidades de los días 17 y 32 parecen mezclarse. De acuerdo con los análisis de PERMANOVA, las comunidades tanto de CN como de C_75 fueron estadísticamente

diferentes en comparación con todos los tratamientos. Las comunidades bacterianas de C_00 también difirieron de C_25, C_50 y C_75. En términos de días, las comunidades del día 0 fueron estadísticamente diferentes a las comunidades tanto del día 17 como del día 32, pero entre estos dos últimos tiempos no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$).

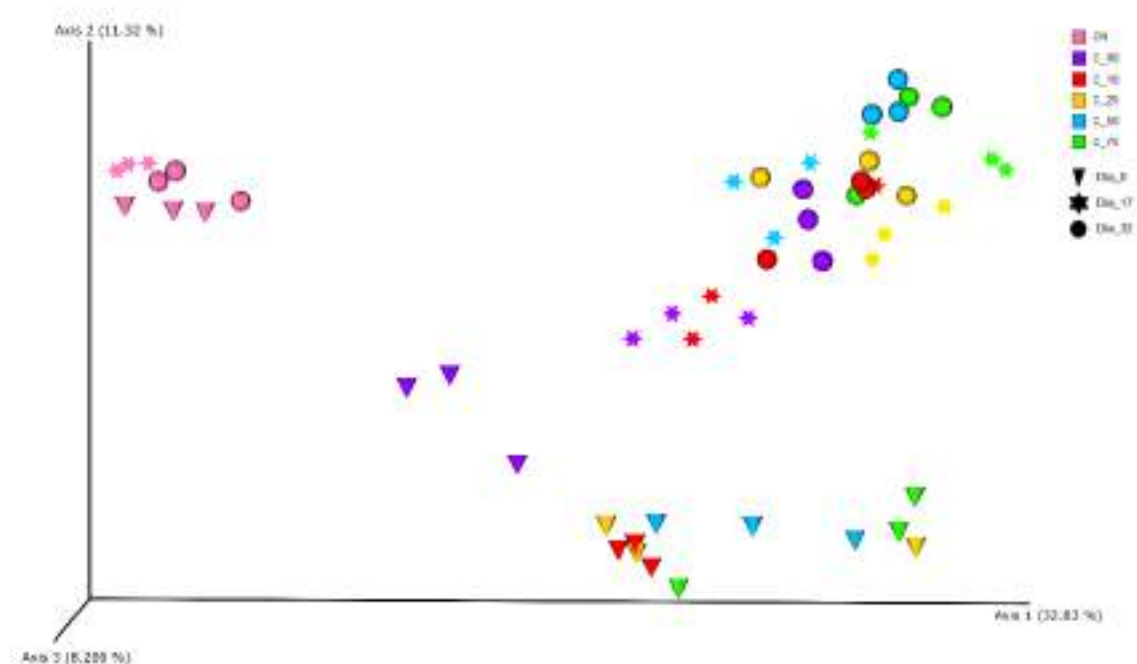


Figura 24. Bacteria. Análisis de coordenadas principales de todos los tratamientos y todos los días.

En la Figura 25 se presentan las gráficas del análisis LEfSe, A) considerando todos los tratamientos y días, B) al día 0, C) al día 17 y D) al día 32. En la Figura 25A se muestra cómo en el CN el orden *MBA08* (clase *Clostridia*) tuvo abundancias significativamente diferentes a lo largo de todo el proceso, en comparación con el resto de los grupos. En C_00 predominaron la clase *Clostridia* y el género *Tepidimicrobium*; C_10 los géneros *Clostridium* y *Cellulosibacter*; C_25 la familia *Ruminococcaceae* y el género *Caldicoprobacter*; C_50 únicamente la familia D2 (clase *Clostridia*) y en C_75 los géneros *Defluviitalea*, *Anaerobaculum* y S1 (familia *Thermotogaceae*). Cabe resaltar que éstas últimas taxa se encontraron en la composición del consorcio metanogénico.

En la Figura 25B solo aparecieron los grupos CN, C_00, C_25 y C_75. En CN de nueva cuenta el orden *MBA08*, las familias *Anaerobrancaceae* y *Porphyromonadaceae*, y los géneros *Syntrophomonas* y A55D21 (familia *Anaerobrancaceae*); C_00 la clase *Clostridia*

y el orden *OPB54* de la misma clase; C_25 únicamente el género *Sporosarcina* y en C_75 el orden *Clostridiales* y los géneros *Defluviitalea*, *Lysinibacillus*, *Solibacillus*, *Sporanaerobacter* y *Anaerobaculum*.

Por otro lado, en la Figura 25C el tratamiento C_25 no presentó taxas con abundancias significativamente diferentes. En CN destacaron el filum *Tenericutes*, el orden *MBA08*, las familias *Porphyromonadaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *ML1228J_1* (orden *Natranaerobiales*), y los géneros *Sedimentibacter* y *Sphaerochaeta*; C_00, la clase *Clostridia* y el género *Tepidimicrobium*; C_10 el género *Cellulosibacter*; C_50 las familias *Peptococcaceae* y *D2* (clase *Clostridia*) y C_75, los órdenes *Clostridiales* y *OPB54* y los géneros *Anaerobaculum* y *S1* (familia *Thermotogaceae*).

Finalmente, en la Figura 25D, correspondiente al día 32, se presentaron en CN el filum *Tenericutes*, y los géneros *Aminobacterium* y *vadinCA02* (*Synergistaceae*); C_00 la clase *Clostridia*, los géneros *Tepidimicrobium* y *Thermacetogenium*; C_10 el género *Cellulosibacter*; C_25 el género *Lutispora* y en C_75 la orden *OPB54*, la familia *D2* (clase *Clostridia*) y los géneros *Anaerobaculum* y *S1* (familia *Thermotogaceae*).

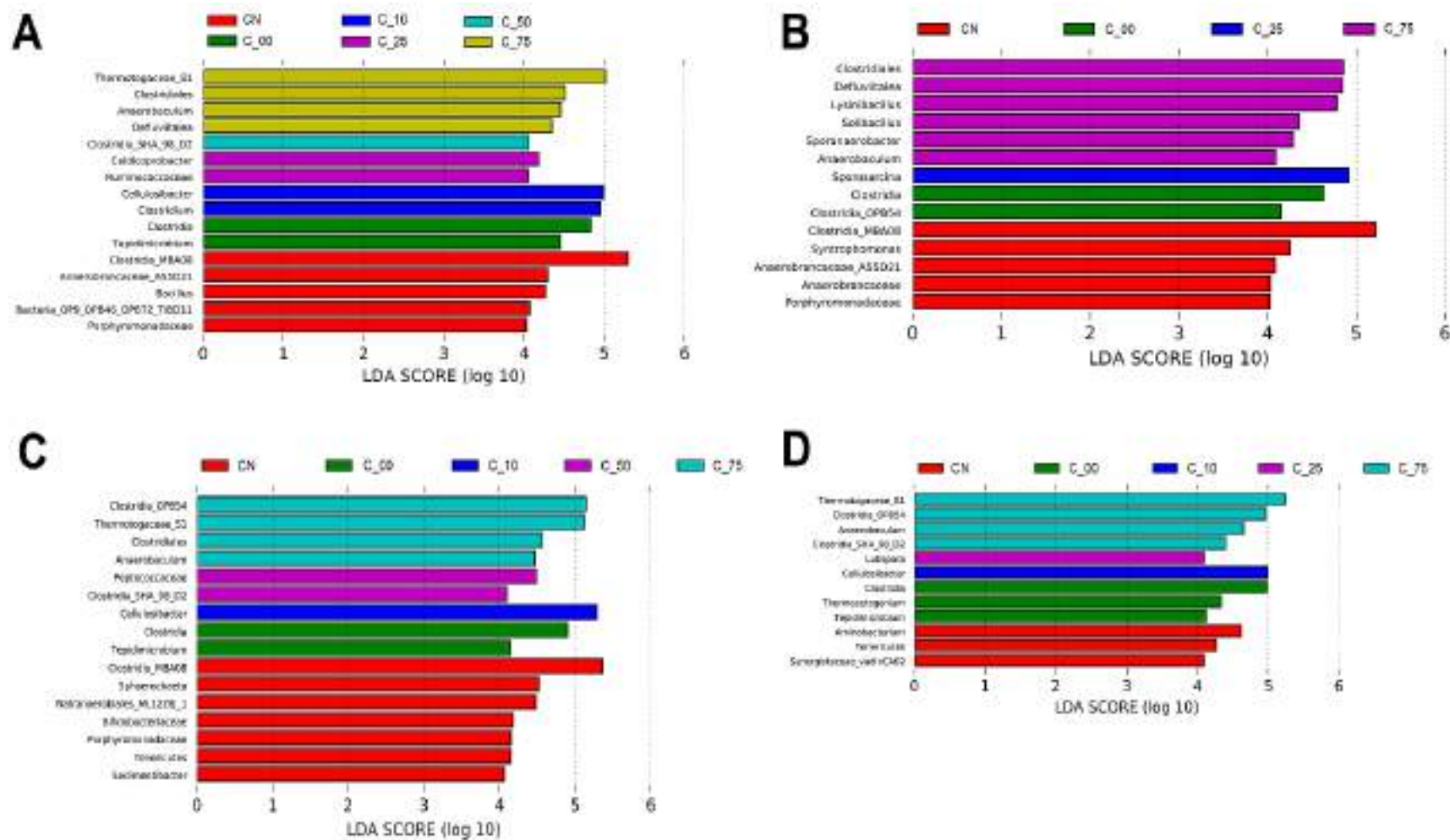


Figura 25. Bacteria. Análisis LEfSe. A) Todos los tratamientos considerando todos los tiempos. B) Todos los tratamientos al día 0. C) Todos los tratamientos al día 17. D) Todos los tratamientos al día 32

4.4.2.2 *Arquea*

En la Figura 26 se presentan las dos clases más abundantes de arqueas. La clase *Methanomicrobia* predominó mayoritariamente en todos los tratamientos (72.49% - 99.01%) mientras que, en el CN, esta clase disminuyó al día 17 (45.09%) incrementando un poco al día 32 (59.02%). La clase *Thermoplasmata* se presentó más abundante al día 0 en todos los tratamientos. C_00 tuvo una abundancia de 27.02% y al ir incrementando la concentración del consorcio, la presencia de esta clase disminuyó hasta 5.83%.

