DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN 1.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

"HIDRÓLISIS ANAEROBIA DE RESIDUOS SÓLIDOS DE FRUTAS Y VERDURAS EN UN REACTOR DE BIOPELÍCULA PARA SU APROVECHAMIENTO COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO LÍQUIDO"

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

MER. Andrea Alvarado Vallejo

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO SEPTIEMBRE 2024

DEDICATORIAS

A mi familia, papá y mamá, son mi modelo a seguir y mi apoyo incondicional. Todos los días aprendo de ustedes y he crecido gracias a esto, sin ustedes nada de esto sería posible. Juan Pablo, gracias por ser el mejor hermano que alguien podría pedir, siento tu apoyo en cada paso que doy.

A mi novio, Nestor, gracias por estar presente en las buenas y en las malas y ser mi compañero de vida, por ser paciente y darme amor en los momentos que más lo necesito. Tú y Mila son mi fortaleza y mi felicidad.

En memoria de mis abuelos, que siempre estarán presentes en mi corazón, sé que me apoyan y me cuidan desde el cielo.

Gracias a Dios y a la vida por permitirme otro logro más.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

Gracias por su apoyo y confianza durante el doctorado, ha sido grato trabajar en conjunto durante una parte importante de mi formación profesional.

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Gracias por todas las enseñanzas y el apoyo durante esta investigación y durante los proyectos realizados en el doctorado. Su amplia experiencia y conocimiento sobre el tema y su contribución a mi desarrollo profesional han sido clave para llegar a esta instancia.

Dr. Raúl Snell Castro

Le agradezco la oportunidad de trabajar con usted, y por su apoyo e invaluables enseñanzas que contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

Comité Tutorial

Al Dr. Alberto A. Aguilar Laserre, Dr. Albino Martínez Sibaja y al Dr. Ulises Juárez Martínez, gracias por sus valiosos comentarios, sugerencias y preguntas que ayudaron a mejorar la calidad de la investigación.

Conahcyt

Se agradece al Conahcyt por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de doctorado, con el número de CVU 899884.

Gracias a los residentes y miembros del grupo de investigación que contribuyeron.

CONTENIDO

Dedicatorias	2
Agradecimientos	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas	7
Resumen	8
Abstract	9
CAPITULO 1. ANTECEDENTES	20
CAPÍTULO 2. ESTADO DEL ARTE	24
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	48
CONCLUSIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
PRODUCTOS ACADÉMICOS	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Se conserva la numeración original para facilitar la trazabilidad.

1. Estructura y composición de la lignocelulosa adaptada de Seidl y Goulart, 2016. 28

2. Etapas de la digestión anaerobia adaptada de Batstone y col., 2002 30

3. Diagrama esquemático de las fracciones de la Demanda Química de Oxígeno 35

4. Tres pasos de un ciclo de PCR (Ramírez-Pacheco et al., 2013). 41

5. Método no específico para la q-PCR, mediante el fluoroforo SYBR Green 42

6. Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman (Tamay de Dios 42

7. Distintos fertilizantes aceptados para su uso en cultivos por contenido de 46

8. Esquema del método de cuarteo para la realización del inventario de RFV del 50

10. (A) Lodos anaerobios diluidos; y (B) inoculación del reactor anaerobio de 53

13. Gráfica de Biogás (mL) y Metano (mL) sin Respiración Endógena (RE) 56

14. Gráfica de Biogás (mL) y Metano (mL) sin Respiración Endógena (RE) 57

15. (a) Semilla y (b) Cultivo de Flor de Calabaza (Cucurbita pepo L.) en Instituto 61

39. Componentes del sistema de monitoreo de pH adaptado a un reactor anaerobio 64

40. Ensamblaje de componentes electrónicos para el sistema de monitoreo de pH. 65

41. (A) Sensor de pH (electrodo E201); (B) módulo PH-4502C; y (C) conector 66

42. Soluciones buffer para calibración del sensor de pH. 67

43. Gráfica de la medición de pH vs t para la solución de pH 4.01. 67

44. Gráfica de la medición de pH vs t para la solución de pH 6.86. 68

45. Gráfica de la medición de pH vs t para la solución de pH 9.18. 68

46. Esquema de Generación de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) en Orizaba, 69

47. Ubicación satelital del Mercado Emiliano Zapata en Orizaba, Ver. obtenida de 70

48. Plano Oficial de Mercado Emiliano Zapata. 70

49. Recolección de RSU del Mercado Emiliano Zapata. (A) Camión de recolección 72

50. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Primavera. 73

51. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Verano. 73

52. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Otoño. 74

53. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Invierno. 74

ÍNDICE DE FIGURAS (continuación)

