Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

ANÁLISIS DE ACTIVIDAD METANOGÉNICA DE INÓCULOS Y POTENCIAL METANOGÉNICO DE BIOMASA RESIDUAL

Por:

MARTIN ESTEBAN CASTILLO SALAS

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN MAZATLAN

EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Mazatlán Sinaloa Marzo 2016

Hermosillo Sonora, Marzo 2016

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González

Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de I.B.Q. Martin Esteban Castillo Salas, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dr. Pablo Almazán Rueda
Director de Tesis

Dr. Adrian Rodríguez García
Co-Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Franco Nava
Asesor

Dr. Miguel Betancourt Lozano
Asesor

M.C. Carolina Ceballos Bernal
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a **CONACYT** por la beca de maestría otorgada para la realización de ésta tesis.

En segundo lugar agradecer a **CIAD** por aceptarme como alumno y prepararme académicamente para ser Maestro en Ciencias.

A los miembros de mi comité **Dr. Pablo Almazán, Dr. Miguel Franco Nava, Dr. Miguel Betancourt, M.C. Carolina Ceballos, Dr. Adrian Rodríguez**.

Agradecimiento especial merece el **Dr. Mike** quien a pesar de las dificultades y problemas que se presentaron antes y durante el tiempo que llevó el experimento, me apoyó y facilitó lo necesario para continuar y terminar lo mejor posible este trabajo.

A mi esposa, amiga y compañera de generación **Adriana** por el amor y apoyo incondicional durante estos años y alentarme a seguir adelante. Sin tu ayuda y presencia no habría sido tan fácil ésta etapa y tan gratificante culminarla. Gracias por tu paciencia, por tus palabras de aliento cuando las necesité, y por tu invaluable compañía siempre. Gracias por todo. Te amo.

A mi familia por acompañarme y apoyarme en esta etapa, especialmente a mi Madre, **Lorena Salas Tirado** quien con sacrificios siempre supo ayudarme incondicionalmente.

A mis compañeros de generación, Eveline, Daniela, Luz, Alejandra, Andrés, Adriana, Héctor, Rafael y Marian por su grata compañía durante este tiempo.

A los compañeros y estudiantes que pasaron como residentes en el Laboratorio en especial a Samantha, al profe Sol y Dr Guillermo Barba por el apoyo brindado, así como a Abraham Jiménez por compartir pláticas y momentos agradables en el Laboratorio.

Al Dr. Roberto Valencia por las facilidades otorgadas para la realización de parte de este estudio.

A todos aquellos que contribuyeron a la realización de mi trabajo. ¡¡Gracias!!

DEDICATORIA

Todo el esfuerzo que implicó la realización de este trabajo lo dedico de forma especial a mi familia y muy en especial a mi madre LORENA SALAS TIRADO y mi esposa ADRIANA OSUNA SALAZAR, ya que han sido parte fundamental en mi vida y me han apoyado incondicionalmente.

Así mismo, a los Doctores Mike, Pablo y Miguel quienes hicieron posible que este trabajo se pudiera realizar aun en las condiciones más adversas.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS iv
DEDICATORIA vi
CONTENIDO vii
LISTA DE TABLAS ix
LISTA DE FIGURAS x
RESUMEN xi
I. INTRODUCCIÓN 1
II. ANTECEDENTES 5
III. JUSTIFICACIÓN 11
IV. HIPÓTESIS 12
V. OBJETIVOS 13
5.1. Objetivo General 13
5.2. Objetivos Particulares 13
VI. MATERIALES Y METODOS 14
6.1. Condiciones experimentales actividad metanogénica específica 19
6.2. Metodología objetivo 2. 20
6.2.1. Condiciones experimentales potencial metanogénico. 20
6.3. Composición del biogás producido. 21
6.4. Análisis Estadístico de la Actividad Metanogénica Específica entre los inóculos (Estiércol de Vaca, Cerdo y Pollo). 22
VII. RESULTADOS Y DISCUSION 23
7.1. Actividad metanogénica específica 23
7.1.1. Actividad metanogénica específica estiércol de vaca 23
7.1.2. Actividad metanogénica específica estiércol de cerdo 25
7.1.3. Actividad metanogénica específica estiércol de pollo 26
7.2. Actividad Metanogénica Específica entre los inóculos (Estiércol de Vaca, Cerdo y Pollo). 28
7.3. Potencial Metanogénico 39
7.3.1 Control 39
7.3.2. Sustrato Lodo Maz Industrial 39
7.3.3. Sustrato Lodo Alimentos Kay 40

7.3.4. Sustrato Vísceras y desechos de fileteado..... 41
7.3.5. Composición de biogás 46
7.4. Elección de mejor sustrato 48
VIII. CONCLUSIONES..... 49
IX. RECOMENDACIONES 51
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Resultado del Análisis de rangos de Kruskal-Wallis para la producción metanogénica específica ($\boldsymbol{LCH4 / KgS.V.}$) después de 456 horas de digestión, utilizando estiércol de vaca, cerdo y pollo como inóculo. 29

Tabla 2.-Análisis de rangos de Kruskal-Wallis para la mediana de la producción metanogénica específica ($\boldsymbol{LCH4 / KgS.V.}$) comparación entre estiércol de vaca, cerdo y pollo. 30

Tabla 3.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 48 horas. 32

Tabla 4.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 96 horas 32

Tabla 5.- Análisis de comparación múltiple (Tukey Test 96 horas):..... 33

Tabla 6.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 192 horas 33

Tabla 7.- Análisis de comparación múltiple (Tukey Test 192 horas):..... 34

Tabla 8.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 336 horas 34

Tabla 9.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 408 horas 34

Tabla 10.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 456 horas 35

Tabla 11.- Composición de biogás en las mezclas utilizadas para calcular la Actividad Metanogénica Específica 37

Tabla 12.- Análisis estadístico de resultados de potencial metanogénico de Lodo de Maz Industrial, Alimentos Kay y Vísceras y desechos de Fileteado ... 42

Tabla 13.- Análisis de comparación múltiple (Tukey Test):..... 43

Tabla 14.- Composición de biogás producido en Análisis de Potencial Metanogénico. 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Secuencia metabólica, fases y grupos bacterianos en la digestión anaerobia. Torres y Pérez (2010) 2

Figura 2.- Vista general de gasómetros instalados 14

Figura 3.- Montaje experimental básico para Potencial metanogénico(Torres & Pérez, 2010) 16

Figura 4.-Esquema de U.I.D. y la conexión de sus componentes..... 17

Figura 5.- Vista general de U.I.D. y sus componentes en modo de operación . 18

Figura 6.- Montaje experimental de mezclas para medición de la composición de biogás 21

Figura 7.- Analizador de biogás Landtec Biogas 5000 en funcionamiento. 22

Figura 8.Metanogénesis acumulada ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de vaca como inóculo. 24

Figura 9.Metanogénesis acumulada ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de cerdo como inóculo. 25

Figura 10. Metanogénesis acumulada ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de pollo como inóculo. 27

Figura 11.- Gráficos de producción de biogás de los inóculos a través del tiempo 37

Figura 12.- Gráfica de Potencial metanogénico acumulado Control ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de pollo como inóculo,. 39

Figura 13.- Gráfico de Potencial Metanogénico acumulada ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de pollo como inóculo y Lodo de Maz Industrial como sustrato 40

Figura 14.- Gráfico de Potencial Metanogénico acumulada ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de pollo como inóculo y Lodo de Alimentos Kay como sustrato 41

Figura 15.- Gráfico de Potencial Metanogénico acumulada ($LCH4\ /\ KgS.V.$), utilizando estiércol de pollo como inóculo y Vísceras y desechos de fileteado como sustrato 42

Figura 16.- Gráfico de cajas y bigotes de la comparación de sustratos a un tiempo de digestión de 456 horas.. 44

RESUMEN

En este estudio se analizó la capacidad de producción de biogás utilizando estiércoles de vaca, cerdo y pollo como inóculos. Se encontró que los tres tienen capacidad para ser utilizados como inóculos, sin embargo el estiércol de pollo es el que presenta mayor estabilidad de producción, además de un arranque de producción de biogás más rápido respecto al estiércol de vaca y cerdo, por lo que se eligió como inóculo para digerir y evaluar 3 sustratos para digestión anaerobia, Lodo de Maz Industrial, Lodo de Alimentos Kay así como Vísceras y desechos de fileteado. Los resultados mostraron que el sustrato de Maz Industrial no puede ser evaluado en las condiciones experimentales que se utilizaron en este trabajo debido a sus características, lo que no significa que no sea posible obtener biogás a partir de él, sino que se requiere de un pretratamiento antes de su digestión, el cual no se contempló en éste estudio. Los sustratos de Lodo Alimentos Kay y Vísceras de Fileteado mostraron buen comportamiento y producción de biogás, alcanzándose mayores valores máximos de producción en Lodo alimentos Kay, sin embargo, la mezcla compuesta por vísceras alcanzan valores similares y lo hacen en menor tiempo. Ambos sustratos parecen ser adecuados para su uso en digestión anaerobia utilizando estiércol de pollo como inóculo.

I. INTRODUCCIÓN

La pesca y acuacultura tienen un papel importante en el suministro de alimentos para la creciente población mundial (FAO, 2013). En México operan 272 empresas de procesamiento de pescados y mariscos a nivel nacional, de las cuales 64 empresas se ubican en el estado de Sinaloa (SAGARPA, 2014). La cantidad de desechos que se genera durante el procesamiento de productos pesqueros depende de factores como especie, tamaño, métodos de captura, procesamiento, las regulaciones locales y de mercado. Los desechos generados representan entre el 40 hasta el 65 % del peso total del organismo y que en la mayoría de los casos son dispuestos de forma inadecuada en el medio ambiente (Tomczak-Wandzel y Levlin 2012).

Dichos desechos pueden alterar los ecosistemas costeros a diferentes niveles, debido a las altas cargas contaminantes que generan, reduciendo la biomasa, densidad y diversidad de especies en el entorno, además de que modifican las cadenas alimentarias naturales. Por lo anterior, la disposición de estos desechos ya se ha convertido en un asunto de interés público y su solución es actualmente tema de investigación (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008).

Para resolver dicho problema se ha propuesto, entre algunas otras alternativas, el tratamiento de estos desechos por medio de la digestión anaerobia. La digestión anaerobia es aplicable a un amplio rango de desechos, incluyendo municipales, agrícolas e industriales, los cuales son transformados biológicamente en ausencia de oxígeno produciendo biogás y un material digerido que puede utilizarse como biofertilizante (Eiroa *et al.*, 2012).

El proceso de digestión anaerobia es muy complejo y es realizado por un consorcio bacteriano de microorganismo que en acción conjunta convierten las

macromoléculas orgánicas complejas en compuestos de bajo peso molecular tales como metano, dióxido de carbono, agua y amonio.

En el proceso de digestión anaerobia pueden considerarse cuatro fases: Hidrólisis, Acidogénesis, Acetogénesis y Metanogénesis (Torres y Pérez, 2010), esquematizadas en la Figura 1.

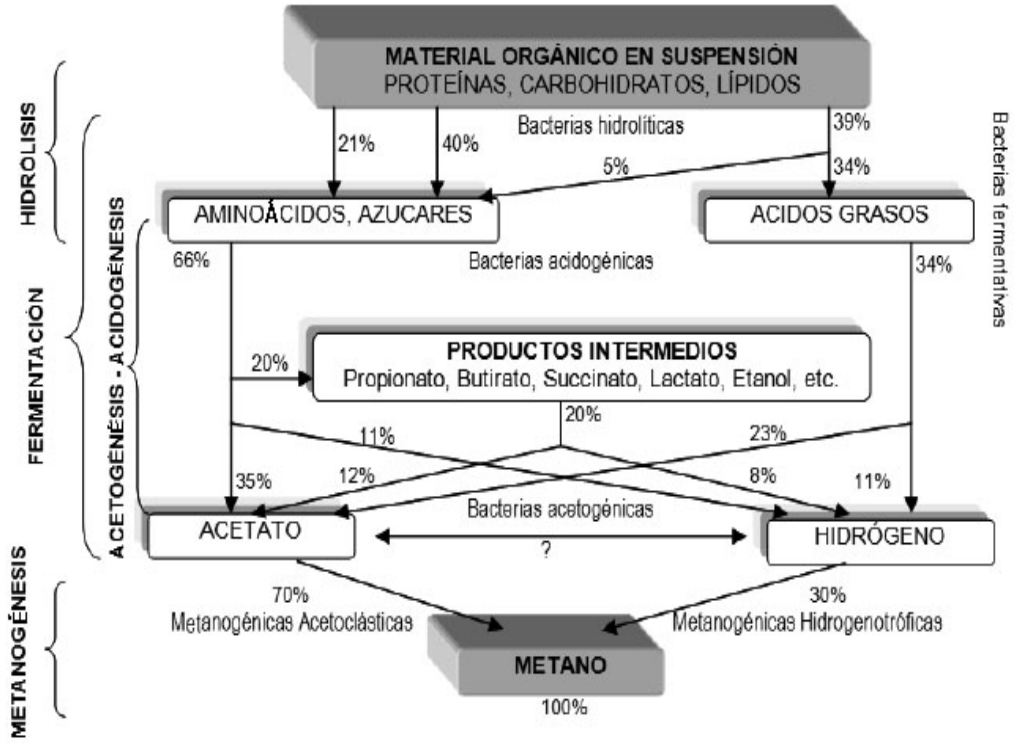


Figura 1.- Secuencia metabólica, fases y grupos bacterianos en la digestión anaerobia. Torres y Pérez (2010)

1. En la etapa de hidrólisis las bacterias hidrolíticas fermentativas convierten los complejos orgánicos insolubles en moléculas solubles. Los polímeros se hidrolizan a sus monómeros correspondientes, por ejemplo, la celulosa en azúcares o alcoholes y las proteínas a péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas hidrolíticas (lipasas, proteasas, celulasas, amilasas, etc.) secretadas por los microorganismos (Torres y Pérez, 2010). Esta etapa es de gran importancia y puede llegar a ser

limitante de la velocidad de degradación anaerobia (Themelis y Verma, 2002).