La Figura 27 muestra las taxa de arqueas más abundantes. En términos generales, los géneros *Methanoculleus* y *Methanosarcina* fueron los más abundantes. El CN tuvo al día 0, presencia del 37.95% de *Methanoculleus*, al día 17 de 5.90% y al día 32 de 16.18%. En C_00 este género tuvo una mayor presencia al día 0 (51.50%) y aumentó de manera considerable a los días 17 y 32, 93.85% y 92.67%, respectivamente. En el resto de los tratamientos, *Methanoculleus* estuvo menos abundante al día 0 en C_10 (24.11%) y en los demás entre 51.49% y 71.51%. En los días 17 y 32, su abundancia creció únicamente en C_10 y C_25 (hasta 76.12%), mientras que en C_50 y C_75, su abundancia descendió hasta valores de 25.94%.

En el caso de *Methanosarcina*, CN tuvo abundancia al día 0 de 24.02% y para el día 32 de 8.66%. Los tratamientos en donde se usó el consorcio, este metanógeno tuvo una mayor presencia en C_50 con el paso de los días, desde 19.54% al día 0 hasta 57.21% al día 32. En el resto de los tratamientos, la tendencia fue una presencia menor del 10% al día 0, un repunte al día 17 de hasta 52.98% en C_75, y una caída al día 32 hasta valores menores de 32%. C_00 fue el tratamiento que tuvo la menor abundancia en todos los tiempos de muestreo, menor del 4% en todos los casos.

El género *Methanomassiliicoccus* tuvo presencia apreciable únicamente en el CN y en C_00 entre 14.60% y 23.05%. En el resto de los tratamientos, este género estuvo en menos del 5% en todos los tiempos. El género *vadinCA11* perteneciente a la familia (*Methanomassiliicoccaceae*) solo estuvo presente de forma considerable en CN, con una abundancia de hasta 37.49% al día 17 y 31.10% al día 32.

Taxa como los órdenes *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, E2 (clase *Thermoplasmata*), las familias *Methanomicrobiaceae*, *Methanomassiliicoccaceae* y la especie *Methanoculleus bourgensis* se encontraron en abundancias relativamente pequeñas.

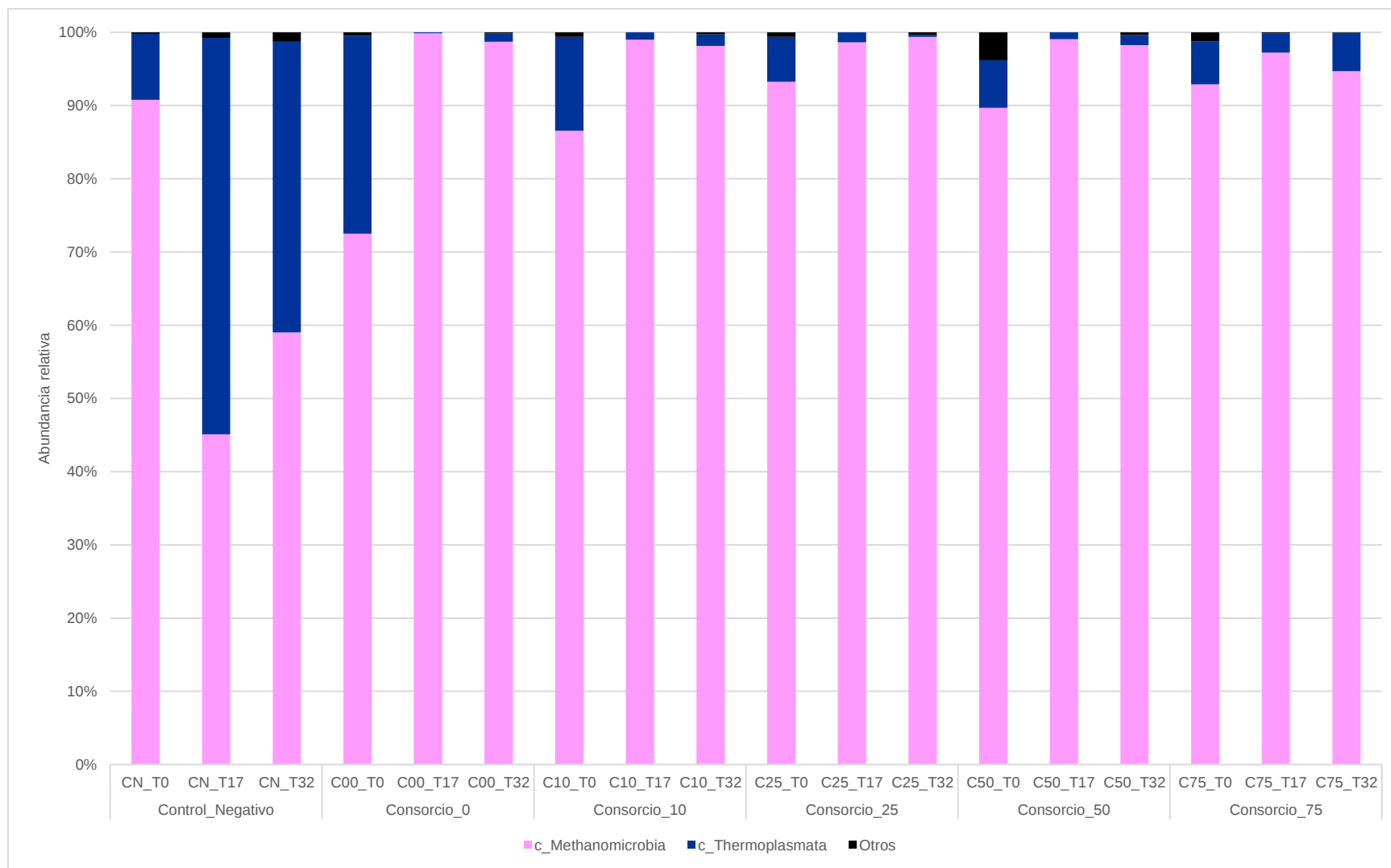


Figura 26. Abundancia relativa de las clases de arqueas dominantes de los tratamientos control y con cultivo activo durante 3 tiempos de muestreo.

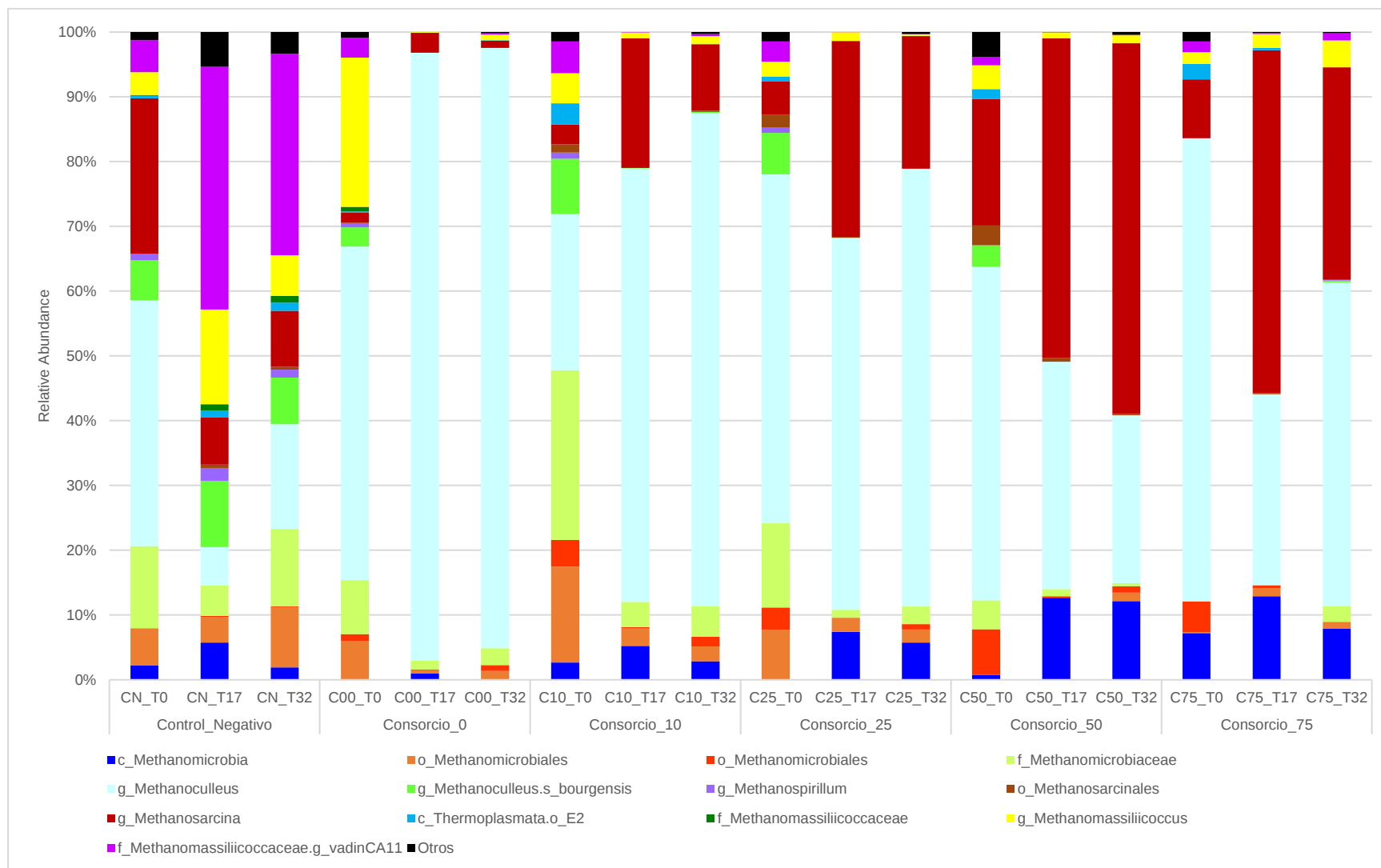


Figura 27. Abundancia relativa de las taxa de arqueas más abundantes desde clases hasta especies.