56. Gráfica de comparación de la producción de biogás (650 h) de las cinéticas de la 79

57. Gráfica de comparación de la producción de biogás (120 h) de las cinéticas de la 79

58. Gráfica de comparación de la producción de biogás (120 h) de las cinéticas 5, 6 80

59. Gráfica de la velocidad de producción de biogás de las cinéticas de la fracción 81

60. Gráfica de producción de biogás de las cinéticas alimentando la fracción líquida 83

61. Gráfica de producción de metano de las cinéticas alimentando la fracción líquida 83

62. Producción de metano (mL) experimental y modelado con Gompertz simple y 85

63. Producción de metano (mL) experimental y modelado con Gompertz simple y 85

64. Balance de materia (ST) del proceso de obtención de la FL-2 de Lechuga a partir 86

65. Crecimiento de la planta de Flor de Calabaza (Cucurbita pepo) 59 días posterior a la 88

66. Aparición de flores del cultivo de Cucurbita pepo con la aplicación de los 3 tratamientos 89

67. Flores de calabaza cultivadas después de la aplicación de los 3 tratamientos: (a) Control; 89

68. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto 90

69. Gráfica de la prueba LSD para la longitud 91

70. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto 91

71. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto 92

72. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto 93

73. Gráfica de la prueba LSD para el ancho 94

74. Gráfica de caja y bigote para el número de flores aplicando 3 tipos de fertilización 94

75. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto 95

ÍNDICE DE TABLAS

Se conserva la numeración original para facilitar la trazabilidad.

1. Comparación de las investigaciones relacionadas con las diferentes áreas estudiadas duran· 20

2. Caracterización fisicoquímica de la fracción soluble obtenida de la separación de 1 26

3. Producción de ácido acético a partir de algunos sustratos en condiciones estándar 32

4. Biodegradabilidad de los compuestos orgánicos (P·uciennik-Koropczuk y 35

5. Nutrientes escenciales para las plantas (Savoy, 1999). 44

6. Métodos para la medición de las propiedades fisicoquímicas para el sustrato y la 51

7. Condiciones de alimentación y duración de las cinéticas de la fracción líquida de 54

8. Condiciones de operación de las cinéticas por especie (jitomate, lechuga, naranja). 55

9. Condiciones de operación del reactor anaerobio de biopelícula para la hidrólisis 59

10. Metodos y equipos utilizados para la medición de macronutrientes en los FOL. 60

11. Dosis de aplicación diaria de Tratamientos 2 (FI) y 3 (FOL) por planta de Flor de 62

14. Componentes del sistema de monitoreo de pH para un reactor anaerobio de 63

15. Resumen por estación del inventario de RSO por especie del Mercado Emiliano Zapata 75

16. Rendimiento del reactor. Reactor anaerobio de biopelícula a escala piloto al momento de 76

17. Cantidad de biogás producido (mL) y velocidad máxima de producción de biogás 78

18. Potencial de producción de biogas y metano a partir de la fracción líquida de 81

19. Rendimientos de las cinéticas por especie (jitomate, lechuga, naranja). 82

20. Condiciones del reactor anaerobio de biopelícula para la hidrólisis anaerobia de 87

21. Cantidad de macronutrientes en los FOL con diferentes sustratos: a) la fracción 88

22. Análisis de Varianza (ANOVA) para la longitud de tallo. 90

23. Análisis de Varianza (ANOVA) para el diámetro de tallo. 92

24. Análisis de Varianza (ANOVA) para la longitud de hoja 93

25. Análisis de Varianza (ANOVA) para ancho de hoja. 94

26. Análisis de Varianza (ANOVA) para la longitud de hoja 95

RESUMEN

Este extracto reúne las partes conservadas del estudio sobre la obtención de fertilizante orgánico líquido (FOL) mediante hidrólisis anaerobia de la fracción líquida de residuos de frutas y verduras en un reactor de biopelícula a escala de laboratorio. Es una selección editorial de la tesis doctoral de 2024; no representa el documento original completo.