2. En la segunda etapa, acetogénesis, las bacterias acetogénicas, también conocidas como formadores de ácido (de ahí que algunos autores subdividan esta etapa, agregando la etapa de acidogénesis), convierten los productos de la primera fase en ácidos orgánicos simples, dióxido de carbono e hidrógeno (Torres y Pérez, 2010). Los principales ácidos que se producen son ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y etanol. Algunos ejemplos de bacterias acetogénicas son: *Wolinii syntrophobacter*, S*ytrophomonos wolfei*, *Clostridium spp*., *Peptococcus anerobus, Lactobacillus y Actinomyces* (Themelis y Verma, 2002).
3. Finalmente, en la tercera etapa el metano es producido por bacterias formadoras de metano (también conocidas como metanogénicas) ya sea por medio de la ruptura de moléculas de ácido acético para generar dióxido de carbono y metano, o por reducción de dióxido de carbono con hidrógeno (Torres y Pérez, 2010). Entre las bacterias metanogénicas se encuentran *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanococcus* y *Methanosarcina*. *Methanosarcina* spp., *Methanothrix* spp. y *Methanosaeta* entre otras (Themelis y Verma, 2002).

Las reacciones metabólicas implicadas en la degradación anaerobia son realizadas por diversos grupos de microorganismos, por lo cual la fuente de microorganismos y el tamaño del inóculo utilizado son los factores más importantesdurante la etapa de arranque de cualquier digestor anaerobio (Khalid *et al.*, 2011).

Además es importante mencionar que cada inóculo tiene cierta capacidad específica para degradar algún sustrato en particular por las características propias de éste último, razón por la cual no es suficiente con caracterizar el sustrato a utilizar, sino también cuantificar la actividad microbiana del inóculo en las diferentes etapas implicadas para identificar la etapa limitante en la digestión anaerobia y los posibles efectos tóxicos e inhibitorios (Hutñan *et al.*, 1999).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es el de evaluar las fuentes de inóculos para digestión anaerobia y la capacidad de digestión anaerobia de desechos que se generan en la región de Mazatlán Sinaloa como resultado de actividades pesqueras y/o industriales pesqueras. Así como proponer una alternativa de aprovechamiento evitando daños al ambiente derivados de su disposición inadecuada.

II. ANTECEDENTES

La bioquímica y microbiología de la digestión anaerobia es un proceso complejo que involucra numerosas poblaciones bacterianas, ligadas a sus especificidades al sustrato (Hutñan *et al*., 1999). Un método para evaluar la capacidad de digestión anaerobia de algún sustrato en específico, es el potencial metanogénico, por medio del cual se degrada el sustrato anaeróbicamente y se mide la producción de biogás a una temperatura controlada, es expresado en términos de mL a temperatura y presión estándar de CH_4 por gramo de sólidos volátiles en el inóculo (mL CH_4/g S.V.) (Qamaruz, 2010).

Este método es barato, simple y repetible para hacer comparaciones de la digestibilidad y el potencial de producción de biogás entre diferentes sustratos, el cual depende de la composición de los desechos sólidos, la presencia de inhibidores y las características del inoculo utilizado entre otros (Eiroa *et al.*, 2012).

Callaghan *et al.,* (1998), estudiaron la capacidad metanogénica de excremento de ganado vacuno mezclados con una gama de residuos sólidos y digeridos en proporción 1:1 en digestiones por lotes. Ellos encontraron que la digestión con frutas y residuos vegetales, la de desechos de pescado, y la de lodo de flotación por aire disuelto fueron más eficaces en cuanto a producción de metano acumulada (m^3 CH_4/kg S.V.) que la digestión de estiércol vacuno, demostrando la viabilidad del uso del excremento para digerir con desechos de ese tipo.

Batista *et al.,* (2015), evaluaron el efecto de la carga orgánica expresada en función de la relación inóculo/sustrato (R.I.S.) sobre el potencial de metanogénico de la gallinaza de jaula usando como inóculo lodo estiércol bovino. Realizaron ensayos a temperatura mesofílica (39 °C) en los cuales

evaluaron cargas orgánicas de 16.6, 11.0, 8.3, 6.6 y 5.5 g S.V./L. El mayor potencial de biometanización (0.58 m^3 CH_4/kg S.V.) se alcanzó con una RIS de 1.0. Su estudio demuestra que la gallinaza es un sustrato potencial para ser degradado por digestión anaerobia y encontraron que el rendimiento del proceso es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Este estudio también se confirma que la RIS permite diluir la concentración de compuestos inhibitorios como el amonio en el caso de la gallinaza.

Oyewole (2010), por su parte, estudió la producción de biogás a partir de gallinaza. Para los experimentos utilizó 2.8 kg de gallinaza seca, los cuales añadió a un reactor con 3.7 litros de agua y se digirió a 28ºC. Encontró que la producción de biogás se inicia después de 7 días y alcanzó un promedio de 72.2 cm^3 /kg/día después de tres semanas. Además realizó la caracterización de los organismos presentes en las digestiones, aislando dos grupos de bacterias, formadoras de ácidos (*Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y Escherichia coli*) y formadoras de metano (*Methanobacterium* sp*. y Methanococcus* sp.); además de hongos, entre los que se encuentran: *Mucormucedo, Aspergillus niger y Penicillium notatum.* Reportó que a una temperatura de 28ºC se optimiza la producción de biogás, alcanzando esta los 90cm^3/kg/día. Adicionalmente utilizó el lodo resultante de los experimentos para estimular el crecimiento de plantas de maíz y los resultados indicaron que la planta de maíz cultivada en suelo sin lodos crecía menos que la cultivada en suelo con lodos.

López Dávila *et al.,* (2013) determinaron el potencial de producción de biogás de residuos sólidos de la caña de azúcar producidos en Uruguay, utilizando como inóculo lodo anaerobio de estiércol porcino. Los residuos evaluados fueron paja de caña y bagazo de caña. Realizaron experimentos en lote, en botellas serológicas de 585 mL., a temperatura de 35±2 ºC y reportan que la producción total de biogás de la digestión de los residuos evaluados fue superior a cuando solo se utiliza estiércol, con lo cual se demuestran la viabilidad del inóculo utilizado para el arranque de digestores que traten estos

residuos. Obtuvieron de potencial de biogás 259-273 m^3/ton S.V., lo que consideran alentador para el uso de esta tecnología a escala mayor con fines energéticos.

Por otra parte, para hacer más eficiente el proceso de digestión anaerobia se ha propuesto el uso de co-sustratos en la digestión anaerobia con el fin de minimizar el efecto de posibles inhibidores presentes en algún sustrato durante el proceso de digestión, así como lograr un balance entre carbohidratos y proteínas e incrementar el rendimiento en biogás (Mshandet *et al.*, 2004). En co-digestión de dos o más sustratos puede lograrse diluir los inhibidores en los materiales a digerir, logrando de esta forma sinergia entre los co-sustratos, además de que generalmente se aumenta el potencial de digestión y la producción de biogás (Eiroa *et al.*, 2012).

Regueiro *et al.,* (2012), evaluaron la co-digestión de estiércol de cerdo con desechos de pescado y residuos de elaboración de biodiesel y la compararon con la digestión del estiércol solo. Indican que la co-digestión de estiércol de cerdo con desechos de pescado y desechos de biodiesel es posible, siempre y cuando los ácidos grasos volátiles y el amonio se mantengan debajo de los niveles de inhibición mediante el ajuste de las condiciones de funcionamiento, tales como la composición de alimentación, velocidad de carga orgánica y tiempo de retención hidráulica. Encontraron que la co-digestión de estiércol de cerdo y desechos de pescado a proporciones de 90:10 y 95:5 fue posible con cargas orgánicas de 1-1.5 g DQO/L d, con las cuales obtuvieron tasas de producción de biogás de 0.4-0.6 L/L d y eficiencias de remoción de DQO de 65 a 70%. Con respecto a los desechos de producción de biodiesel, también obtuvieron buenos resultados, con una producción de biogás de 0.9 L/L d y una reducción de DQO de 85%. En general la producción de biogás y el contenido de metano en la co-digestión fueron mayores que en la digestión del estiércol por separado.

En busca de disminuir la carga contaminante que pueden suponer los desechos de pescado, Tomczak-Wandzely y Levlin (2012), estudiaron diferentes partes de pescado para ser usados en co-digestión y mejorar la producción de biogás a partir de desechos de pescado y lodos de planta de tratamiento. Para los experimentos Tomczak-Wandzely y Levlin (2012) usaron el Sistema de Prueba de Potencial Metanogénico Automático II (AMTPS II) a temperaturas mesofílicas. Los resultados de este estudio demostraron que el sustrato más adecuado es una mezcla con los intestinos y vísceras de pescado con lodo de aguas residuales, encontrando una producción de 0.50 m^3 de CH_4/kg SV.

Por su parte, Eiroa *et al*., (2012) estudiaron el potencial metanogénico de diferentes desechos sólidos de pescado: atún, sardina, macarela y pez aguja. Obtuvieron una producción promedio de 0.47 g COD CH_4 por gramo de DQO agregada en experimentos con los diferentes tipos de desechos con 1% de Sólidos Totales y lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Además, estudiaron el efecto del incremento en la proporción desecho/inoculo y el tipo de inoculo, utilizando desechos de macarela y lodo anaerobio granular. En este experimento, estudiaron incrementos de 1.1-1.3, 2.8-3-3 y 5.7-6.5 g S.V. desecho/g S.V. inoculo, obtuvieron producción de metano de 0.47g D CH_4 por gramo de DQO, similar a lo obtenida en las digestiones por separado de los distintos tipos de peces, encontrando que a estas proporciones la producción de biogás se mejora, mientras que con lodo convencional el sistema se sobrecarga debido a la acumulación de AGV y AGCL. Por último, realizaron ensayos de co-digestión con aulagas y residuos de pescado, pero la producción de metano no mejoró, con lo que demuestran que la codigestión de desechos de pescado con aulagas no mejora la producción de biogás.

Asimismo, Achu *et al*., (2012) estudiaron la digestión anaerobia de vísceras, piel y cabeza (desechos de pescado) y de lodo producido después de pre-tratamiento enzimático para la extracción de aceite y proteína de pescado hidrolizada (lodo de pescado) para la producción de metano. Los resultados que

obtuvieron demostraron alta biodegradabilidad tanto del lodo de pescado como de desechos de pescado, obteniendo una producción específica de metano de 742 y 828 m^3CH_4/ton S.V. añadido, respectivamente. Sin embargo, el análisis químico de los desechos de pescado, mostró altas concentraciones de metales ligeros, alto contenido de grasa y proteína, que podrían ser inhibidores de las bacterias metanogénicas. Debido al tratamiento enzimático que se realizó (extracción de aceite y proteína) se obtienen condiciones de digestibilidad idóneas libre de inhibidores, con los que obtienen altos rendimientos de metano con desechos de pescado, incluso mayores que en co-digestión con desechos agrícolas. Este estudio demuestra la viabilidad de la co-digestión de los desechos de pescado en condiciones ideales y enumera los inconvenientes que este tipo de sustratos pueden representar, sin embargo muestra que en proporciones adecuadas, los desechos de pescado pueden ser minimizados por medio de la digestión anaerobia.