4.4.2.2.1 Diversidad

La Tabla 19 presenta los valores de los índices de alfa diversidad de cada tratamiento y en cada tiempo de muestreo, además se indica si existieron diferencias significativas en cada caso, por otro lado, en la Figura 28 se muestran los mismos valores, pero de forma gráfica.

Al igual que en Bacteria, los valores de Observados y Chao1 son iguales en todos los casos. En términos de riqueza, al día 0, C_00 presentó los mayores valores, sin embargo, con el paso del tiempo, CN tuvo los valores más altos. Los tratamientos C_00, C_10 y C_25 tuvieron una caída en valores de riqueza al día 17 y un repunte al día 32. C_50 tuvo una caída en los valores con el paso del tiempo, mientras que C_75 un ascenso conforme el tiempo avanzó.

En términos de diversidad, las tendencias fueron similares a las presentadas en riqueza, CN tuvo los valores más altos a partir del día 17. C_00, C_10 y C_50 tuvieron una tendencia a la baja mientras que C_25 y C_75 al alta con el paso de los días. Al hacer comparaciones entre grupos, se encontró que en los 4 índices las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$).

Tabla 19. Arquea. Índices de alfa diversidad de todos los grupos y en cada tiempo.

Grupo	Días	Observados	Chao1	Shannon	Simpson
CN	Día 0	33.33 ± 4.99	33.33 ± 4.99	2.82 ± 0.21	0.91 ± 0.02
	Día 17	54.50 ± 3.50	54.50 ± 3.50	3.77 ± 0.07	0.97 ± 0.002
	Día 32	55.67 ± 2.49	55.67 ± 2.49	3.66 ± 0.23	0.97 ± 0.01
	Valor de p	0.005 ^a	0.005 ^a	0.011 ^a	0.013 ^a
C_00	Día 0	40.33 ± 8.96	40.33 ± 8.96	3.06 ± 0.30	0.93 ± 0.02
	Día 17	17.50 ± 11.50	17.50 ± 11.50	2.16 ± 0.45	0.85 ± 0.05
	Día 32	25.33 ± 4.03	25.33 ± 4.03	2.13 ± 0.16	0.85 ± 0.01
	Valor de p	0.132 ^a	0.132 ^a	0.030 ^a	0.075 ^b
C_10	Día 0	35.00 ± 7.79	35.00 ± 7.79	3.04 ± 0.16	0.94 ± 0.01
	Día 17	25.33 ± 3.30	25.33 ± 3.30	2.69 ± 0.26	0.91 ± 0.03

	Día 32	31.33 ± 4.78	31.33 ± 4.78	2.65 ± 0.29	0.90 ± 0.03
	Valor de p	0.294 ^a	0.294 ^a	0.280 ^a	0.379 ^a
C_25	Día 0	21.67 ± 6.34	21.67 ± 6.34	2.56 ± 0.32	0.90 ± 0.04
	Día 17	18.00 ± 1.63	18.00 ± 1.63	2.56 ± 0.10	0.91 ± 0.01
	Día 32	27.00 ± 7.79	27.00 ± 7.79	2.51 ± 0.28	0.89 ± 0.03
	Valor de p	0.368 ^a	0.368 ^a	0.973 ^a	0.814 ^a
C_50	Día 0	18.50 ± 1.50	18.50 ± 1.50	2.61 ± 0.05	0.91 ± 0.01
	Día 17	19.00 ± 3.27	19.00 ± 3.27	2.47 ± 0.08	0.89 ± 0.02
	Día 32	16.67 ± 0.47	16.67 ± 0.47	2.40 ± 0.12	0.88 ± 0.02
	Valor de p	0.600 ^b	0.600 ^b	0.224 ^a	0.390 ^a
C_75	Día 0	15.50 ± 1.50	15.50 ± 1.50	2.34 ± 0.32	0.88 ± 0.04
	Día 17	21.33 ± 2.62	21.33 ± 2.62	2.40 ± 0.36	0.88 ± 0.05
	Día 32	26.67 ± 7.32	26.67 ± 7.32	2.71 ± 0.11	0.92 ± 0.004
	Valor de p	0.226 ^a	0.226 ^a	0.470 ^a	0.572 ^a
Valor de p (grupos)*		<0.001 ^a	<0.001 ^a	0.004 ^b	0.030 ^b

CN: Control Negativo; C_00: Consorcio 0% (sin bioaumentar); C_10: 10% consorcio activo; C_25: 25% consorcio activo; C_50: 50% consorcio activo; C_75: 75% consorcio activo. a) ANOVA-Unifactorial, b) Kruskal-Wallis. * Análisis estadísticos, considerando todos los grupos.

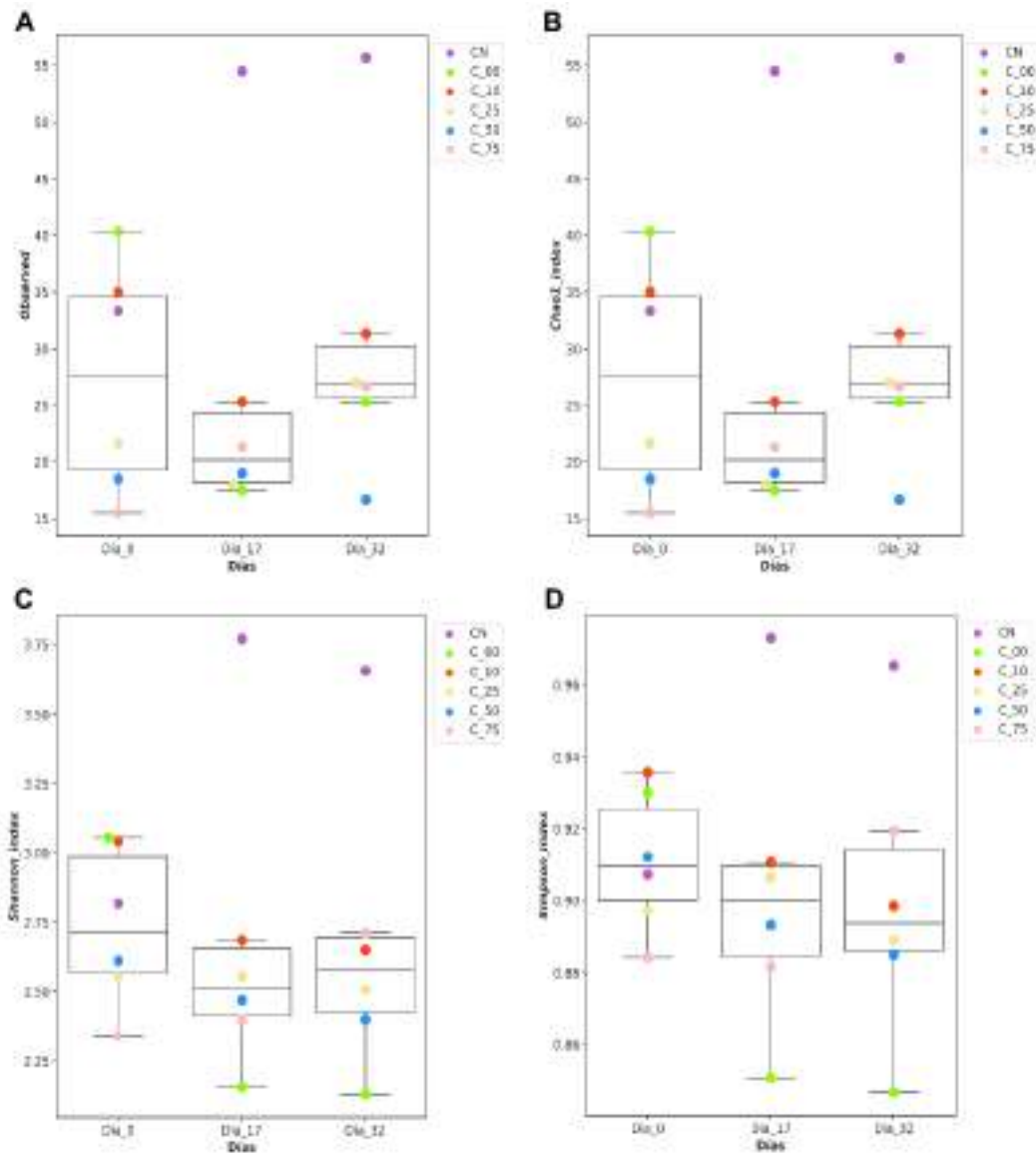


Figura 28. Arquea. Índices de Alfa diversidad de todos los tratamientos, considerando todos los tiempos.

La Figura 29 muestra el análisis de coordenadas principales de las comunidades de arqueas. Se puede notar que hay dos grupos claramente separados, sin embargo, no hay una tendencia clara dentro de las agrupaciones. De un lado hay muestras del día 0 y 17, y del otro del día 17 y 32.

De acuerdo con los análisis de PERMANOVA, las comunidades del CN fueron estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos. En términos de días, las comunidades del día 0 fueron estadísticamente diferentes a las comunidades tanto del día

17 como del día 32, pero entre estos dos últimos tiempos no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$).