Se presenta el inventario estacional de residuos de frutas y verduras del Mercado Emiliano Zapata, en Orizaba, Veracruz, que permitió seleccionar especies de interés. Se incluyen los fundamentos de digestión e hidrólisis anaerobia, el procedimiento de preparación de fracciones líquidas, el monitoreo del sistema y las pruebas de formulación del fertilizante.

De acuerdo con los resultados consignados en la tesis original, la hidrólisis de una mezcla de fracciones líquidas de jitomate, lechuga y naranja presentó una remoción promedio de DQO de 24.58 ± 10.17 %. Para una formulación complementada con cáscara de camarón se reportó 30.27 ± 12.60 %. El FOL obtenido se caracterizó con 9.58 g N/L, 1.25 g P/L y 1.13 g K/L (aproximadamente 1-0.1-0.1).

La evaluación agronómica incluyó tratamientos control, FOL y fertilizante inorgánico en cultivo de Cucurbita pepo. Las diferencias entre FOL y el fertilizante inorgánico no fueron estadísticamente significativas para las variables de crecimiento y rendimiento analizadas, mientras que se reportaron diferencias frente al control en longitud de tallo y número de flores.

Este extracto omite la caracterización de soportes específicos y los resultados cuya interpretación depende de los apartados suprimidos. Las cifras conservadas describen experimentos de la tesis original y no constituyen ensayos independientes de un material de soporte. Para reconstruir íntegramente el método experimental debe consultarse la tesis oficial.

ABSTRACT

This technical excerpt contains selected sections of the 2024 doctoral thesis on liquid organic fertilizer (LOF) production through anaerobic hydrolysis of the liquid fraction of fruit and vegetable waste in a laboratory-scale biofilm reactor. It is not the complete, officially approved thesis.

A seasonal inventory of waste collected at the Emiliano Zapata municipal market in Orizaba, Veracruz, supported the selection of feedstock species. The retained material describes anaerobic digestion and hydrolysis, preparation of liquid feedstocks, system monitoring, fertilizer formulation, and agronomic assessment.

The original thesis reports an average COD removal of 24.58 ± 10.17% for the liquid fractions of tomato, lettuce, and orange, and 30.27 ± 12.60% for a formulation supplemented with shrimp shell. The resulting liquid fertilizer contained 9.58 g N/L, 1.25 g P/L, and 1.13 g K/L, approximately corresponding to an N-P-K grade of 1-0.1-0.1.

An agronomic evaluation compared a control, LOF, and an inorganic fertilizer in Cucurbita pepo. The original study did not report statistically significant differences between LOF and inorganic fertilizer for assessed growth and yield metrics; differences from the control were reported in stem length and flower number.

This excerpt omits support-specific characterizations and results relying on omitted experimental sections. Retained findings are not independent validation of a different biofilm carrier. The official thesis should be consulted for the full experimental record.

INTRODUCCIÓN

Los desechos orgánicos comprenden una porción significativa de los Residuos Sólidos Urbanos (RSU). En México, alrededor del 66% de los RSU son residuos orgánicos, cuyo destino final en el mejor de los casos, son los rellenos sanitarios (SEMARNAT, 2016). Según datos del INEGI, el 77% de los municipios en México cuenta con sitios para la disposición final de los RSU, de los cuales el 87% son a cielo abierto y sólo 13% son rellenos sanitarios (INEGI, 2017). La descomposición de los desechos orgánicos en los tiraderos a cielo abierto producen gases de efecto invernadero y otros compuestos orgánicos volátiles dañinos para el medio ambiente. Debido al aumento progresivo de la generación de Residuos Sólidos Orgánicos en todo el mundo y la conciencia de sus posibles impactos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente, existe la necesidad de desarrollar tecnologías sostenibles para la valorización de los residuos orgánicos.

Por otro lado, el mayor compromiso con la sostenibilidad ambiental se ve reflejado en las nuevas técnicas de gestión de la producción agrícola. La agricultura orgánica, aceptada por la FAO como un sistema alternativo a la agricultura convencional, es un sistema de cultivo respetuoso con el medio ambiente, ya que se ha demostrado que el abuso y mal uso de fertilizantes minerales son responsables de problemas de salud y de contaminación ambiental. De acuerdo con estudios recientes, se ha establecido que la agricultura orgánica es la de mayor crecimiento en el mundo (Martínez-Alcantara *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2018). En México el uso de fertilizantes orgánicos para la producción de cultivos clasificados como orgánicos es cada vez mayor. Actualmente, México es el cuarto país con la producción de alimentos orgánicos más importante del mundo (SIAP, 2018). Esto puede ser prometedor para la agricultura en el país, sin embargo, un factor limitante es la carencia de fertilizantes orgánicos adecuados y certificados, al tener una gran variabilidad en el contenido de nutrientes y la complejidad de las materias primas utilizadas como fertilizantes (Treadwell *et al.*, 2007)