Krishna *et al.,* (2013) también estudiaron el aprovechamiento de desechos de pescado, ellos elaboraron ensilados de desechos de pescado obtenidos de una procesadora, para producción de biogás. Los ensilajes fueron preparados mediante la mezcla de desechos de pescado con residuos de pan y residuos de granos de una fábrica de cerveza. Se midieron los potenciales de producción de biogás de los desechos de pan, los desechos de la cervecería, tres tipos diferentes de desechos de pescado y de los ensilajes preparados con desechos de pescado. Para predecir el rendimiento de metano utilizaron un modelo de cinética de primer orden y el modelo de Gompertz modificado. El rendimiento en biogás y metano de los ensilajes que obtuvieron con desechos de pescado después de 96 días fue de 671-763 mL/g S.V. y 441-482 mL/g S.V. respectivamente. También calcularon los tiempos de digestión técnicos (T80-90) para los ensilajes de desechos de pescado en 21 a 23.8 días y 40.5 a 52.8 días, por lo que proponen un tiempo de retención hidráulica mayor de 41 a 53 días para la digestión continua de ensilajes de pescado.

A fin de conseguir el mejoramiento de la digestibilidad anaerobia de desechos de pescado y la producción de biogás a través de los mismos, Mshandet *et al.,* (2004) estudiaron la co-digestión por lotes de pulpa de sisal y desechos de pescado, así como en mezclas de ambos en diferentes proporciones. Los rendimientos de metano que obtuvieron de la pulpa de sisal y de los desechos de pescado solos fueron 0.32 y 0.39 m^3 CH_4/kg sólidos volátiles respectivamente, en experimentos con 5% de sólidos totales; en co-digestión a 16.6% de S.T. con el 33% de desechos de pescado y 67% de pulpa de sisal, obtuvieron un rendimiento de metano de 0.62 m^3 CH_4/kg S.V. añadido. Los autores encontraron que con la co-digestión de los residuos utilizados se registró un aumento de 59-94% en el rendimiento de metano en comparación con los obtenidos a partir de los desechos por separado.

III. JUSTIFICACIÓN

Existe poca información acerca de las fuentes de inóculo disponibles en las inmediaciones de ciudades costeras, así como de sustratos potencialmente utilizables para la obtención de metano por vía anaerobia. En los antecedentes presentados en éste estudio y en diversos artículos disponibles en la bibliografía referente al tema, se puede constatar que para la obtención de metano por vía anaerobia se utilizan como inóculos, lodos activados provenientes de digestores anaerobios en funcionamiento ((Eiroa *et al*. (2012), Tomczak-Wandzely y Levlin (2012), López Dávila *et al.,* (2013)). Sin embargo, no siempre se cuenta con una fuente de inóculos adecuada para digestión anaerobia, por lo que es necesario evaluar los materiales orgánicos que pudieran funcionar como inóculos potenciales y que se encuentren disponibles. Además es necesario conocer su potencial metanogénico, expresado como su capacidad generación de gas metano a partir de diferentes sustratos disponibles, como lo son desechos de actividades pesqueras y acuícolas. Asimismo, es necesario proponer un uso alterno para dichos materiales orgánicos, así como para los desechos de la pesca y la acuacultura y evitar así, que sean dispuestos de forma inadecuada y provoquen daños al ambiente. Al responder éstas interrogantes se sentarán precedentes para estudios posteriores que permitan optimizar la producción de biocombustibles a partir de residuos generados en las zonas costeras de nuestro país.

IV. HIPÓTESIS

1. El contenido de S.V. en un estiércol indica mayor cantidad de bacterias, por lo que, con base en su análisis, se espera que el estiércol de pollo presente mayor actividad metanogénica específica comparado contra estiércol de vaca y cerdo.

2. La mezcla compuesta por vísceras y desechos de fileteado presenten un mayor potencial metanogénico, comparada con las mezclas compuestas con el lodo producido en la industria pesquera.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar las principales fuentes de inóculo (estiércol de vaca, pollo y cerdo) y sustratos pesqueros (vísceras y desechos de fileteado de pescado, lodos residuales de tratamiento de aguas de empresas de giro pesquero) para digestión anaerobia disponibles en Mazatlán Sinaloa.

5.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar la actividad metanogénica especifica de los estiércoles vaca, cerdo y pollo.
2. Evaluar el Potencial Metanogénico de las mezclas para digestión preparadas con Vísceras y desechos de fileteado de pescado, Lodos primario proveniente de la P.T.A.R. de Maz Industrial y Alimentos Kay, utilizando el inoculo con mayor Actividad Metanogénica Específica.

VI. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en Mazatlán Sinaloa en las instalaciones del Laboratorio de Hidrología en el Instituto Tecnológico de Mazatlán. Se construyó un sistema de digestión compuesto por 30 matraces digestores tipo batch, con volumen total de 250 mL y volumen de operación de 200 mL.

El sistema de medición de biogás/metano se construyó utilizando probetas de 500 ml cada una y equipados con trampa de CO_2 (El contenido de la trampa de fue Hidróxido de Sodio 1 N). El sistema era capaz de realizar 60 mediciones simultáneas.

Figura 2.- Vista general de gasómetros instalados

Como control de temperatura se utilizaron dos baños termostáticos, uno Gallenkamp modelo BKS-300-030wy otro VWR ScientificProducts modelo 1227, en los cuales se colocaron los matraces con la mezcla para digestión.

Para probar el sistema de digestión y medición se realizó una serie de experimentos preliminares, los cuales contribuyeron a establecer parámetros de

operación como la temperatura, la cual se estableció 45 ºC con objeto de favorecer la actividad bacteriana, ya que los estiércoles no se consideran lodos anaerobios activos.

Posteriormente se realizó una verificación preliminar del desempeño de los estiércoles propuestos (vaca, cerdo y pollo) como inóculos en este estudio, con el fin de comprobar que las condiciones de experimentación establecidas fueran las adecuadas para la producción de biogás. Los ensayos se realizaron en matraz erlenmeyer de 250 mL utilizando un volumen efectivo de 200 mL. Los inóculos se ajustaron a 5 g/L S.V. y se colocaron en cada matraz; como sustrato para producción de biogás se añadió Acetato de Sodio 20 g/L y el resto del volumen se completó con agua destilada, cada experimento se realizó por decuplicado.

Se siguieron las recomendaciones establecidas en la bibliografía para el montaje de sistemas experimentales de AME, sin embargo no se presentó producción de biogás, mediante la técnica de desplazamiento de líquido NaOH 2 % (Torres & Pérez, 2010).

Buscando la razón por la cual los estiércoles probados no producían biogás, se encontró que los gasómetros estaban sobredimensionados para la cantidad de biogás que se generaría por cada digestor, es decir, había demasiada distancia entre el digestor y el dispositivo de medición, esto representaba un volumen considerable, lo que ocasionó que el sistema perdiera sensibilidad, además que los estiércoles no tienen la misma actividad metanogénica que un inóculo proveniente un digestor anaerobio operativo.Por lo anterior se rediseñó el dispositivo experimental de acuerdo a la cantidad de biogás que se esperaba producir diariamente, disminuyendo su tamaño y la distancia entre las unidades que lo conforman (digestor, trampa de CO_2 y gasómetro), renombrándose como Unidad Integral de Digestión (U.I.D.). El dispositivo UID tiene el mismo principio de funcionamiento que el sistema propuesto por Torres & Pérez 2010 (*Figura 3*), el cual es el comúnmente utilizado para ensayos de A.M.E. y P.M., la diferencia de U.I.D. con el sistema propuesto por los anteriores radica en el

tamaño y adecuaciones para las condiciones de experimentación particulares de esta investigación; se separó la trampa de CO_2 del sistema de desplazamiento de líquido, utilizando además NaOH 1 N, en lugar de NaOH 2% como sugieren dichos autores, el arreglo experimental se representa en la *Figura 3*.

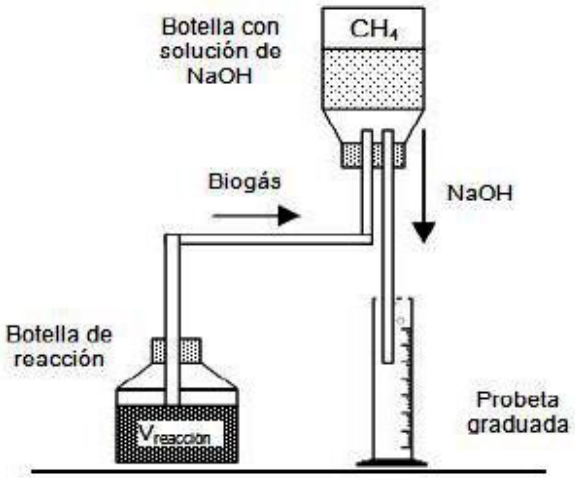


Figura 3.- Montaje experimental básico para Potencial metanogénico(Torres & Pérez, 2010)

Figura 4.-Esquema de U.I.D. y la conexión de sus componentes

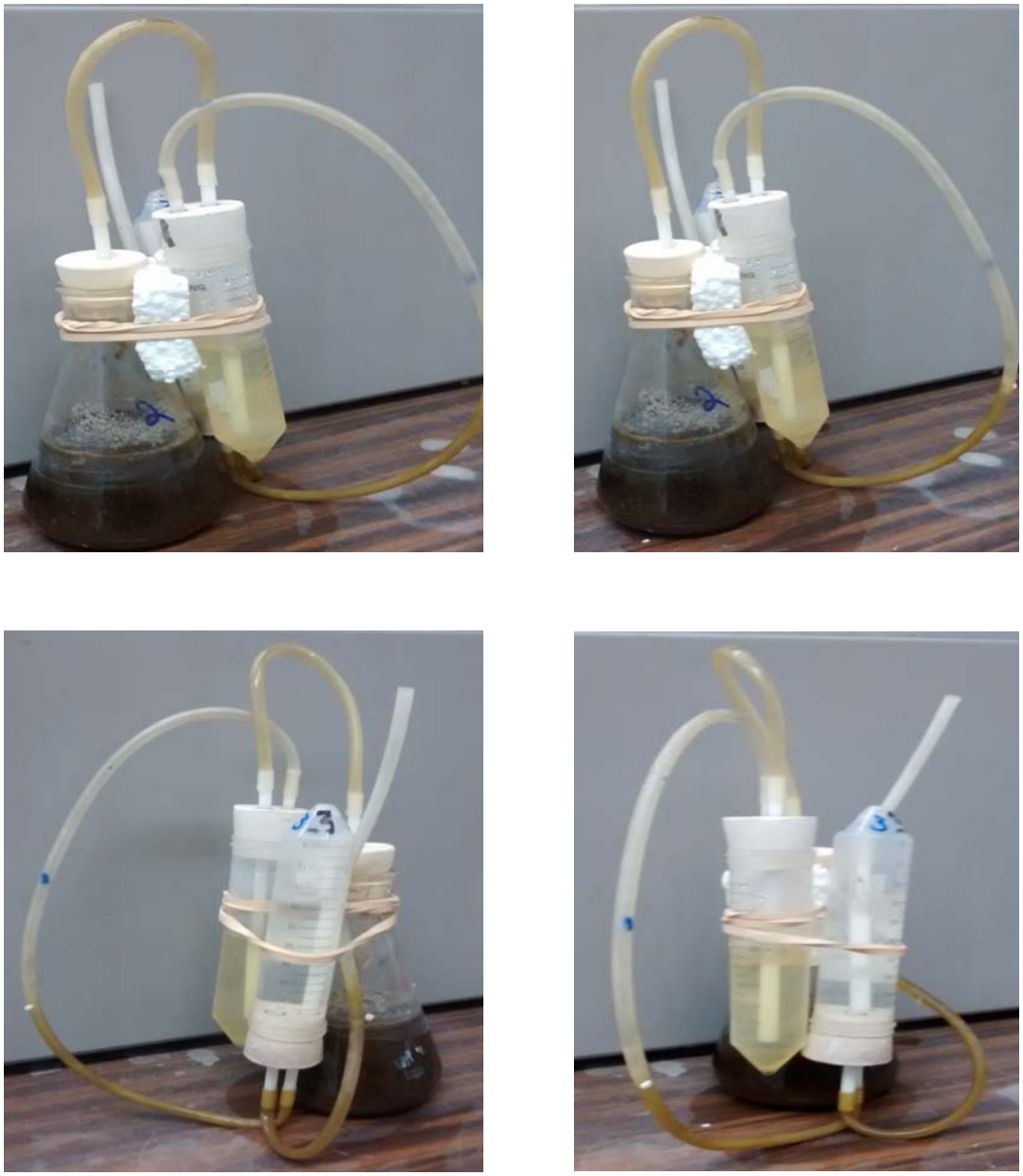


Figura 5.- Vista general de U.I.D. y sus componentes en modo de operación

6.1. Condiciones experimentales actividad metanogénica específica

Los ensayos se realizaron en matraces erlenmeyer de 250 mL utilizando un volumen efectivo de 200 mL. La concentración de S.V. de los inóculos se incrementó a 15 g S.V./matraz, equivalente a 75 g S.V./L, con base en los resultados de los experimentos preliminares.