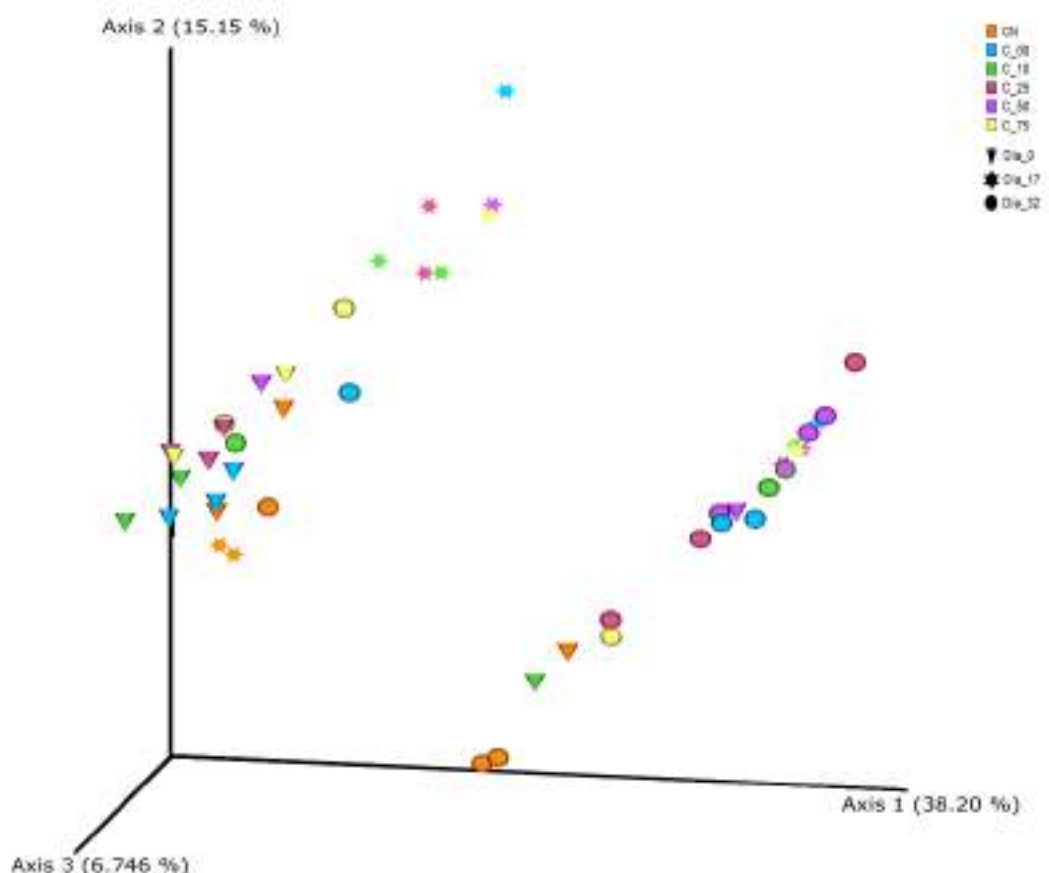


Figura 29. Arquea. Análisis de coordenadas principales de todos los tratamientos y todos los días.

En la Figura 30 se presentan las gráficas del análisis LEfSe, A) considerando todos los tratamientos al día 0, B) al día 17 y C) al día 32.

En la Figura 30A se muestra cómo en el CN la clase Methanomicrobia, el orden pGrfC26, (phylum Crenarchaeota) y los géneros *Methanospirillum*, *Methanoculleus bourgensis* y *vadinCA11* tuvieron abundancias significativamente diferentes en el día 0, en comparación con el resto de los grupos. En C_00 predominó solo el género *Methanoculleus*; en C_10 el orden Methanomicrobiales y la familia Methanomicrobiaceae; en C_50 el género *Methanosarcina* y en C_75 la clase Methanomicrobia. Al día 17, solo los tratamientos C_00 y C_75 tuvieron taxa significativamente diferentes, en C_00 el género *Methanoculleus* y en C_75 el género *Methanosarcina* (Figura 30B). Finalmente, al día 32 se encontró que los

géneros *Methanomassiliicoccus* y *vadinCA11* predominaron en CN, el género *Methanoculleus* en C_00 y la clase Methanomicrobia y el género *Methanosarcina* en C_50 (Figura 30C).

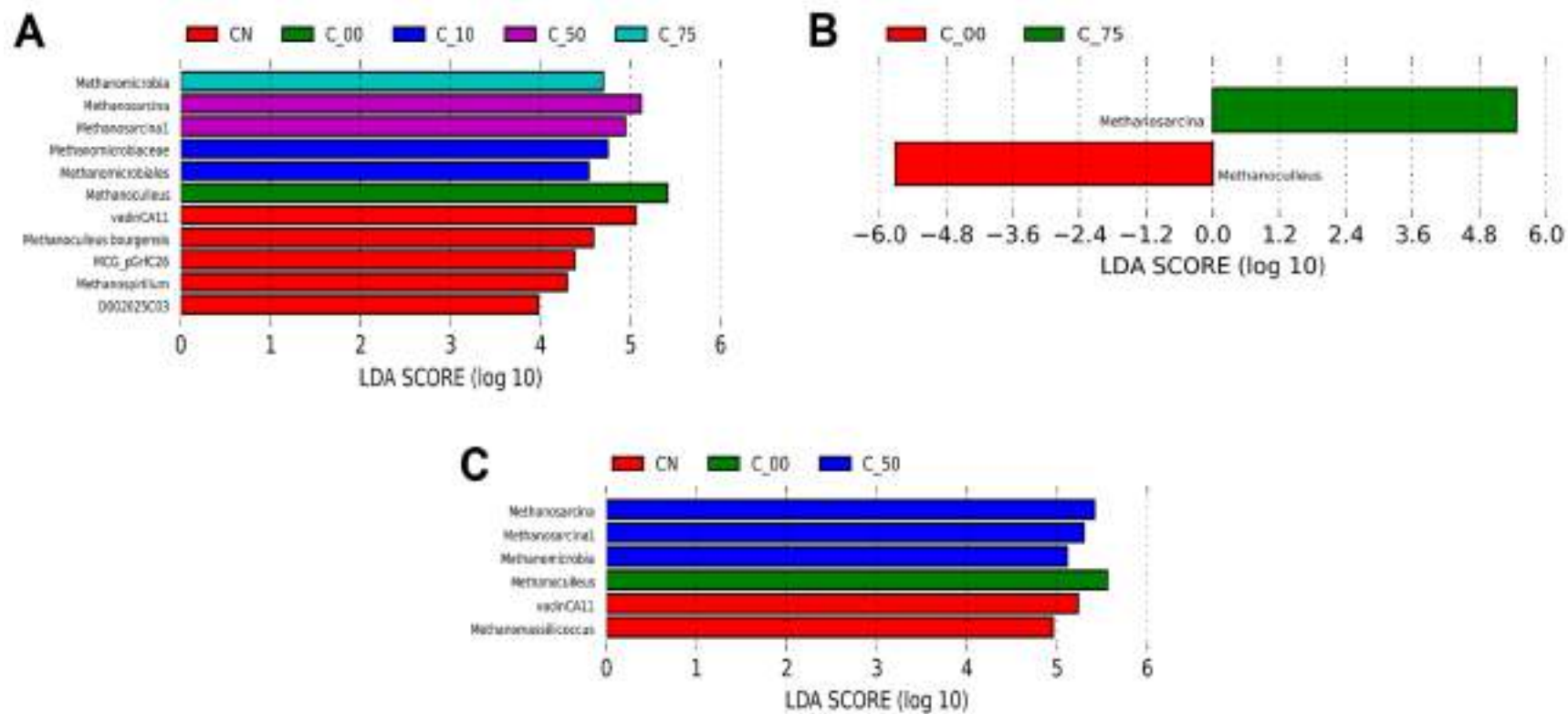


Figura 30. Arquea. Análisis LEfSe. A) Todos los tratamientos al día 0. B) Todos los tratamientos al día 17. C) Todos los tratamientos al día 32.

5 Discusión

En el presente trabajo se determinó el efecto de la adición de un consorcio metanogénico hidrogenotrófico en la generación de metano en un proceso de digestión anaerobia termófila de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

Los residuos orgánicos que provienen de la PCBP pueden considerarse como un buen sustrato para su tratamiento mediante DA pues su contenido de materia orgánica es de aproximadamente 90% (relación SV/ST), este valor se encuentra acorde con los valores descritos en la revisión bibliográfica de Bong et al., 2018. En esta misma revisión, se menciona que los residuos tanto de cocina (restaurantes, hoteles, comedores, cocinas domésticas y comerciales) como de vegetales y frutas los rendimientos de metano oscilan entre $0.267 - 0.859 \text{ m}^3 / \text{kg SV}_{\text{añadidos}}$, al ser tratados en procesos de DA como sustrato único.

Dado que este tipo de residuos tienen un bajo pH (~ 4.5), el tratamiento de DA es susceptible de presentar fallas y/o desequilibrios debido a la acumulación de ácidos grasos y por lo tanto presentar inhibición del proceso de metanogénesis.

La bioaumentación emplea, como técnica de mejora en el rendimiento de metano, diversos microorganismos, ya sea en forma de cultivos puros o consorcios, así como diferentes tipos: hidrolíticos, acetogénicos, metanógenos u hongos.

Los resultados de esta investigación arrojaron que a escala laboratorio, la bioaumentación realizada con metanógenos hidrogenotróficos no aumentó el rendimiento acumulado de metano en comparación con aquél que no fue bioaumentado, sin embargo, un resultado a enfatizar es que el consorcio promovió la aceleración de la metanogénesis en comparación con el control.

En el primer experimento, el tratamiento 50% v/v presentó el pico de generación de metano más intenso y anticipado (día 8) en comparación al tratamiento control (día 13 y 18), por lo que se intuye que la adición del consorcio contribuyó a acortar la fase de adaptación de los microorganismos durante la degradación anaeróbica, lo cual puede ser notable para reducir el tiempo de retención de los reactores de biogás (Akyol et al., 2019).

Sin embargo, posteriormente a este pico hubo una caída abrupta del rendimiento, lo que pudo deberse a dos eventos: debido a que el sustrato es fácilmente biodegradable y con abundante contenido de materia orgánica (90.70%), la degradación pudo darse de forma muy rápida, pues es de recalcar que en los tratamientos en donde se adicionó el consorcio existió una mejor reducción de SV (67.95 – 75.80%) que en el control (63.12%). La otra posible explicación fue que la mejora de los rendimientos no se mantuvieron durante mucho tiempo debido a la reducida persistencia del consorcio en el sistema, este efecto se conoce como “wash-out” (Tian et al., 2019; Yang et al., 2016).

El propósito de usar el consorcio estéril como otra condición de bioaumentación, fue saber si los nutrientes del medio de cultivo así como la biomasa pueden beneficiar el crecimiento microbiológico (Y. Li, Yang, et al., 2018), no obstante, en los resultados obtenidos se encontró que en todos los tratamientos en donde se usó el consorcio estéril, excepto CE_10, hubo una consecuencia negativa, resultando en una disminución en la producción de metano con respecto al control. Estos resultados demuestran que únicamente el consorcio activo fue el responsable del aumento en el rendimiento de metano (Čater et al., 2015). Dado que a estos tratamientos no se les realizaron estudios de composición microbiana, es difícil asumir si hubo presencia de ciertos microorganismos que pudieran no cohabitar y por lo tanto inhibir el proceso de metanogénesis.