Los diferentes estiércoles (vaca, cerdo y pollo) se cortaron y homogenizaron hasta un tamaño de partícula menor a 5 mm utilizando un procesador de alimentos Waring WSB50 (Shanmugam & Horan, 2008; Hutñan *et al*, 1999; Belmonte *et al*, 2011).

Se colocó la cantidad correspondiente de estiércol en cada matraz para alcanzar 15 g S.V., (83 g de estiércol de vaca, 52 de estiércol de cerdo y 34 de estiércol de gallina; cantidad variable de acuerdo a su contenido en S.V.).

Se añadió 25 ml de solución de acetato de sodio a una concentración de 120 g/L a cada matraz, equivalentes a 3 g/acetato de sodio/matraz. El resto del volumen se completó usando agua destilada. Posteriormente, los matraces con el material a digerir se colocaron en los baños maría a 45 ºC durante 20 días de experimento. Cada experimento se realizó por decuplicado incluyendo un tratamiento control utilizando solo acetato de sodio y agua destilada.

Se realizaron lecturas de producción de biogás diariamente en la UID a fin de registrar el progreso de la generación de biogás, determinar su tasa de producción, así como su promedio. La actividad metanogénica se determinó como la máxima tasa de producción de metano, expresada como los mililitros de CH_4 producidos por gramo de S.V. en el inóculo: A.M.E.= mL CH_4/ g. S.V. en inóculo

6.2. Metodología objetivo 2.

6.2.1. Condiciones experimentales potencial metanogénico.

Para este objetivo se utilizaron tres tipos de sustratos: 1) Lodo de elaboración de alimentos pesqueros, 2) lodo residual de elaboración de harina de pescado y 3) vísceras de fileteado de pescado como sustratos para conocer su potencial metanogénicoutilizando estiércol de pollo como inóculo (Se eligió el estiércol de pollo al ser el estiércol con mayor actividad metanogénica específica de los analizados en este estudio).

El lodo de elaboración de alimentos pesqueros (1) fue obtenido de Alimentos Kay, empresa localizada en la Colonia Jesús García en Mazatlán Sinaloa (Empresa 1), tomado directamente de la planta de tratamiento de agua, exactamente el sobrenadante del sedimentador, después del proceso de coagulación-floculación, en el cual utilizan dos polímeros, uno catiónico y otro aniónico.

El lodo de elaboración de harina de pescado (2) fue obtenido de Maz Industrial, empresa localizada en la Colonia Urías en Mazatlán Sinaloa (Empresa 2) fue tomado el sobrenadante del sistema de flotación de aire disuelto (DAFT por sus siglas en inglés), también procedente de un sistema de coagulación-floculación, en el cual se utilizan exactamente los mismos productos coagulantes y floculantes que en la Empresa 1.

Las vísceras de fileteado (3) fueron obtenidas del Embarcadero de la Isla de la Piedra, localizado en la Av. Emilio Barragán en Mazatlán Sinaloa, procedentes del eviscerado y fileteado que los pescadores y expendedores de pescado realizan en el tianguis pesquero localizado en el sitio

Los sustratos se cortaron hasta un tamaño de partícula menor a 5 mm (Shanmugam & Horan, 2008) y se homogeneizaron utilizando un procesador de alimentos Waring WSB50. El pH de la solución de cada matraz fue ajustado a 7 ± 0.1 utilizando ácido clorhídrico HCl o NaOH (Hutñan *et al*, 1999; Belmonte *et*

al., 2011). Posteriormente, los matraces con el material a digerir se colocaron en los baños maría a 45 ºC durante 20 días de experimento.

6.3. Composición del biogás producido.

Para conocer la composición del biogás generado en cada etapa de los experimentos, se prepararon unidades de digestión adicionales de 1 L cada una, con las mezclas utilizadas. No se utilizó trampa de CO_2, con el fin de identificar y cuantificar todos los gases generados de la digestión. El biogás se almacenó en botellas de Pet de 600 mL selladas herméticamente hasta su respectiva medición.

Figura 6.- Montaje experimental de mezclas para medición de la composición de biogás

Las mediciones se realizaron en un analizador de gases Landtec Biogas 5000, en el Laboratorio de Ingeniería Química y Bioquímica de la División de

Posgrado en el Instituto Tecnológico de Durango, en la ciudad de Durango, Durango.

Figura 7.- Analizador de biogás Landtec Biogas 5000 en funcionamiento.

6.4. Análisis Estadístico de la Actividad Metanogénica Específica entre los inóculos (Estiércol de Vaca, Cerdo y Pollo).

Los resultados de producción metanogénica específica después de 456 horas de digestión, utilizando estiércol de vaca, cerdo y pollo como inóculo, se sometieron a un análisis estadístico de rangos de Kruskal-Wallis a fin de comprobar las diferencias existentes entre ellos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Actividad metanogénica específica

7.1.1. Actividad metanogénica específica estiércol de vaca

En la figura 8 se muestra el comportamiento general de la Actividad Metanogénica Específica, utilizando estiércol de vaca como inóculo y Acetato de Sodio como sustrato. Se muestra la fluctuación en la producción acumulada de metano durante 456 horas. En dicha gráfica se puede apreciar un punto discontinuo en el gráfico alrededor de las 100 horas de experimento, esto fue debido a un fallo general en el suministro de energía eléctrica, por lo que ese punto se desconectó el sistema de medición del sistema de digestión y no se registró lectura de producción de metano.

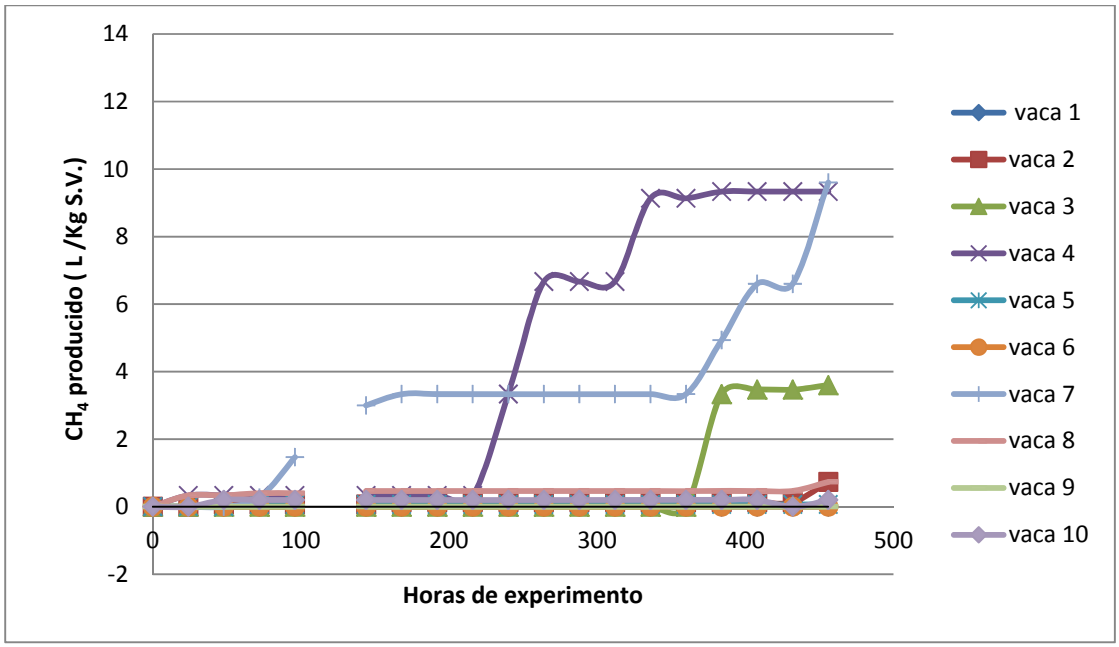


Figura 8.Metanogénesis acumulada (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de vaca como inóculo, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números 1-10 fueron asignados meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente de dicha réplica en el experimento.

El comportamiento general de la producción de biogás en las 10 réplicas realizadas fue muy similar, siendo del orden de 0 a 1 L CH_4/ Kg S.V., sin embargo algunos matraces alcanzaron valores mayores, de **7.3 hasta 9.3 L CH_4/ Kg S.V.** Esto ocurrió entre las 200 y 400 horas de experimentación; no obstante su ocurrencia fue del 30%, lo que indica una menor probabilidad de obtener producción de metano de ese orden respecto al resto de matraces que tuvieron una producción menor.

7.1.2. Actividad metanogénica específica estiércol de cerdo

El comportamiento general de la producción de biogás en 6 de las 10 réplicas realizadas fue similar, del orden de 0 a 1 L CH_4/kg S.V., sin embargo 4 matraces alcanzaron valores mayores, de **3.3 hasta 13 L CH_4/kg S.V.** (ver figura 9)**,** entre las 60 y 450 horas de experimento; la ocurrencia de valores altos fue mayor en las mezclas de cerdo (40%), comparado con las mezclas de estiércol de vaca (30%), lo cual aparentemente indica mayor probabilidad de obtener producción de metano utilizando estiércol de cerdo como inóculo respecto al estiércol de vaca (Figura 9).

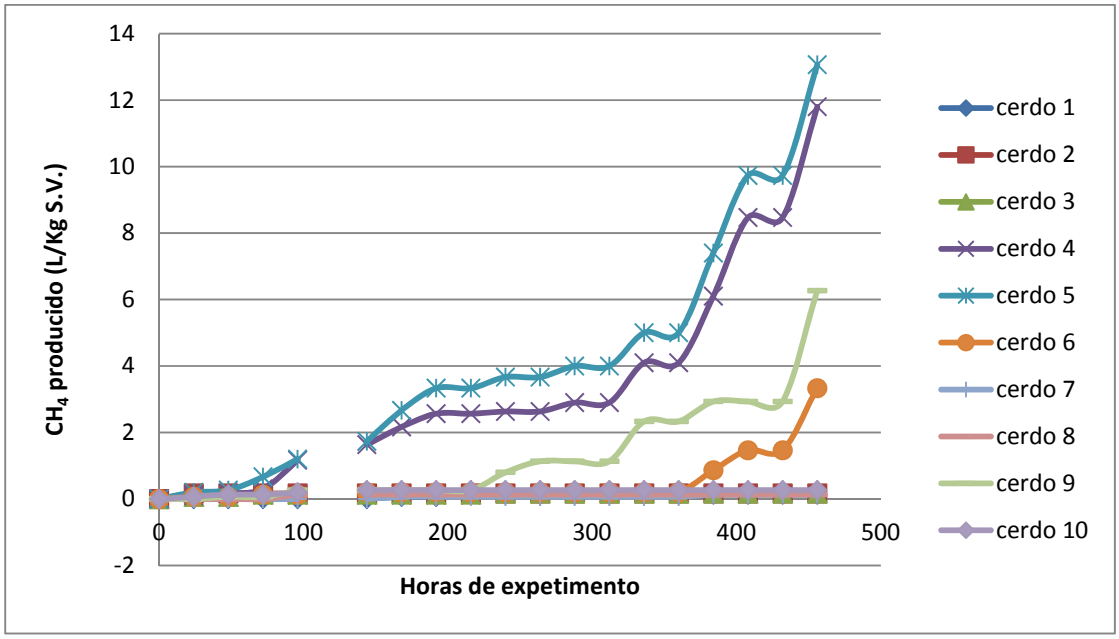


Figura 9.Metanogénesis acumulada (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de cerdo como inóculo, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números 1-10 fueron asignados meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente de dicha réplica en el experimento.

Además, basado en dicho comportamiento, al usar el estiércol de cerdo como inóculo, se observa una producción de metano más estable y continuo comparando con el estiércol de vaca. Diversos autores coinciden con los

resultados aquí mostrados, Torres *et al.,* (2007) también encontraron un comportamiento similar, es decir, valores de producción de metano superiores en estiércol de cerdo comparado con estiércol de vaca, sin embargo estadísticamente no presentan diferencias significativas.

7.1.3. Actividad metanogénica específica estiércol de pollo

La producción de biogás en 5 de las 10 réplicas realizadas fue similar, del orden de 0 a 2,3 L CH_4/g S.V. 5 matraces alcanzaron valores mayores, de 7,2 hasta 14,3 L CH_4/kg S.V.(ver Figura 12), esto entre las 48 y 150 horas de experimento; la ocurrencia de valores altos fue mayor en las mezclas de pollo (50%), comparado con las mezclas de estiércol de vaca (30%) y cerdo (40%), lo que aparentemente indica mayor probabilidad de producción de metano utilizando estiércol de pollo como inóculo (Figura 10).

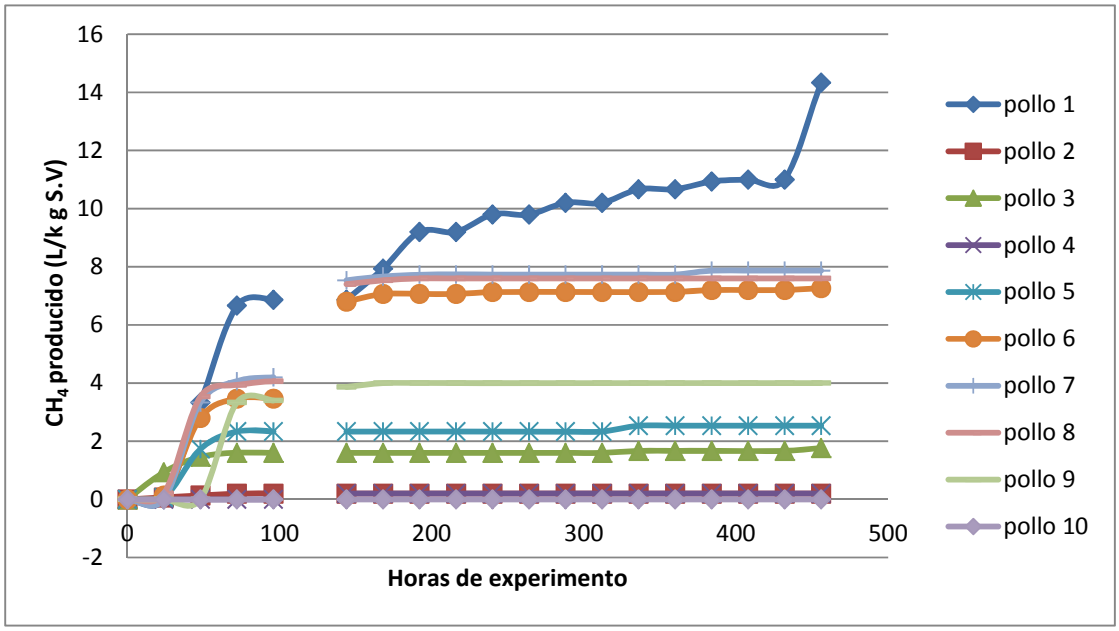


Figura 10. Metanogénesis acumulada (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de pollo como inóculo, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números 1-10 fueron asignados meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente de dicha réplica en el experimento.

Además, basado en tal comportamiento, al usar el estiércol de pollo como inóculo, se observa una producción de metano más estable y continua comparando con el estiércol de vaca y cerdo, al comparar los tres inóculos se puede constatar que el estiércol de pollo tiene mayor cantidad de S.V. por gramo de materia seca, por lo que indirectamente contiene mayor cantidad de bacterias y tiene mayor capacidad de producción de biogás (Qamaruz, 2010, Eiroa *et al.*, 2012), además de que se alcanza la fase lineal de producción en menor tiempo, detalle que en condiciones de experimentación a nivel piloto o a escala mayor resulta beneficioso y potencialmente deseable, ya que representa un Tiempo de Retorno de Inversión menor.

Algunos autores reportan valores de producción de metano para estiércol de pollo, Karaalp *et al.,* (2013), obtuvieron mayor producción de metano que la reportada en este estudio, siendo ésta de hasta 75 litros de biogás por kilogramo de estiércol, cabe señalar que el reactor que utilizaron contaba con agitación continua, lo que incrementa significativamente la producción metanogénica al asegurar mejor contacto inóculo sustrato. Además que dicho reactor fue alimentado de forma continua, contrario a las condiciones en éste estudio, en que el tipo de operación fue por lotes (tipo de bioproceso en el cual no se suministra sustrato de manera continua, es decir se inicia el proceso cada vez que se carga el reactor y se vacía al terminar) operación y los reactores no contaban con agitación incorporada, la cual es más eficiente que la que se tuvo en éste estudio. Además, es importante aclarar que en éste estudio no se utilizó inóculo activo además del estiércol como lo utilizaron los anteriores autores, por lo que se puede llegar a sobrecargar el sistema y obtener rendimientos de metano menores (Lazor *et al*., 2010).

Oyewole (2010) también difiere en valores de producción, reportan 72.2 mL por kg de sólidos en el inóculo como materia seca, que representa una producción baja si comparamos con lo obtenido por Karaalp *et al.,* (2013). Sin embargo, resulta alta respecto a lo obtenido en el presente trabajo, debido a que Oyewole (2010) maneja proporciones de inóculo de 63 % comparada con 16.5 a 41.5 % (dependiendo de cada inóculo probado) de este estudio. Por su parte Costa *et al.,* (2011) obtuvo 145 L CH_4/ Kg S.V. precedido de un tratamiento bioquímico y biológico, lo que coadyuva al proceso de producción de metano y estimula su producción.

7.2. Actividad Metanogénica Específica entre los inóculos (Estiércol de Vaca, Cerdo y Pollo).

Se encontró que las diferencias existentes entre los estiércoles no es suficientemente grande como para descartarla posibilidad de que dicha

diferencia sea debido a la variabilidad del muestreo aleatorio (P = 0.359) (Tabla 1).

Tabla 1.- Resultado del Análisis de rangos de Kruskal-Wallis para la producción metanogénica específica (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$) después de 456 horas de digestión, utilizando estiércol de vaca, cerdo y pollo como inóculo.

Inóculo	n	Mediana	25%	75%
Vaca	10	0.467[a]	0.000	3.600
Cerdo	10	0.217[a]	0.133	6.267
Pollo	10	3.267[a]	0.200	7.600

H = 2.050 con 2 grados de libertad. (P = 0.359)
H es el estadístico que utiliza la prueba de Kruskall Wallis.
Letras diferentes como superíndices en la columna de la mediana, denotan diferencias estadísticamente significativas.

Los inóculos analizados (vaca, cerdo y pollo) alcanzaron valores máximos de actividad metanogénica específica de 9.3, 13 y 14.3 L CH_4/ Kg S.V. respectivamente, al término de 456 horas de digestión. Sin embargo si se analizan los gráficos de comportamiento general de cada uno de los inóculos se puede detectar que los máximos de producción metanogénica específica de cada inóculo ocurren a distintos tiempo de digestión, siendo estiércol de pollo el que requiere de menor tiempo para alcanzar dicho máximo. Para comprobar lo anterior, se realizaron Análisis de rangos de Kruskal-Wallis a diferentes tiempos de digestión: 48, 96, 192, 336, 408 y 456, siendo éstos los tiempos en los cuales se observan picos de producción en los tres inóculos utilizados (ver Figuras 8 a 13).

En la Tabla 2 se muestran las medianas de producción de cada inóculo, y se indica además, los tiempos en los cuales la producción metanogénica es estadísticamente significativa entre los estiércoles utilizados.

Tabla 2.-Análisis de rangos de Kruskal-Wallis para la mediana de la producción metanogénica específica (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$) comparación entre estiércol de vaca, cerdo y pollo.

	Tiempo de digestión (h)					
Inóculo	**48**	**96**	**192**	**336**	**408**	**456**
Vaca	0.0000 [a]	0.0667 [a]	0.1 [a]	0.1 [a]	0.167 [a]	0.467 [a]
Cerdo	0.0667 [a]	0.150 [a]	0.183 [a]	0.183 [a]	0.217 [a]	0.217 [a]
Pollo	1.6000 [a]	**2.867[b]**	**3.167[b]**	3.267[a]	3.267[a]	3.267[a]

H es el estadístico que utiliza la prueba de Kruskall Wallis.
Letras diferentes como superíndices en las columnas denotan diferencias estadísticamente significativas, donde a<b.

En la Tabla 2 se puede corroborar que existe diferencias estadísticamente significativas entre la producción metanogénica de estiércol de pollo comparado con estiércol de vaca y cerdo entre 96 y 192 horas de digestión (véase valores a las 96 y 192 horas); nótese que solo se encontraron diferencias entre estiércol de pollo comparado estiércol de vaca y cerdo, siendo en ambos casos, estiércol de pollo quien presenta valores de mediana superiores (ver Tabla 3). A partir de 336 y hasta 456 horas de digestión no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres inóculos, lo que sugiere un comportamiento similar entre estiércol de vaca y cerdo durante todo el tiempo de digestión de este estudio, ambos alcanzaron producciones de metano estadísticamente similares. Este comportamiento coincide con Torres *et al.,* (2007), quienes afirman que la producción de metano con estiércol de vaca y cerdo no varía significativamente. Sin embargo, aunque en el presente estudio el estiércol de pollo alcanza una producción similar a los anteriores (Tabla 2) y lo hace a partir de un máximo de 192 horas, Esto significa un ahorro de tiempo de alrededor de 60% respecto a los estiércoles de vaca y cerdo y sugiriendo el rápido agotamiento del sustrato (Angelidaki *et al.,* (2009).

Karaalp *et al.,* (2013), también obtuvo tiempos de digestión relativamente rápidos utilizando estiércol de pollo como inóculo, por lo que coincide con los resultados reportados en el presente estudio. Dicho autor reporta tiempos de digestión del orden de 7 a 15 días (168 a 360 horas), no obstante también reportan que puede demorar hasta 35 días (840 horas) y presentar un retraso en el inicio de producción metanogénica. Esto se atribuye principalmente a un alto porcentaje de sólidos en el sustrato (mayor cantidad de materia orgánica para digestión) y a la toxicidad ocasionada por el alto contenido en amonio en el estiércol de pollo utilizado. Lo que conlleva a una aclimatación de la comunidad bacteriana. En el presente estudio, aparentemente no se presentó toxicidad ni inhibición, ya que se registró producción de metano a menor tiempo de digestión. Por su parte Oyewole (2010) reporta tiempo de digestión de 18 días utilizando estiércol de pollo, semejante lo reportado en este estudio, sin embargo, al igual que Karaalp *et al.,* (2013), también se presentó un retraso en el inicio de la producción metanogénica. La posible explicación de que ambos autores hayan presentado tiempos de arranque más lentos que los que se tuvieron en el presente estudio, reside en la temperatura de digestión utilizada, ya que utilizaron de 28 a 33ºC, comparada con 37ºC respectivamente, lo que ocasiona que la digestión anaerobia se realice con menor velocidad (Oyewole 2010), mientras que en éste estudio las digestiones se realizaron a 45 ºC y no se presentó dicho inconveniente.

Los resultado de análisis de rangos Kruskall Wallis a 48, 96, 192, 336. 408 y 456 horas entre la producción metanogénica de estiércol de vaca, cerdo y pollo; se presentan en las Tablas 3 a 10, en las que se puede observar el comportamiento seguido por los tres inóculos y las diferencias encontradas entre los mismos.

Tabla 3.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 48 horas.

Grupo	25%	75%	
Vaca	0	0	0,2
Cerdo	0,0667	0	0,167
Pollo	1,6	0	3,333

H = 4,858 con dos grados de libertad. (P = 0,088)

En la Tabla 3 se observa que las diferencias en los valores de mediana entre tratamientos a las 48 horas no son suficientemente grandes como para excluir la posibilidad que dichas diferencias sean debido a la variabilidad del muestreo. (P = 0,088)

Tabla 4.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 96 horas

Grupo	Mediana	25%	75%
Vaca	0,0667	0	0,333
Cerdo	0,15	0,133	0,267
Pollo	2,867	0,2	4,067

H = 7,170 con dos grados de libertad. (P = 0,028)

En la Tabla 4 se observa que las diferencias en los valores de mediana entre los tratamientos son mayores que lo que se esperaría al azar; existe diferencia estadísticamente significativa (P = 0,028)

Para aislar el grupo o grupos que difieren de los otros se utiliza un análisis de comparación múltiple, el cual se presenta en la Tabla 5**.**

Tabla 5.- Análisis de comparación múltiple (Tukey Test 96 horas):

Comparación	Dif de rangos	q	P<0,05
Pollo vs Vaca	99	3,556	Si
Pollo vs Cerdo	78	2,802	No
Cerdo vs Vaca1	21	0,754	No

En la Tabla 5 se observa que entre los inóculos analizados existe diferencia solo cuando se comparan estiércol de pollo y vaca, mientras que en las comparaciones entre vaca y cerdo, y pollo y cerdo no se aprecian diferencias a las 96 horas.