Otro de los resultados más notables del proyecto, fue que, en el primer experimento a escala pequeña, en los tratamientos con consorcio se observó una considerable mejora en la calidad del biogás (composición de metano en este) que en aquél que no fue bioaumentado, pues el control tuvo una composición de 68.53%, mientras que en los tratamientos se alcanzó un máximo de 79%, este valor se encuentra dentro de rango cuando el biogás pasa por un proceso de remoción de CO₂ o es “limpiado” (Angelidaki et al., 2018). Aunque este comportamiento no se replicó del todo en los experimentos posteriores, lo que persistió fue la aceleración de la metanogénesis debido a la adición del consorcio. Este resultado abre la discusión de qué puede ser más relevante, si se desea un mayor volumen de metano a largo plazo, o una menor cantidad de forma acelerada y posiblemente de mejor calidad.

En esta investigación, se trabajó por primera vez con un reactor de mayor volumen (2L) que brindara la posibilidad de hacer adiciones durante el proceso de digestión sin detenerlo, realizar mediciones inmediatas de parámetros importantes (pH, temperatura y presión), así como cuantificación continua del biogás, pues el principal objetivo de este experimento fue

querer simular el tratamiento de la FORSU como ocurre a condiciones reales (digestión anaerobia semiseca o seca).

En este experimento se encontró que hubo diversos factores que influenciaron la generación de metano entre el tratamiento control y aquél con el consorcio metanogénico. En primer lugar, hubo una diferencia en el pH de ambos reactores. El control tuvo una caída drástica en los niveles de pH (5.2) lo que pudo inhibir o incluso detener la generación de metano, además de tener una lenta recuperación después de la adición de buffer. Dado que el reactor control se corrió primero que el bioaumentado, se tuvo conocimiento previo de la posible caída del pH, por lo que, al correr el tratamiento del consorcio, el buffer se añadió con días de anticipación, lo que propició evitar la caída abrupta de pH y una relativa generación constante de metano. Por otra parte, se encontró que hubo una tendencia similar a lo arrojado en el experimento a pequeña escala, pues la adición del consorcio metanogénico adelantó el pico de generación de metano a 14 días, cuando en el control fue al día 21. En el trabajo realizado por Agustini et al., 2018 en donde se aumentó el volumen del proceso de digestión, pasando de un reactor de 300 ml a uno de 2.5 L, se explica que aunque no existieron diferencias significativas en la generación de metano obtenido entre ambos reactores, aparentemente una mayor concentración de sólidos favoreció la velocidad del proceso de DA. Cabe aclarar que en ese trabajo no se empleó ninguna estrategia de bioaumentación.

Sin duda alguna, para que el proceso de DA sea efectivo, es necesario un adecuado balance entre los microorganismos. Los resultados señalaron que, en términos de Bacteria, los filum *Firmicutes*, *Synergistetes* y *Thermotogae* predominaron a lo largo del proceso. Sin embargo, éstos últimos dos filum empezaron a aumentar conforme se adicionó más consorcio metanogénico, así como con el paso de los días. *Synergistetes* en el día 17 estuvo presente entre 2.41-8.68% y al día 32 entre 3.42-8.68%, y *Thermotogae* al día 17 estuvo de entre 8.41-25.08% y al día 32 entre 10.33-33.86% en abundancia relativa. El filum *Firmicutes* el cual predominó de manera considerable, se caracteriza por contener microorganismos que poseen capacidades en descomposición de sustratos orgánicos y fermentación en sistemas donde los sustratos contienen biomasa lignocelulósica (Lin et al., 2018; Wu et al., 2016).

El filum *Synergistetes* puede producir una gama de ácidos orgánicos que son sustratos potenciales para otras bacterias, o producir sustratos como el ácido acético y el hidrógeno que los metanógenos utilizan directamente (Ferguson et al., 2018), mientras que el filum

Thermotogae degrada acetato sintróficamente con los metanógenos hidrogenotróficos y se ha encontrado en digestores termófilos que tratan residuos sólidos orgánicos, residuos de comida, aguas residuales (Ghanimeh et al., 2018; Xu et al., 2018).

Las taxa que coincidieron tanto en el consorcio metanogénico como en los tratamientos fueron: la clase *Clostridia*, los órdenes *Clostridiales* y *MBA08*, la familia *D2* (clase *Clostridia*) y los géneros *Clostridium*, *Clostridium thermopalmarium*, *Anaerobaculum* y *S1* (familia *Thermotogaceae*). No obstante, únicamente los géneros *Clostridium*, *Anaerobaculum* y *S1* tuvieron una tendencia al alza en abundancia conforme al paso del tiempo y a las proporciones.

El género *Clostridium* posee actividades celulolíticas extremadamente altas, además de que actúan como bacterias oxidantes de acetato (acetato a H_2 y CO_2) (Ecem Öner et al., 2018; Ziyi Yang et al., 2019), y debido a estas características, éste género ha sido ampliamente utilizado como técnica de bioaumentación en residuos lignocelulósicos (Peng et al., 2014; Strang et al., 2017; Tsapekos et al., 2017).

El género *Anaerobaculum* puede degradar compuestos orgánicos complejos a acetato, H_2 y CO_2 (Tyagi et al., 2018; Zamanzadeh et al., 2016), mientras que el género *S1*, aunque no ha sido ampliamente estudiado se presume es una bacteria oxidante de acetato (D. Li et al., 2018; Y.-F. Li et al., 2015).

Conociendo las características de las taxas mencionadas, se puede aseverar que los microorganismos contenidos en el consorcio jugaron un papel importante para mejorar el rendimiento del metano.

Una de las taxa dominantes a lo largo del proceso fue el candidato a orden *MBA08* de la clase *Clostridia*, se ha reportado destaca en digestores termofílicos con alto contenido de amoníaco además de sobresalir en comunidades celulolíticas, sugiriendo participa en la etapa hidrolítica (Tian, Yan, et al., 2019; Zamanzadeh et al., 2016). Sin embargo, esta taxa predominó de forma importante en CN (32.88-45.46%) el cual no contenía materia orgánica adicional, por lo que se podría interpretar que en el lixiviado aún persiste algún contenido orgánico parcialmente degradado. En el resto de los tratamientos su abundancia fue incrementando conforme al paso de los días, lo que parece ser congruente con lo establecido en la literatura.

El género *Cellulosibacter alkalithermophilus* el cual predominó en C_00, C_10 y C_25, produce múltiples enzimas celulolíticas-xilanolíticas, ya que puede utilizar muchos tipos de sustrato como fuentes de carbono y energía en condiciones alcalinas y de alta temperatura (Baramée et al., 2015). La digestión del xilano (un grupo de hemicelulosas) y celulosa necesita de estas enzimas para eliminar el componente externo del xilano para posteriormente degradar el componente interno de la celulosa (Baramée et al., 2015). Este género no estaba originalmente presente en el consorcio metanogénico añadido, por lo que se presume formaba parte de los microorganismos endógenos en el digestor, sin embargo, al aumentar la concentración del consorcio en un 50% o 75%, *Cellulosibacter alkalithermophilus* prácticamente desapareció, por lo que pudo haber una cohabitación fallida o competencia.

El metanógeno *Methanoculleus* el cual estuvo presente de forma significativa en todos los tratamientos y dentro del consorcio, es el metanógeno hidrogenotrófico más característico en procesos de DA termofílicos (Tian et al., 2019). La presencia de esta especie en el proceso indica que la vía de generación de metano predominante fue mediante la unión de H_2 y CO_2 y se ha usado ampliamente como técnica de bioaumentación para aliviar reactores con alta concentración de amoníaco (Fotidis et al., 2017, 2014; Tian, Yan, et al., 2019). Por otro lado, Koo et al., 2017 encontraron que *Methanoculleus* fue el biomarcador más prometedor en cuanto a un buen desempeño, en digestores de gran escala tratando lodos residuales.

Por otra parte, el género *Methanosarcina* puede clasificarse como acetoclástico o hidrogenotrófico, y posee características de rápido crecimiento (tiempo de duplicación de 1-1.2 días) y resistente a inhibidores (De Vrieze et al., 2012; Lins et al., 2014). Puede intuirse entonces, que estas propiedades contribuyeron de manera favorable a la intensa generación de metano que se presentó en el tratamiento C_50. Capson-Tojo et al., 2018 encontraron que *Methanosarcina* fue de las especies más abundantes que contribuyeron a la generación de metano en un proceso de DA seca, incluso cuando éste metanógeno no estuvo de forma abundante en el inóculo inicial. Los autores explican que los altos niveles de TAN (total ammonia nitrogen) característico del proceso seco pudieron beneficiar el desarrollo de *Methanosarcina* y por lo tanto contribuir a la generación de metano. En el caso del presente estudio, aunque no se determinó presencia de amoníaco durante el proceso, éste podría detectarse indirectamente mediante valores de pH ligeramente alcalinos, lo cual

fue encontrado en el inóculo y en los tratamientos, pudiendo contribuir también al crecimiento de *Methanosarcina*.

En términos de alfa diversidad se encontró que, el CN tuvo los valores más altos de riqueza diversidad, pero con respecto a los demás tratamientos, éstos valores fueron descendiendo conforme la proporción de consorcio añadido fue en aumento. En el caso de C_75 se pudo notar claramente una repercusión directa entre el bajo rendimiento de metano y los bajos índices de alfa diversidad, pues, aunque los microorganismos que conformaron el consorcio poseían propiedades benéficas, el medio no contaba con la suficiente diversidad microbiana para que el proceso de DA fuera eficiente. Caso similar fue encontrado en el trabajo hecho por Akyol et al., 2019.

Como se ha descrito a lo largo de esta tesis, la DA es un proceso microbiológico complejo y para que funcione de la mejor forma posible, debe de existir una comunidad microbiana estable y diversa. Una de las posibles explicaciones para entender el por qué no hubo un incremento en el rendimiento de metano como se esperaba pudo deberse a la baja diversidad microbiana que hubo en los tratamientos, lo que se ve reflejado en los valores de Alpha diversidad o a que la degradación del sustrato fue muy rápida (reducción de SV). Aunque en el reactor de 2L se observó que el rendimiento de metano fue mejor en el tratamiento que en el control, aún no es posible asegurar si fue debido a la adición del consorcio o a la adición del buffer con anticipación. Desafortunadamente en este experimento no se pudieron analizar las comunidades microbianas, por lo que se complica explicar con más detalle por qué en los rendimientos de metano.