Tabla 6.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 192 horas

Grupo	Mediana	25%	75%
Vaca	0,1	0	0,333
Cerdo	0,183	0,133	0,267
Pollo	3,167	0,2	7,6

H = 7,874 con dos grados de libertad. (P = 0,020)

En la Tabla 6 se observa que las diferencias en los valores de mediana entre los tratamientos son mayores que lo que se esperaría al azar, por lo que se deduce que existe diferencia estadísticamente significativa (P = 0,020)

Para aislar el grupo o grupos que difieren de los otros se utiliza un análisis de comparación múltiple, el cual se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7.- Análisis de comparación múltiple (Tukey Test 192 horas):

Comparación	Dif de rangos	q	P<0,05
Pollo vs Vaca	108	3,879	Si
Pollo vs Cerdo	72	2,586	No
Cerdo vs Vaca	36	1,293	No

En la Tabla 7 se observa que, al igual que en la Tabla 5, solo existen diferencias entre la comparación de Estiércol de Pollo y Vaca, mientras que cuando se compara Pollo con cerdo y Cerdo con Vaca no se aprecian diferencias

Tabla 8.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 336 horas

Grupo	Mediana	25%	75%
Vaca1	0,1	0	0,467
Cerdo	0,183	0,133	2,333
Pollo	3,267	0,2	7,6

H = 5,965 con dos grados de libertad. (P = 0,051)

Las diferencias en los valores de mediana entre tratamientos no es suficientemente grande como para excluir la posibilidad que dichas diferencias sean debido a la variabilidad del muestreo (P = 0,051).

Tabla 9.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 408 horas

Grupo	Mediana	25%	75%
Col 1	0,167	0	3,467
Col 2	0,217	0,133	2,933
Col 3	3,267	0,2	7,6

H = 3,341 con dos grados de libertad. (P = 0,188)

Las diferencias en los valores de mediana entre tratamientos no es suficientemente grande como para excluir la posibilidad que dichas diferencias sean debido a la variabilidad del muestreo aleatorio (P = 0,188)

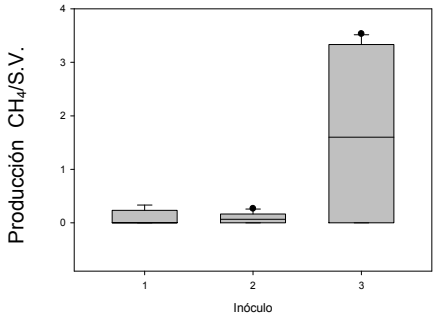
Tabla 10.- Análisis de rangos Kruskal-Wallis una vía 456 horas

Grupo	Mediana	25%	75%
Vaca	0,467	0	3,6
Cerdo	0,217	0,133	6,267
Pollo	3,267	0,2	7,6

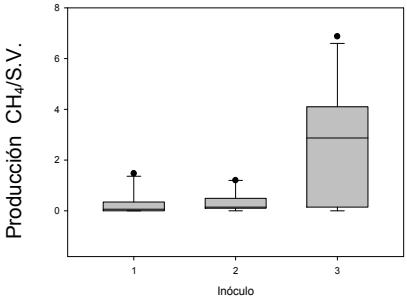
H = 2,050 con dos grados de libertad. (P = 0,359)

Las diferencias en los valores de mediana entre tratamientos no es suficientemente grande como para excluir la posibilidad que dichas diferencias sean debido a la variabilidad del muestreo aleatorio (P = 0,359).

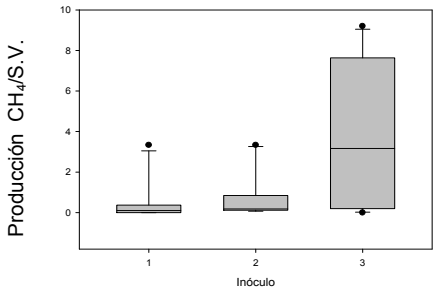
A continuación, en la Figura 11 se presentan los gráficos correspondientes al análisis por tiempos de digestión anteriormente mostrados, en los que se puede apreciar el comportamiento de los inóculos a través del tiempo.



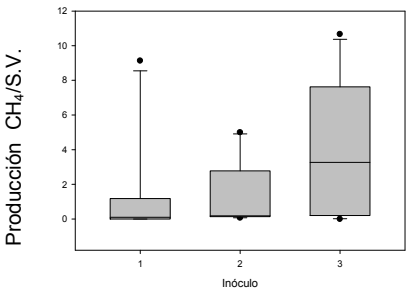
48 horas



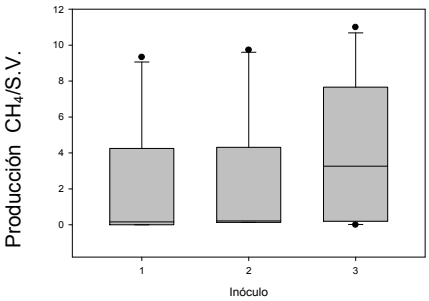
96 Horas



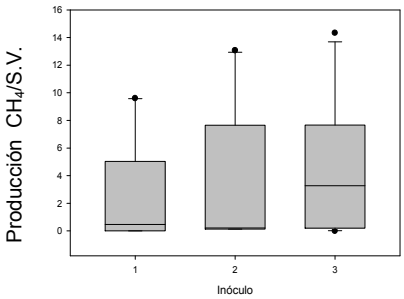
192 horas



336 horas



408 horas



458 horas

Figura 11.- Gráficos de producción de biogás de los inóculos a través del tiempo, en el eje de X se muestran los números 1, 2 y 3, correspondientes a Estiércol de Vaca, Cerdo y Pollo respectivamente, en el eje de Y la producción (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$)

Composición de biogás producido por con las mezclas de estiércoles de vaca, cerdo y pollo.

En la Tabla 11 se puede observar la Composición de biogás en las mezclas utilizadas para calcular la Actividad Metanogénica Específica.

Tabla 11.- Composición de biogás en las mezclas utilizadas para calcular la Actividad Metanogénica Específica

Inóculo + sustrato	**% Metano CH_4**	**% CO_2**	**% O_2**	**% Otros gases**	**Tiempo producción**
Vaca	36,3	17	4,7	42	4 días
Vaca + acetato	73,9	17,7	0,1	8,3	6 días
Cerdo	3,5	22	8,7	65,8	5 días
Cerdo + acetato	6,3	24,3	0,5	68,9	3 días
Pollo	33	16,1	9,4	41,5	2 días
Pollo + acetato	0,3	9,3	3,1	87,3	4 días

La composición de biogás generado por los diferentes inóculos presentó gran variación, siendo la mezcla Vaca+ Acetato de Sodio la que presentó mejor calidad de biogás al tener mayor porcentaje de metano que el resto de las mezclas analizadas (73,9 %). Mientras que la mezcla con el porcentaje más pobre resultó Pollo+ Acetato, contradiciendo lo expuesto en los en los que se afirma que la Mezcla de Pollo + Acetato de Sodio es la que más metano produce. Sin embargo es necesario aclarar que para las mediciones de composición de biogás no se utilizó trampa de NaOH, por lo que no hubo filtro alguno para los gases que allí se produjeran, por ejemplo CO_2, H_2S, H_2O y NO_x's y es probable que hayan sido cuantificados por el analizador de biogás.

Es decir, la caracterización de composición del biogás generado es independiente al volumen, puesto que en el procedimiento de medición se filtran los gases diferentes a metano que se producen por digestión anaerobia, hay que recordar que para los experimentos que se realizaron exprofeso para la caracterización de biogás se realizaron sin utilizar trampa de CO_2, lo cual puede generar confusión.

De los resultados mostrados en el apartado arriba mostrado, y para elegir un inóculo entre los tres estudiados, se debe realizar un análisis de disponibilidad de los mismos y la calidad que se requiera, tomando en cuenta los atributos encontrados en ellos (rápidos arranques de digestión, producción estable, buena calidad de biogás, etc.). Para efecto de ésta tesis se seguirá el protocolo establecido y se elige estiércol de pollo como inóculo para los experimentos posteriores con los sustratos propuestos, sin embargo es posible realizar una mezcla de inóculos

7.3. Potencial Metanogénico

7.3.1 Control

En la Figura 14 se puede observar el comportamiento general de las réplicas realizadas del experimento de digestión de estiércol de pollo utilizado como Control en la fase de Potencial Metanogénico. Se encuentran valores de producción de Metano desde 1.5 hasta14.3 L CH_4/Kg S.V., con una probabilidad de 40 % de encontrar valores mayor a 6L CH_4/Kg S.V.

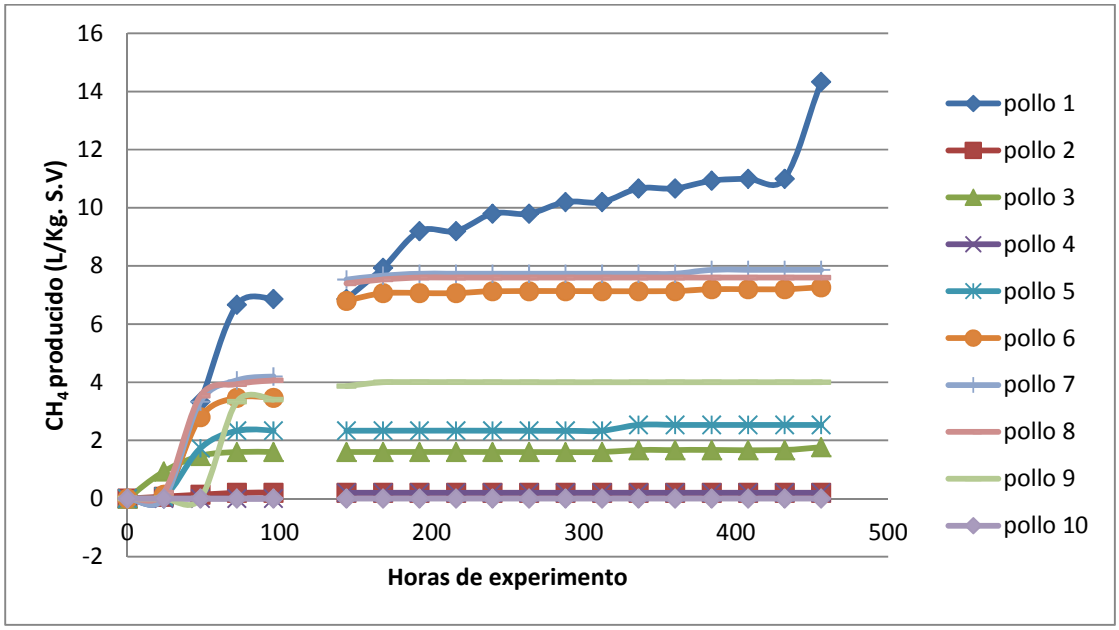


Figura 12.- Gráfica de Potencial metanogénico acumulado Control (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de pollo como inóculo, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números asignados son meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente en el experimento.

7.3.2. Sustrato Lodo Maz Industrial

En la Figura 16 se puede observar el comportamiento general de las réplicas realizadas del experimento de digestión de Lodo de Maz Industrial utilizando

estiércol de pollo como inóculo en la fase de Potencial Metanogénico. Se encuentran valores de producción de Metano desde 0, hasta 0.33 L CH_4/Kg S.V., con producción hasta las 48 horas aproximadamente, tiempo tras el cual no se registra producción. No obstante el experimento se prolongó hasta 456 horas.

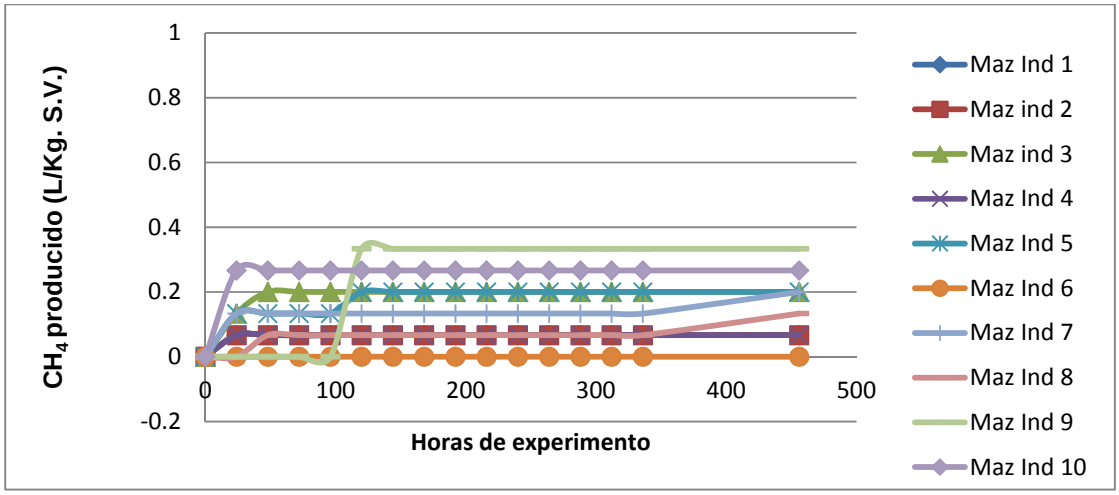


Figura 13.- Gráfico de Potencial Metanogénico acumulada (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de pollo como inóculo y Lodo de Maz Industrial como sustrato, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números asignados son meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente en el experimento

7.3.3. Sustrato Lodo Alimentos Kay

Se encuentran valores de producción de Metano desde 0, hasta 23.93 L CH_4/Kg S.V., con producción desde las 48 hasta las 250 horas aproximadamente, tiempo tras el cual prácticamente se ha registrado el total de producción. La producción se mostró estable alrededor de 3 a 9 L CH_4/Kg S.V., presentando además valores superiores, del orden de 17 a 24 L CH_4/Kg S.V.

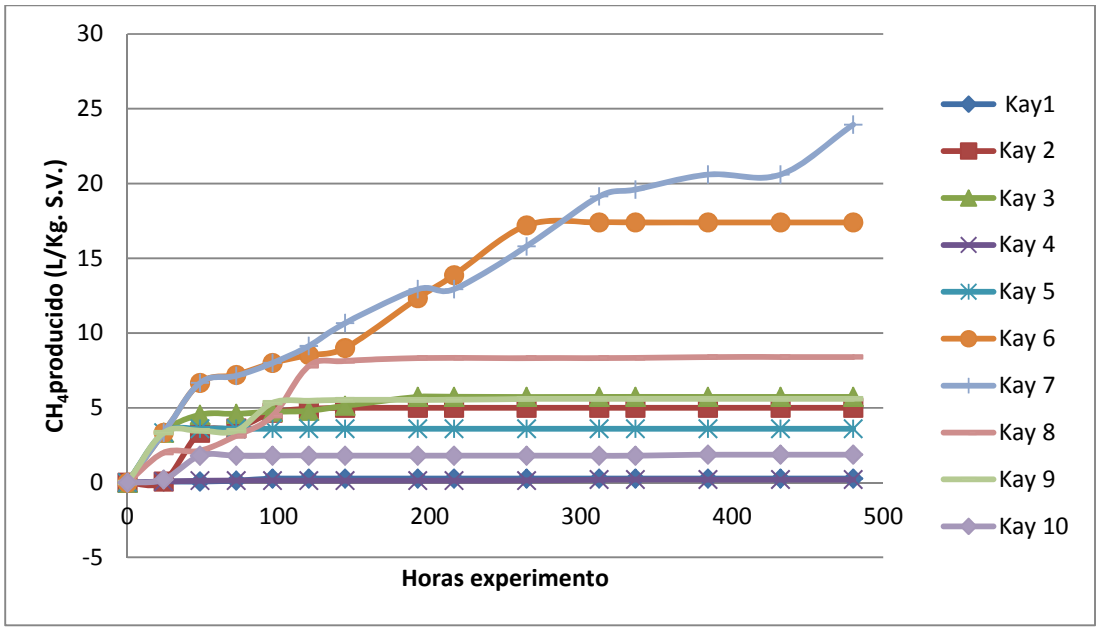


Figura 14.- Gráfico de Potencial Metanogénico acumulada (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de pollo como inóculo y Lodo de Alimentos Kay como sustrato, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números asignados son meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente en el experimento

7.3.4. Sustrato Vísceras y desechos de fileteado

En la Figura 20 se puede observar el comportamiento general de las réplicas realizadas del experimento de digestión de vísceras y desechos de fileteado utilizando estiércol de pollo como inóculo en la fase de Potencial Metanogénico. Se obtuvo producción de Metano en general por debajo de 5 L CH_4/Kg S.V., presentando valores pico de hasta 15.2 L CH_4/Kg S.V., con producción desde las 48 hasta las 150 horas aproximadamente, tiempo tras el cual prácticamente se ha registrado el total de producción.

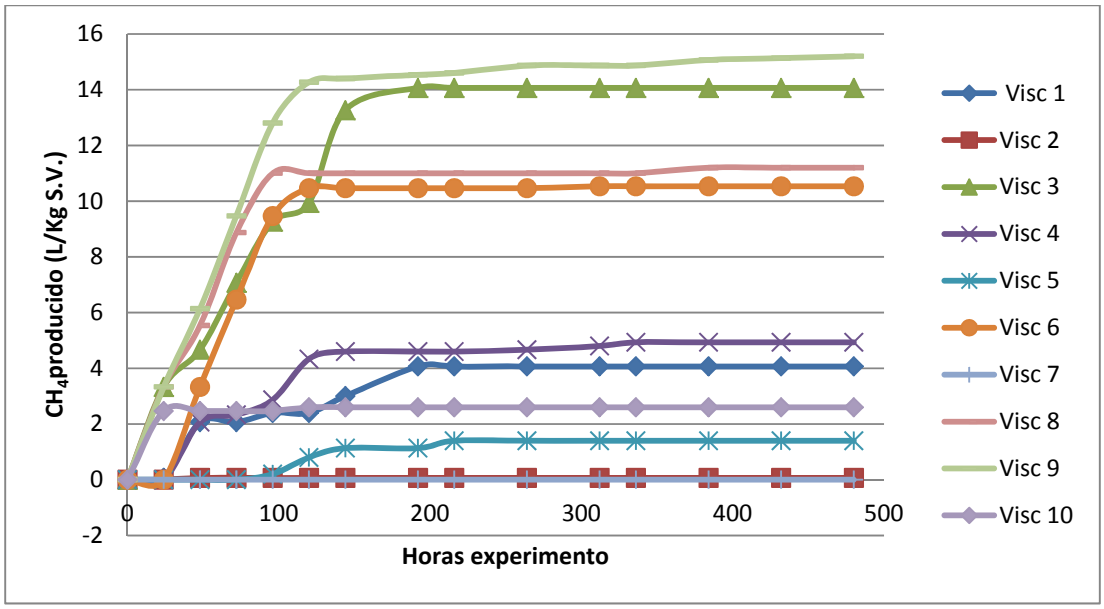


Figura 15.- Gráfico de Potencial Metanogénico acumulada (L_{CH_4} / $Kg_{S.V.}$), utilizando estiércol de pollo como inóculo y Vísceras y desechos de fileteado como sustrato, se muestra el comportamiento individual de cada matraz utilizado durante esta etapa del experimento. Los números asignados son meramente al azar y corresponden al matraz correspondiente de dicha réplica en el experimento

Tabla 12.- Análisis estadístico de resultados de potencial metanogénico de Lodo de Maz Industrial, Alimentos Kay y Vísceras y desechos de Fileteado

Grupo	Mediana	25%	75%
Control	3,267	0,2	7,6
MazInd	0,167	0,0667	0,2
Alim Kay	5,3	1,867	8,4
Vísceras	4,5	1,4	11,2

H = 12,999 con 3 grados de libertad. (P = 0,005)
Las diferencias en los valores de mediana entre los tratamientos son mayores que lo que se esperaría al azar; existe diferencia estadísticamente significativa (P = 0,005)

Para aislar el grupo o grupos que difieren de los otros se utiliza un análisis de comparación múltiple.

Tabla 13.- Análisis de comparación múltiple (Tukey Test):

Comparación	Dif de Rangos	q	P<0,05
A. Kay vs MazInd	172,5	4,666	Si
A Kay vs Control	47	1,271	No
A Kay vs Visceras	24,5	0,663	No
Visceras vs MazInd	148	4,003	Si
Visceras vs Control	22,5	0,609	No
Control vs MazInd	125,5	3,395	No

En la Tabla 13 se puede observar que existen diferencias en las comparaciones hechas entre los sustratos Alimentos Kay con Maz Industrial, así como en la comparación entre Vísceras y Maz Industrial, mientras que en el resto de comparaciones no existen diferencias significativas.

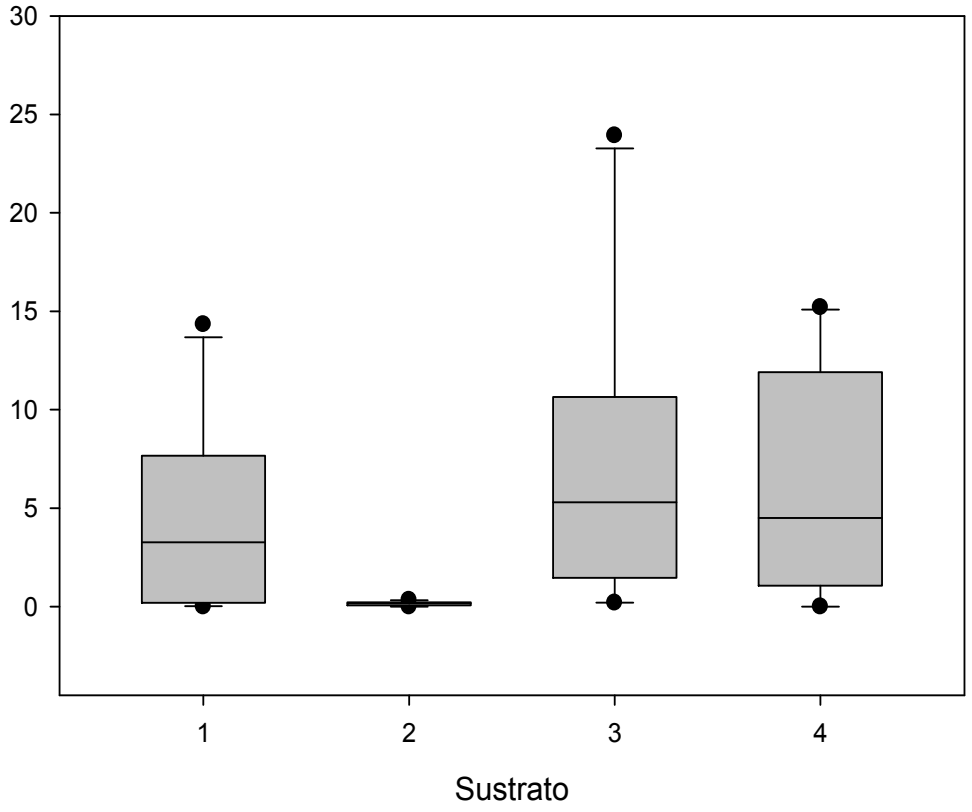


Figura 16.- Gráfico de cajas y bigotes de la comparación de sustratos a un tiempo de digestión de 456 horas. El eje de Y representa L CH4/Kg S.V. producidos.Los números 1,2,3 y 4 en el eje de X corresponden a Tratamiento Control, Lodo Maz Industrial, Lodo alimentos Kay y Vísceras y desechos de fileteado respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que basado en volumen de producción, el mejor sustrato para digestión anaerobia, fue el Lodo de Alimentos Kay (23.93 L CH_4/kg S.V.), precedido de vísceras y desechos de fileteado (15.2 L CH_4/kg S.V.); el sustrato con menor producción y prácticamente nula fue El Lodo de Maz Industrial (0.33 L CH_4/kg S.V.). Sin embargo, no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento control (14.3 L CH_4/kg S.V.), el cual incluso obtuvo una mediana de producción mayor y un

comportamiento general similar al de Vísceras y desechos de fileteado y Lodo de Alimentos Kay. Dicho lo anterior, se consideró el Tratamiento Control solamente con fines comparativos y no se restó su valor a la producción obtenida con cada sustrato.

Los tres sustratos estudiados provienen esencialmente de desechos de pescado, sin embargo la diferencia entre ellos es el grado de tratamiento o transformación antes de su uso como sustratos, el lodo de Maz industrial proviene de un proceso en el que los desechos de pescado han alcanzado un proceso de descomposición, al ser desecho de un proceso de elaboración de Harina de pescado para consumo animal. El lodo de Alimentos Kay proviene de la elaboración de alimentos para consumo humano. Lo que supone mayor frescura en el pescado que el Lodo de Maz Industrial. Por su parte, Vísceras y desechos de fileteado fueron frescos y sin tratamiento previo alguno, salvo la preparación estándar (molienda) que se realizó a los tres sustratos antes de su análisis. Lo anterior invariablemente afecta su composición, añade o elimina inhibidores y contribuye a la calidad para su empleo en digestión anaerobia, por lo que es de esperar que su desempeño en producción de biogás sea diferente entre sí (Eiroa *et al,* 2012).