Definitivamente, diferentes consorcios y estrategias deben estudiarse para mejorar el proceso de DA de los residuos orgánicos de la Ciudad de México, empleando como inóculo inicial el lixiviado de la Planta de Composta de Bordo Poniente.

Derivado de esta investigación, se concluye que la hipótesis propuesta en el protocolo se rechaza.

6 Conclusiones y recomendaciones

El consorcio metanogénico que fue preparado a partir de un inóculo conocido, tuvo al menos, un efecto positivo durante el proceso de digestión anaerobia termófila de residuos

orgánicos. Se encontró que la adición del consorcio en un 50% v/v a escala pequeña tuvo una generación de biogás acelerada y en mayor cantidad en comparación con el control, además de mejorar la calidad de éste. A mayor volumen, se encontró una tendencia similar, incluso cuando se adicionó una menor proporción de consorcio (10%), sin embargo, es indispensable se corran más réplicas en este tipo de experimento, para aclarar el comportamiento de la generación de metano.

Las comunidades microbianas involucradas también cambiaron con la adición del consorcio. En Bacteria predominaron géneros que hacen relación sintrófica con metanógenos hidrogenotróficos y en Arqueas prevalecieron los metanógenos *Methanoculleus* y *Methanosarcina*, los cuales son vitales en el proceso de DA.

Finalmente, se considera existieron varias aportaciones de esta tesis, como fueron:

- La preparación y mantenimiento de un consorcio de metanógenos, pues se encontraron las condiciones idóneas para preservar los microorganismos vivos y con la actividad esperada.
- Utilización de un efluente y no un lodo anaerobio para el arranque y proceso de DA.
- Uso de muestras reales de los desechos orgánicos originados en la CDMX.
- Construcción de reactor de mayor volumen, capaz de hacer mediciones inmediatas.

Trabajos futuros podrían enfocarse en:

1. La adición de diferentes consorcios (celulolíticos, hidrolíticos, etc.), en diversos tiempos del proceso de digestión anaerobia, los cuales podrían mejorar aún más el rendimiento de metano.
2. Seguir trabajando con reactores de mayor volumen y correr más réplicas para tener mayor representatividad.
3. Trabajar con diferentes sustratos orgánicos (co-digestión) y demostrar cómo reacciona el consorcio metanogénico.
4. Probar la efectividad del consorcio después de un proceso de preservación.

7 Anexos

7.1 Cálculos para determinar la prueba bioquímica de metanización

Los cálculos para la obtención de los rendimientos tanto de biogás como de metano se realizaron con base en los trabajos de Angelidaki et al., 2009; Holliger et al., 2016.

A continuación, se presentan los pasos que se siguieron:

NOTA: Para correr esta prueba, se usa la relación de sólidos volátiles 1:1 inóculo/sustrato.

1. Determinar el contenido de sólidos volátiles tanto del sustrato como del inóculo (sección 3.5.1).
2. Calcular la cantidad en g y/o ml tanto de sustrato como de inóculo los cuales deben cumplir la relación 1:1 en volumen final de 60 ml.

$$a. \%ST_{sustrato} \times \%SV_{sustrato} \times 1000 = \frac{g}{kg} SV_{sustrato} \text{ peso húmedo}$$

$$b. \%ST_{inóculo} \times \%SV_{inóculo} \times 1000 = \frac{g}{kg} SV_{inóculo} \text{ peso húmedo}$$

$$c. \text{Proporción sustrato/inóculo} = \frac{g/kg SV_{sustrato}}{g/kg SV_{inóculo}}$$

$$d. \text{Relación 1:1} = 1 + \text{Proporción sustrato/inóculo}$$

$$e. \text{Fracción}_{sustrato} = 1 / \text{Relación 1:1}$$

$$f. \text{Fracción}_{inóculo} = \frac{\text{Proporción sustrato/inóculo}}{\text{Relación 1:1}}$$

$$g. g_{sustrato} = 60 \times \text{Fracción}_{sustrato}$$

$$h. g_{inóculo} = 60 \times \text{Fracción}_{inóculo}$$

Ejemplo:

- a. Sustrato = 23.03%ST x 76.97%SV x 1000 = 209.59 g/kg
- b. Inóculo = 2.86%ST x 37.22%SV x 1000 = 10.65 g/kg

- c. $\text{Proporción} = 209.59 \text{ g/kg} / 10.65 \text{ g/kg} = 19.68$
 - d. $\text{Relación } 1:1 = 1 + 19.68 = 20.68$
 - e. $\text{Fracción sustrato} = 1/20.68 = 0.05$
 - f. $\text{Fracción inóculo} = 19.68/20.68 = 0.95$
 - g. $\text{Gramos sustrato} = 60 * 0.05 = 3 \text{ g}$
 - h. $\text{Gramos inóculo} = 60 * 0.95 = 57 \text{ g}$
-
- 3. Correr la PBM como se describe en la sección 3.4.1.1.
 - 4. Graficar la generación de biogás y/o metano por día restando la producción del control negativo (inóculo solo).
 - 5. Graficar la generación acumulada de biogás y/o metano, sumando las respectivas cantidades por día.
 - 6. Dividir la generación acumulada de biogás y/o metano entre los gramos de SV del sustrato, añadidos al inicio del experimento.
 - a. Ejemplo = $3 \text{ g sustrato} \times 23.03\% \text{ST} \times 76.97\% \text{SV} = 0.53 \text{ g SV sustrato}$

7.2 Productos de investigación



Article

Microbial Profile of the Leachate from Mexico City's Bordo Poniente Composting Plant: An Inoculum to Digest Organic Waste

Aixa Kari Gállego Bravo ^{1,2}, Daniel Alejandro Salcedo Serrano ^{1,3}, Gloria López Jiménez ⁴, Khemlal Nirmalkar ⁵, Selvasankar Murugesan ^{5,6}, Jaime García-Mena ⁵, María Eugenia Gutiérrez Castillo ¹ and Luis Raúl Tovar Gálvez ^{1,*}

¹ Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Calle 30 de Junio de 1520 s/n, 07340 Ciudad de México, México; agallegob1500@alumno.ipn.mx or kariigallego@gmail.com (A.K.G.B.); dasalcedo@live.com.mx (D.A.S.S.); mgutierrez@ipn.mx (M.E.G.C.)

² Instituto Politécnico Nacional, Centro Mexicano para la Producción más Limpia, Av. Acueducto s/n, 07340 Ciudad de México, México

³ Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Fertífero Raúl López Sánchez s/n, 27054 Tlaxiaco Coahuila, México

⁴ Departamento de Ciencias Básicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biociencia, Av. Acueducto s/n, 07340 Ciudad de México, México; gloria.lopez@yahoo.com

⁵ Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360 Ciudad de México, México; nirmalkar@investav.mx (K.N.); selvasankarbio@gmail.com (S.M.); jgmena@investav.mx (J.G.-M.)

⁶ Division of Translational Medicine, Research Department, Sidra Medicine, Doha 26999, Qatar

* Correspondence: lruvarg@ipn.mx; Tel.: +52-5729-6000 (ext. 52716)

Received: 7 May 2019; Accepted: 11 June 2019; Published: 19 June 2019



Abstract: In recent years, municipal solid waste (MSW) management has become a complex problem worldwide. Similarly, Mexico City is facing such a situation for the management and treatment of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). Therefore, in this work, we investigated whether leachate from the composting plant, Bordo Poniente, located in Mexico City can be used as an inoculum for the treatment of OFMSW using thermophilic anaerobic digestion (AD) with a hydraulic retention time of 30 days. We analyzed the physicochemical properties of the leachate and performed a biochemical methane potential test. Archaeal and bacterial diversity was also identified using high throughput DNA sequencing of 16S rDNA libraries. Methane yield was 0.29 m³ CH₄/kg VS_{added} in the positive control and 0.16 m³ CH₄/kg VS_{added} in the treatment group. The phylum, Bacteroidetes, and genus, *Methanosaeta*, prevailed in the leachate. However, in thermophilic conditions, the microbial communities changed, and the phylum, Firmicutes, genera, *Methanococcus*, and candidate genus, *radiocell*, were dominant in the treatment group. We concluded that the leachate contains a suitable initial change of many active bacteria and methanogenic archaea which contribute to the AD process, hence it can be used as an inoculum for the treatment of OFMSW.

Keywords: high throughput DNA sequencing; leachate; methanogens; microbial diversity; organic fraction of municipal solid waste; thermophilic anaerobic digestion

1. Introduction

The production of solid waste is growing around the world due to economic expansion, urbanization, and a constant rise in population, leading to an increased risk for humans and the environment [1]. According to the Global Review of Solid Waste Management 2012, municipal solid

Otorga la presente **CONSTANCIA** a:

**Aixa Kari Gállego Bravo, Gloria López Jiménez, María Eugenia Gutiérrez Castillo,
Jaime García Mena y Luis Raúl Tovar Gálvez**

Por su participación con la ponencia: "Efecto de la bioaumentación en el rendimiento de metano en un proceso de digestión anaerobia". Llevada a cabo en 10° Encuentro Nacional de Expertos en Residuos Sólidos "Gestión Integral de Residuos", llevado a cabo del 7 al 9 de octubre de 2020 en modalidad virtual.

Toluca, Estado de México, a 9 de octubre de 2020.



Dra. Sara Djeda Benitez
Presidenta de SOMERS



Dr. Gerardo Bernache Pérez
Comité Científico

Improvement of methane yield using bioaugmentation technique in a thermophilic anaerobic digestion process

Aixa Kari Gállego-Bravo¹, Jaime Garcia-Mena², Alberto Piña-Escobedo², Gloria López-Jiménez³, Maria Eugenia Gutiérrez-Castillo⁴ and Luis Raúl Tovar-Gálvez^{4,*}

¹ Instituto Politécnico Nacional, Centro Mexicano para la Producción más Limpia, Av. Acueducto s/n, 07340 Ciudad de México, México; kari.gallego@gmail.com

² Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav Unidad Zacatenco, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, CDMX Código Postal 07360, Ciudad de México; jgarcia@cinvestav.mx (J.G.-M.); apiña@cinvestav.mx (A.P.-E.)

³ Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biociencias, Departamento de Ciencias Básicas, Av. Acueducto s/n, 07340, Ciudad de México, México; glorialopez@yahoo.com

⁴ Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Calle 30 de junio de 1520 s/n, 07340 Ciudad de México, México; mgutierrez@ipn.mx

* Correspondence: ltovar@ipn.mx; Tel.: +52-5729-6000 (ext. 52716)

† Presented at the 1st International Electronic Conference on Microbiology, 02–30 November 2020; Available online: <https://icem2020.sciforum.net/>

Published: 02 November 2020

Abstract: A methanogenic consortium was used to improve the methane yield of a thermophilic anaerobic digestion process of organic fraction of municipal solid waste. The consortium was added to the system in different volume/volume proportions. The results showed that two treatments increased the methane yields by 5% in comparison to the control. About the bacterial communities, it was identified that the consortium was mainly constituted by members of the phylum Synergistetes. In all the treatments the phyla Firmicutes, Thermotogae, and Synergistetes were dominant and as the proportion of the consortium in the treatments increased, the presence of the family Thermotogaceae also did.

Keywords: bioaugmentation; hydrogenotrophic methanogens; organic fraction of municipal solid waste; thermophilic anaerobic digestion

1. Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a sustainable process for organic waste treatment, as it converts organic matter into energy (in the form of biogas) and digestate. AD is used to degrade various types of organic waste, including lignocellulosic biomass, food waste, agro-industrial waste, animal manure and sludge from wastewater treatment plants [1, 2]. However, AD frequently suffers from process instability due to high levels of toxic inorganic substances, variations in operating parameters, as well as imbalance between microbial groups [3]. Bioaugmentation can serve as a mechanism to regain the efficiency of systems due to greater microbial diversity and abundance. This technique is defined as the addition of specific microbial cultures to perform a definite task in a given environment [4, 5]. In this work, hydrogenotrophic methanogens were used to improve the methane yield of a thermophilic AD process of the organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) in Mexico City.

2. Materials and Methods

Referencias bibliográficas

- Ács, N., Bagi, Z., Rákhely, G., Minárovics, J., Nagy, K., & Kovács, K. L. (2015). Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. *Bioresource Technology*, 186, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.098>
- Agustini, C., da Costa, M., & Gutterres, M. (2018). Biogas production from tannery solid wastes – Scale-up and cost saving analysis. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 187, pp. 158–164). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.185>
- Akunna, J. C. (2015). Anaerobic treatment of brewery wastes. In *Brewing Microbiology* (pp. 407–424). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00019-8>
- Akyol, Ç., Ince, O., Bozan, M., Ozbayram, E. G., & Ince, B. (2019). Fungal bioaugmentation of anaerobic digesters fed with lignocellulosic biomass: What to expect from anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. *Bioresource Technology*, 277(January), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.024>
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5), 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Angelidaki, Irini, Treu, L., Tsapekos, P., Luo, G., Campanaro, S., Wenzel, H., & Kougias, P. G. (2018). Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. *Biotechnology Advances*, 36(2), 452–466. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.011>
- Ariunbaatar, J., Ozcan, O., Bair, R., Esposito, G., Ball, R., Lens, P. N. L., & Yeh, D. H. (2017). Bioaugmentation of the anaerobic digestion of food waste by dungs of herbivore, carnivore, and omnivore zoo animals. *Environmental Technology*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1305002>
- Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., & Lens, P. N. L. (2014). Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy*, 123, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.035>
- Aydin, S. (2016). Enhancement of microbial diversity and methane yield by bacterial bioaugmentation through the anaerobic digestion of *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5631–5637. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7501-0>
- Baramée, S., Phitsuwan, P., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kosugi, A., & Ratanakhanokchai, K. (2015). Alkaline xylanolytic-cellulolytic multienzyme complex from the novel anaerobic alkalithermophilic bacterium *Cellulosibacter alkalithermophilus* and its hydrolysis of insoluble polysaccharides under neutral and alkaline conditions. *Process Biochemistry*, 50(4), 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.019>

- Bhattad, U., Venkiteshwaran, K., Maki, J. S., & Zitomer, D. H. (2017). Biochemical methane potential assays and anaerobic digester bioaugmentation using freeze dried biomass. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 3(6), 1152–1161. <https://doi.org/10.1039/C7EW00203C>
- Bong, C. P. C., Lim, L. Y., Lee, C. T., Klemeš, J. J., Ho, C. S., & Ho, W. S. (2018). The characterisation and treatment of food waste for improvement of biogas production during anaerobic digestion – A review. *Journal of Cleaner Production*, 172, 1545–1558. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.199>
- Brémond, U., de Buyer, R., Steyer, J. P., Bernet, N., & Carrere, H. (2018). Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(October 2017), 583–604. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.103>
- Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2016). Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, 54, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>
- Capson-Tojo, G., Trably, E., Rouez, M., Crest, M., Bernet, N., Steyer, J. P., Delgenès, J. P., & Escudíé, R. (2018). Methanosarcina plays a main role during methanogenesis of high-solids food waste and cardboard. In *Waste Management* (Vol. 76, pp. 423–430). <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.004>
- Čater, M., Fanel, L., Malovrh, Š., & Marinšek Logar, R. (2015). Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 186, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.029>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, 15(3), 799–821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Croce, S., Wei, Q., D'Imporzano, G., Dong, R., & Adani, F. (2016). Anaerobic digestion of straw and corn stover: The effect of biological process optimization and pre-treatment on total bio-methane yield and energy performance. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1289–1304. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.004>
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2012). Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology*, 112, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079>
- De Vrieze, J., Raport, L., Roume, H., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D. H., & Boon, N. (2016). The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations. *Water Research*, 104, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.008>
- Demirbas, A., & Ozturk, T. (2005). Anaerobic Digestion of Agricultural Solid Residues. *International Journal of Green Energy*, 1(4), 483–494. <https://doi.org/10.1081/GE-200038719>
- Ecem Öner, B., Akyol, Ç., Bozan, M., Ince, O., Aydın, S., & Ince, B. (2018). Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues.

- Bioresource Technology*, 249, 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.040>
- Ferguson, R. M. W., Coulon, F., & Villa, R. (2018). Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. *Science of the Total Environment*, 642, 754–763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.007>
- Ferraro, A., Dottorini, G., Massini, G., Mazzurco Miritana, V., Signorini, A., Lembo, G., & Fabbicino, M. (2018). Combined bioaugmentation with anaerobic ruminal fungi and fermentative bacteria to enhance biogas production from wheat straw and mushroom spent straw. *Bioresource Technology*, 260(April), 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.128>
- Fotidis, I. A., Treu, L., & Angelidaki, I. (2017). Enriched ammonia-tolerant methanogenic cultures as bioaugmentation inocula in continuous biomethanation processes. *Journal of Cleaner Production*, 166(13), 1305–1313. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.08.151>
- Fotidis, I. A., Wang, H., Fiedel, N. R., Luo, G., Karakashev, D. B., & Angelidaki, I. (2014). Bioaugmentation as a Solution To Increase Methane Production from an Ammonia-Rich Substrate. *Environmental Science & Technology*, 48(13), 7669–7676. <https://doi.org/10.1021/es5017075>
- Gaceta Oficial de la Ciudad de México. (2016). *Programa de Gestión Integral de los Residuos Sólidos para la Ciudad de México 2016-2020* (Issue 183).
- Gállego Bravo, A. K., Salcedo Serrano, D. A., López Jiménez, G., Nirmalkar, K., Murugesan, S., García-Mena, J., Gutiérrez Castillo, M. E., & Tovar Gálvez, L. R. (2019). Microbial Profile of the Leachate from Mexico City's Bordo Poniente Composting Plant: An Inoculum to Digest Organic Waste. *Energies*, 12, 1–21. <https://doi.org/10.3390/en12122343>
- Ghanimeh, S. A., Al-Sanioura, D. N., Saikaly, P. E., & El-Fadel, M. (2018). Correlation between system performance and bacterial composition under varied mixing intensity in thermophilic anaerobic digestion of food waste. *Journal of Environmental Management*, 206, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.062>
- Goux, X., Calusinska, M., Fossépré, M., Benizri, E., & Delfosse, P. (2016). Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor – Appearance of mesophilic anaerobic conditions and establishment of the methanogenic microbial community. *Bioresource Technology*, 212(July), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.040>
- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T., Benizri, E., & Delfosse, P. (2015). Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0309-9>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27(3), 597–613. <https://doi.org/10.1002/btpr.575>
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M.,

- de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515–2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
- Jiang, J., Li, L., Li, Y., He, Y., Wang, C., & Sun, Y. (2020). Bioaugmentation to enhance anaerobic digestion of food waste: Dosage, frequency and economic analysis. *Bioresource Technology*, 307(February). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123256>
- Kaparaşu, P., Serrano, M., & Angelidaki, I. (2009). Bioresource Technology Effect of reactor configuration on biogas production from wheat straw hydrolysate. *Bioresource Technology*, 100(24), 6317–6323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.101>
- Kawai, M., Nagao, N., Tajima, N., Niwa, C., Matsuyama, T., & Toda, T. (2014). The effect of the labile organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield. *Bioresource Technology*, 157, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.018>
- Koo, T., Shin, S. G., Lee, J., Han, G., Kim, W., Cho, K., & Hwang, S. (2017). Identifying methanogen community structures and their correlations with performance parameters in four full-scale anaerobic sludge digesters. *Bioresource Technology*, 228, 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.118>
- Koo, T., Yulisa, A., & Hwang, S. (2019). Microbial community structure in full scale anaerobic mono-and co-digesters treating food waste and animal waste. *Bioresource Technology*, 282(December 2018), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.050>
- Kothari, R., Pandey, A. K., Kumar, S., Tyagi, V. V., & Tyagi, S. K. (2014). Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 174–195. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.011>
- Lebioccka, M., Montusiewicz, A., & Cydzik-Kwiatkowska, A. (2018). Effect of Bioaugmentation on Biogas Yields and Kinetics in Anaerobic Digestion of Sewage Sludge. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8), 1717. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081717>
- Lee, J. T. E., Wang, Q., Lim, E. Y., Liu, Z., He, J., & Tong, Y. W. (2020). Optimization of bioaugmentation of the anaerobic digestion of *Axonopus compressus* cowgrass for the production of biomethane. *Journal of Cleaner Production*, 258, 120932. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120932>
- Li, D., Ran, Y., Chen, L., Cao, Q., Li, Z., & Liu, X. (2018). Instability diagnosis and syntrophic acetate oxidation during thermophilic digestion of vegetable waste. *Water Research*, 139, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.019>
- Li, L., He, Q., Ma, Y., Wang, X., & Peng, X. (2016). A mesophilic anaerobic digester for treating food waste: process stability and microbial community analysis using pyrosequencing. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0466-y>
- Li, Y.-F., Nelson, M. C., Chen, P., Graf, J., Li, Y., & Yu, Z. (2015). Comparison of the microbial communities in solid-state anaerobic digestion (SS-AD) reactors operated at mesophilic and thermophilic temperatures.