Resultados similares a los del presente trabajo, han obtenido diferentes autores. Achu *et al.,* (2010), encontró que un pretratamiento al sustrato a digerir asegura una alta producción de metano. En su trabajo utilizó dos tratamiento, uno con y otro sin pretratamiento enzimático, encontrando que el desecho pre tratado produce mayor cantidad de metano, alcanzando una producción de 828 L CH_4/ Kg S.V., cifra muy superior a lo reportado en éste estudio, sin embargo, a diferencia de dichos autores, en éste trabajo no se utilizó lodo activado como inóculo, el cual es más activo que es estiércol (Eiroa *et al.,* 2012).

Por su parte Tomczak-Wandzel y Levlin (2012), también afirman que las enzimas ayudan al tratamiento de desechos de pescado, por lo que establecen

que las vísceras e intestinos son el mejor sustrato proveniente de un pez, lo que haría esperar que el sustrato de Vísceras y desechos de pescado obtuviera la mejor producción de metano. Sin embargo, de acuerdo a Achu *et al.,* (2010), también contienen una altos valores de grasa y proteína que deben ser controlados a niveles tolerables para que no resulten inhibitorios, lo cual en el presente estudio no fue posible por la configuración y tipo de reactor utilizado.

Krishna *et al.,* (2013), propone ensilaje y codigestión, con los cuales obtuvieron hasta 482 L CH_4/ Kg S.V. En el mismo sentido, Mshandet *et al.,* (2004), obtienen 390 L CH_4/ Kg S.V. y afirman que el uso de co sustratos aumenta hasta en 94 % el rendimiento en metano a partir de desechos de pescado como sustrato.

7.3.5. Composición de biogás

Como se muestra en la tabla 6, existe una clara diferencia entre los valores de metano alcanzados por las distintas muestras analizadas. La mezcla compuesta por estiércol de pollo + vísceras de pescado fue la que mayor producción de metano presentó, siendo ésta de 66 %, duplicando la cantidad de metano producido en la digestión de estiércol de pollo puro (33%), mientras que el nivel de CO_2 se mantuvo en valores bajos, del orden del 15-16 %. El aumento en porcentaje de metano puede ser atribuible a que además de la materia orgánica contenida en el estiércol, las bacterias metanogénicas tienen disponible la materia orgánica contenida en el sustrato (vísceras). Dichos resultados coinciden con los obtenidos por Tomczak-Wandzel (2013), quienes afirman que las vísceras de pescado son un buen sustrato para la digestión anaerobia, ya que favorecen la producción metanogénica gracias a las enzimas digestivas que contienen y que facilitan la fragmentación de las macromoléculas en moléculas más sencillas.

Tabla 14.- Composición de biogás producido en Análisis de Potencial Metanogénico.

Inóculo + sustrato	% CH_4	% CO_2	% O_2	% Otros gases	Tiempo producción
Pollo	33	16,1	9,4	41,5	2 días
Pollo+ Kay	0,3	89	3,3	7,4	4 días
Pollo + Maz Industrial	0,3	50,7	16	33	5 días
Pollo + Vísceras	66,4	15	6	12,6	3 días

Respecto a las dos mezclas restantes: Pollo + Alimentos Kay y Pollo + Maz Industrial, en ambas se obtuvo 0.3 % de metano (CH_4) en el biogás producido, siendo el nivel de CO_2 en ambas del 50 a 89%. Sin embargo en la mezcla de Maz Industrial se presenta un alto nivel de O_2, lo que provoca que sea menor la presencia de gases característicos de digestión anaerobia (CH_4, CO_2) y exista una alta concentración de otros gases (no caracterizados), identificados simplemente como “otros”. Se presume que lo anterior sea debido a que el oxígeno resulta ser un inhibidor de la digestión anaerobia (Qamaruz, 2010), por lo que las bacterias que desarrollan dicho proceso no son capaces de metabolizar los sustratos disponibles; cabe mencionar que los sustratos de ambas muestras provienen de un proceso de remoción de materia orgánica en el que se utiliza polímeros orgánicos como coagulantes y floculantes compuestos principalmente por policacrilamidas aniónicas y catiónicas, no obstante, cabe señalar que en Maz Industrial se utiliza una cantidad mayor de polímeros en el proceso de remoción debido a la naturaleza del agua residual y a que presentan altos niveles de grasa.

Se presume que la alta dosis de polímero es la razón por la cual la mezcla de Pollo+ Maz Industrial presenta alta concentración de O_2, debido a que los polímeros al tener contacto con la atmósfera forman una especie de espuma, la cual almacena aire y, al existir mayor cantidad de polímero, más abundante es la espuma formada y mayor concentración de aire existirá en la mezcla para

digestión, disminuyendo la actividad metanogénica y aumentando la concentración de O_2 en el gas generado.

7.4. Elección de mejor sustrato

Los sustratos que presentaron mejores características en cuanto a volumen de producción de metano fueron Lodo de Alimentos Kay y Vísceras y desechos de fileteado, sin embargo en cuanto a calidad del biogás generado, Vísceras y desechos de fileteado de pescado supera a Alimentos Kay (Cabe señalar que para los experimentos de composición de biogás no se siguieron las mismas condiciones que en los experimentos de digestión de sustratos al carecer de trampa de CO_2), además de presentar menor tiempo de producción. Una forma de eficientizar la producción es coadyuvar al proceso con la adición de enzimas directamente al reactor, lo que facilitaría la hidrólisis de las proteínas presentes en ellos y facilitaría la metanogénesis. Sin embargo, resulta necesario estudiar a fondo con técnicas de medición y caracterización más precisas, además de homogeneizar más los materiales a digerir y procurar así obtener la menor variabilidad posible. Aún así, los sustratos estudiados parecen ser sustratos adecuados para su digestión utilizando estiércol de pollo como sustrato.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los tres inóculos probados tienen la capacidad de alcanzar la misma producción cuando se estudian en las mismas condiciones experimentales.

2. Aún y cuando estadísticamente no se presentaron diferencias entre los estiércoles de vaca, cerdo y pollo utilizados como inóculos, el estiércol de pollo se propone como mejor inóculo debido a su rápida y más estable producción de biogás, por lo que no se rechaza la Hipótesis 1.

3. El lodo de Maz Industrial no es buen sustrato para la digestión anaerobia en las condiciones que se desarrollaron los experimentos presentados en este trabajo.

4. El lodo de Alimentos Kay y las Vísceras y desechos de fileteado de pescado resultan buenos sustratos para digestión anaerobia utilizando estiércol de pollo como inóculo.

5. El lodo de Maz Industrial, por sus características físicas requiere de pre tratamiento antes de ser utilizado como sustrato para digestión anaerobia, al menos en el tipo de reactor que se utilizó en éste estudio.

6. Ambos, Maz Industrial y Alimentos Kay podrían recibir pre tratamiento y tener una mayor producción de biogás en menor tiempo.

7. El sustrato compuesto por Vísceras y desechos de fileteado presenta una producción de biogás en menor tiempo respecto a los lodos de Maz Industrial y Alimentos Kay, por lo que no se rechaza

8. Los experimentos con estiércol presentaron una alta variabilidad, por lo que es necesario realizar un estudio de digestión más minucioso en el

que se revise la forma de inocular los matraces procurando que transcurra el menor tiempo posible entre la siembra de un reactor y otro y así evitar la estratificación del material a sembrar.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda estudiar la cinética de la formación de inóculos activos (lodos activados) a partir de estiércol.

2. Realizar un análisis más extensivo acerca de la composición del biogás generado en las distintas mezclas probadas en este trabajo. Además,

3. Es necesario evaluar el efecto de las distintas poblaciones bacterianas presentes en los estiércoles usados como inóculos, así como su caracterización metagenómica y selección para eficientizar el proceso de digestión anaerobia para los sustratos estudiados, a fin de realizar mezclas bacterianas específicas para digerir algún sustrato en particular.

4. Realizar los experimentos aquí presentados a una escala mayor y comparar su variabilidad con la presentada en éste trabajo.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Achu Nges Ivo, Mbatia Betty, Björnsson Lovisa, 2012, Improved utilization of fish waste by anaerobic digestion following omega-3 fatty acids extraction, Journal of Environmental Management 110 (2012) 159e165

Albalasmeh Ammar A., Asefaw Berhe Asmeret, Ghezzehei Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydrate Polymers 97 (2013) 253– 261

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. IWA Publishing 2009 Water Science Technology—WST | 59.5 | 2009.

APHA, AWWA and WEF, 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21 st ed, American Public Health Association, Washington, D.C.

Arvanitoyannis Ioannis S, Kassaveti Aikaterini, 2008, Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses, International Journal of Food Science and Technology 2008, 43, 726–745.

Bello Gil Daniel, Carrera Bocourt Emilia, Díaz Maqueira Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, núm. 2, mayo-agosto ISSN (Versión impresa): 0138-6204, 2006.

Belmonte Marisol, Hsieh Chia-Fang, Figueroa Cindy, Campos José Luis, Vidal Gladys. Effect of free ammonia nitrogen on the methanogenic activity of swine wastewater, Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, 2011.

Callaghan F.J, Wase D.A.J, Thayanithy K, Forster C.F, 1999, Co-digestion of waste organic solids: batch studies Bioresource Technology67 (1999) 117-122.

Eiroa M., Costa J.C, Alves M.M, Kennes C, Veiga M.C, 2012, Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste, Waste Management 32 (2012) 1347–1352.

Krishna Kafle Gopi, Hun Kim Sang, Ill Sung Kyung, 2013, Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of biochemical methane potential (BMP) and kinetics, Bioresource Technology 127 (2013) 326–336.

Hutñan M., Mrafková L., Drtil M., Derco J. Methanogenic and non methanogenic activity of granulated sludge in anaerobic baffled reactor. Chem. Papers 53 (6) 374|378, 1999.

Lazor, M., Hutnan, M., Sedlá cek, S., Kolesárová, N., Špalková, V.: Anaerobic co-digestion of poultry manure and waste kitchen oil, Editor: Markoš, J., In Proceedings of the 37th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, 1399–1406, 2010.

Marin-Batista Jose, Castro Liliana, Escalante Humberto. Efecto de la carga orgánica de la gallinaza de jaula en el potencial de biometanización. Colomb. Biotecnol. Vol. XVII No. 1 Junio 2015 18-23.

Mshandete Anthony, Kivaisi Amelia, Rubindamayugi Mugassa, Mattiasson Bo, 2004, Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes. Bioresource Technology 95 19–24.

Qamaruz Zaman Nastaein, 2010, The applicability of batch tests to assess biomethanation potential of organic waste and assess scale up to continuous reactor systems. Tesis para el grado de doctor en ingeniería ambiental,

University of Canterbury. New Zealand, obtenido de: http://ir.canterbury.ac.nz/handle/10092/4025.

Regueiro Leticia, Carballa Marta, Álvarez Juan A , Lema Juan M, 2012, Enhancedmethaneproductionfrompigmanureanaerobicdigestionusingfish and biodiesel wastes as co-substrates Bioresource Technology 123 (2012) 507–513

Samuel Tewelde, K.Eyalarasan, R. Radhamani, Kaliyaperumal Karthikeyan, 2012, Biogas production from co-digestion of brewery wastes and cattle dung, Int. J Latest Trends Agr. Food Sci. Vol-2 No 2 June 2012.

Secretaria De Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación. SAGARPA. Plantas procesadoras de pescados y mariscos, 2014, Obtenido de: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/empresas.Fecha de consulta 4 Marzo 2014, 22:54 hrs.

Themelis N.J, Verma Shefali, 2002, Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes, partial ful fillment of the requirements for Master of Science Degree in Earth Resources Engineering. Columbia University. Obtenido de:

http://www.compost.org/CCC_Science_Web_Site/pdf/Biogas/anaerobic%20Digestion%20of%20Biodegradable%20Organics%20in%20MSW.pdf.

Thomas, K. R., Rahman, P. K. S. M., 2006. Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review. Aspects of Applied Biology, 80, pp.147-153.

Tomczak-Wandzel R, Levlin E, Biogas production from fish wastes in co-digestion with sewage sludge, Obtenido de: http://www2.lwr.kth.se/forskningsprojekt/Polishproject/rep18/Wandzel_Levlin.pdf

Torres Lozada Patricia, Pérez Andrea, 2010, Actividad metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. Revista Eidenar: Ejemplar 9/Enero-Diciembre 2010

Zupančič G. D., Škrjanec Igor, Logar Romana Marinšek, 2012, Anaerobic co-digestion of excess brewery yeast in a granular biomass reactor to enhance the production of biomethane, Bioresource Technology 124 (2012) 328–337

Zupančič G. D., Roš M.,.Klemenčič M, Oset M., Marinšek Logar R., 2013, Excess brewery yeast co-digestion in a full-scale EGSB reactor, Obtenido de: http://www.redbiogas.cl/wordpress/wp-content/uploads/2013/07/IWA-11041.pdf, fecha de consulta 24 mayo 2014 13:45 hrs.