Applied Microbiology and Biotechnology, 99(2), 969–980. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6036-5>

Li, Y., Li, L., Sun, Y., & Yuan, Z. (2018). Bioaugmentation strategy for enhancing anaerobic digestion of high C/N ratio feedstock with methanogenic enrichment culture. *Bioresource Technology*, 261(2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.069>

Li, Y., Yang, G., Li, L., & Sun, Y. (2018). Bioaugmentation for overloaded anaerobic digestion recovery with acid-tolerant methanogenic enrichment. *Waste Management*, 79, 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.043>

Lin, L., Xu, F., Ge, X., & Li, Y. (2018). Improving the sustainability of organic waste management practices in the food-energy-water nexus: A comparative review of anaerobic digestion and composting. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 89(February), 151–167. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.025>

Lins, P., Reitschuler, C., & Illmer, P. (2014). *Methanosarcina* spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresource Technology*, 152, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.020>

Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., Okoh, A., Makaka, G., & Simon, M. (2013). Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 4390–4417. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094390>

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45(February), 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>

Martin-Ryals, A., Schideman, L., Li, P., Wilkinson, H., & Wagner, R. (2015). Improving anaerobic digestion of a cellulosic waste via routine bioaugmentation with cellulolytic microorganisms. *Bioresource Technology*, 189, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.069>

Meegoda, J., Li, B., Patel, K., & Wang, L. (2018). A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2224. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102224>

Mirmohamadsadeghi, S., Karimi, K., Tabatabaei, M., & Aghbashlo, M. (2019). Biogas production from food wastes: A review on recent developments and future perspectives. *Bioresource Technology Reports*, 7(March), 100202. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100202>

Neumann, L., & Scherer, P. (2011). Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops. *Bioresource Technology*, 102(3), 2931–2935. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.068>

Nghiem, L. D., Hai, F. I., Price, W. E., Wickham, R., Ngo, H. H., & Guo, W. (2017). By-products of Anaerobic Treatment. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 469–484). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63665-2.00018-7>

- Nguyen, A. Q., Nguyen, L. N., Phan, H. V., Galway, B., Bustamante, H., & Nghiem, L. D. (2019). Effects of operational disturbance and subsequent recovery process on microbial community during a pilot-scale anaerobic co-digestion. In *International Biodeterioration and Biodegradation* (Vol. 138, pp. 70–77). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.01.002>
- Nzila, A. (2017). Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production. *Anaerobe*, 46, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.007>
- Paritosh, K., Yadav, M., Mathur, S., Balan, V., Liao, W., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2018). Organic Fraction of Municipal Solid Waste: Overview of Treatment Methodologies to Enhance Anaerobic Biodegradability. *Frontiers in Energy Research*, 6(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00075>
- Peng, X., Börner, R. A., Nges, I. A., & Liu, J. (2014). Impact of bioaugmentation on biochemical methane potential for wheat straw with addition of *Clostridium cellulolyticum*. *Bioresource Technology*, 152, 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.067>
- Pérez-Denicia, E., Fernández-Luqueño, F., Vilariño-Ayala, D., Manuel Montaña-Zetina, L., & Alfonso Maldonado-López, L. (2017). Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 597–613. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.016>
- Pohl, M., Heeg, K., & Mumme, J. (2013). *Bioresource Technology Anaerobic digestion of wheat straw – Performance of continuous solid-state digestion*. 146, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.101>
- Pramanik, S. K., Suja, F. B., Zain, S. M., & Pramanik, B. K. (2019). The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. In *Bioresource Technology Reports* (p. 100310). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100310>
- Rios, M., & Kaltschmitt, M. (2016). Electricity generation potential from biogas produced from organic waste in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 384–395. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.033>
- Romero-Güiza, M. S., Vila, J., Mata-Alvarez, J., Chimenos, J. M., & Astals, S. (2016). The role of additives on anaerobic digestion: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 1486–1499. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.094>
- SEDEMA-CDMX. (2019). *Inventario de Residuos Sólidos de la Ciudad de México. Secretaría de Medio Ambiente 2018*. <http://www.sedema.cdmx.gob.mx/sedema/index.php/temas-ambientales/programas-generales/residuos-solidos>
- SEMARNAT. (2015). *Informe de la Situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales*. (p. 498).
- SENER, G. F. M. (2016). Balance Nacional de Energía. In *SENER, Gobierno Federal México* (pp. 15–20).

- SENER, G. F. M. (2017). Prospectiva de Energías Renovables. *Diario Oficial de La Federación*, 1, 94.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Strang, O., Ács, N., Wirth, R., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2017). Bioaugmentation of the thermophilic anaerobic biodegradation of cellulose and corn stover. *Anaerobe*, 46, 104–113.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.014>
- Tale, V. P., Maki, J. S., & Zitomer, D. H. (2015). Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. *Water Research*, 70, 138–147.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.037>
- Tao, Y., Ersahin, M. E., Ghasimi, D. S. M., Ozgun, H., Wang, H., Zhang, X., Guo, M., Yang, Y., Stuckey, D. C., & van Lier, J. B. (2019). Biogas productivity of anaerobic digestion process is governed by a core bacterial microbiota. In *Chemical Engineering Journal* (p. 122425).
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122425>
- Tian, H., Mancini, E., Treu, L., Angelidaki, I., & Fotidis, I. A. (2019). Bioaugmentation strategy for overcoming ammonia inhibition during biomethanation of a protein-rich substrate. *Chemosphere*, 231, 415–422.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.140>
- Tian, H., Yan, M., Treu, L., Angelidaki, I., & Fotidis, I. A. (2019). Hydrogenotrophic methanogens are the key for a successful bioaugmentation to alleviate ammonia inhibition in thermophilic anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, 293(May), 122070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122070>
- Tsapekos, P., Kougias, P. G., Vasileiou, S. A., Treu, L., Campanaro, S., Lyberatos, G., & Angelidaki, I. (2017). Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology*, 234, 350–359.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.043>
- Tyagi, V. K., Fdez-Güelfo, L. A., Zhou, Y., Álvarez-Gallego, C. J., Garcia, L. I. R., & Ng, W. J. (2018). Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93(June 2017), 380–399.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.051>
- Uçkun Kiran, E., Stamatelatos, K., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2016). Production of biogas via anaerobic digestion. In *Handbook of Biofuels Production* (pp. 259–301). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100455-5.00010-2>
- Varnero Moreno, M. T. (2011). Manual de Biogas. *Manual de Biogas Proyecto CHI/00/G32*, 1–119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Venkateshwaran, K., Milferstedt, K., Hamelin, J., & Zitomer, D. H. (2016). Anaerobic digester bioaugmentation influences quasi steady state performance and microbial community. *Water Research*, 104, 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.012>
- Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., & Jiang, B. (2018). Microbial characteristics in anaerobic digestion

- process of food waste for methane production—A review. *Bioresource Technology*, 248, 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>
- Wu, D., Li, L., Zhao, X., Peng, Y., Yang, P., & Peng, X. (2019). Anaerobic digestion: A review on process monitoring. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (pp. 1–12).
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.12.039>
- Wu, L., Yang, Y., Chen, S., Zhao, M., Zhu, Z., Yang, S., Qu, Y., Ma, Q., He, Z., Zhou, J., & He, Q. (2016). Long-term successional dynamics of microbial association networks in anaerobic digestion processes. *Water Research*, 104, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.072>
- Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Khan, A., Xiong, J., Tian, F., & Li, X. (2018). A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*, 247(June 2017), 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.095>
- Yang, H., & Deng, L. (2020). Using air instead of biogas for mixing and its effect on anaerobic digestion of animal wastewater with high suspended solids. *Bioresource Technology*, 318, 124047.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124047>
- Yang, H., Deng, L., Wu, J., Wang, W., Zheng, D., Wang, Z., & Liu, Y. (2021). Intermittent air mixing system for anaerobic digestion of animal wastewater: Operating conditions and full-scale validation. *Bioresource Technology*, 335, 125304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125304>
- Yang, Zhiman, Guo, R., Xu, X., Wang, L., & Dai, M. (2016). Enhanced methane production via repeated batch bioaugmentation pattern of enriched microbial consortia. *Bioresource Technology*, 216, 471–477.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.062>
- Yang, Ziyi, Wang, W., Liu, C., Zhang, R., & Liu, G. (2019). Mitigation of ammonia inhibition through bioaugmentation with different microorganisms during anaerobic digestion: Selection of strains and reactor performance evaluation. *Water Research*, 155, 214–224.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.048>
- Zahedi, S., Solera, R., Micolucci, F., Cavinato, C., & Bolzonella, D. (2016). Changes in microbial community during hydrogen and methane production in two-stage thermophilic anaerobic co-digestion process from biowaste. *Waste Management*, 49, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.016>
- Zamanzadeh, M., Hagen, L. H., Svensson, K., Linjordet, R., & Horn, S. J. (2016). Anaerobic digestion of food waste - Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Research*, 96, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.058>
- Zhang, J., Guo, R.-B., Qiu, Y.-L., Qiao, J.-T., Yuan, X.-Z., Shi, X.-S., & Wang, C.-S. (2015). Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 179, 306–313.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.022>
- Zhu, X., Treu, L., Kougias, P. G., Campanaro, S., & Angelidaki, I. (2018). Converting mesophilic upflow sludge

blanket (UASB) reactors to thermophilic by applying axenic methanogenic culture bioaugmentation.
Chemical Engineering Journal, 332, 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.113>