La tecnología de digestión anaerobia se puede utilizar para reducir la carga orgánica, volumen de residuos y emisiones de gases de efecto invernadero, al mismo tiempo que

proporciona subproductos sostenibles como el biogás para la producción de energía y materiales ricos en nutrientes para el compostaje y la fertilización (Ahring, 2003; Arthurson, 2009). El digestato o líquido resultante de la digestión anaerobia de los desechos de residuos orgánicos ha sido utilizado como fuente de nutrientes para el crecimiento de plantas, sin embargo, el digestato es un producto residual al que ya se le han eliminado la mayoría de sus componentes por el proceso de digestión anaerobia (Gell *et al.*, 2011). Por lo que pensando en la finalidad de emplearlo para la estabilización de los residuos puede resultar más conveniente solo realizar la hidrólisis anaerobia y el producto obtenido una vez esterilizado se utilizarlo como un fertilizante orgánico. A su vez, debido a que los RFV tienen un contenido elevado de agua (mayor al 80%) es fácil obtener una fracción líquida por medio de un pretratamiento mecánico que separa la fracción de difícil biodegradabilidad (fracción lignocelulósica) (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017).

En este trabajo se desarrollará un FOL a partir de Residuos Sólidos Orgánicos (RSO) de Frutas y Verduras que cumpla con el perfil de nutrientes básicos necesarios para el crecimiento de cultivos, mediante el proceso de hidrólisis dentro de un reactor de biopelícula anaerobia a nivel laboratorio. Se desarrollarán tres formulaciones de fertilizantes líquidos orgánicos a partir de la hidrólisis anaerobia de diferentes mezclas de Residuos de Frutas y Verduras (RFV) previamente caracterizadas. Posteriormente se identificarán las bacterias hidrolíticas presentes en la biopelícula anaerobia mediante técnicas de biología molecular y a continuación se caracterizarán las tres formulaciones de fertilizantes líquidos orgánicos. Además, se adicionarán diferentes fuentes de proteína a partir de residuos orgánicos para mejorar el contenido de nitrógeno del fertilizante desarrollado verificando la posible inhibición en el reactor por la formación de amoníaco. Finalmente se evaluará la eficiencia de las tres formulaciones aplicándolas a un cultivo vegetal especifico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La composición de los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) generados en México es heterogénea, incluyen papel y cartón, restos de alimentos, metales como aluminio, cobre, zinc, entre otros componentes. El principal componente de los residuos es el material orgánico, alrededor del 66% de los RSU son residuos con una composición orgánica. La disposición final de estos residuos en rellenos sanitarios sin recuperación de biogás o en tiraderos a cielo abierto contribuyen de manera importante a la generación de gases de efecto invernadero (SEMARNAT, 2016). Por esta razón, es importante implementar acciones para mitigar su impacto, como el reciclaje de los productos de papel, el compostaje o la digestión de los residuos de alimentos y jardines, la cogeneración de la energía eléctrica y la quema del metano producido en los rellenos sanitarios, entre otros (Yaman, 2020; Pujara *et al.*, 2019).

En México, el manejo y disposición de los Residuos Sólidos Urbanos representa un gran reto ambiental, pues se calcula que apenas el 35% de los rellenos sanitarios bajo supervisión municipal cumplen con las normas ambientales, tanto de operación como de construcción de un relleno sanitario, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003 que define las especificaciones para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de Residuos Sólidos Urbanos y de manejo especial (Escamilla-García, 2015).

La fertilización intensiva de suelos con fertilizantes minerales presenta diversos problemas asociados con los altos costos, contaminación por nitratos y pérdida de carbono en el suelo. La utilización de materiales orgánicos como la composta representa una alternativa para la agricultura sustentable (Nkoa, 2014). Se han realizado estudios detallados del uso de excretas, composta o lodo residual como mejoradores de suelos, sin embargo, la aplicación de digestatos producidos en reactores anaerobios como medios para la fertilización de suelos, han sido poco estudiados (Gell *et al.*, 2011, Peng *et al.*, 2020). Actualmente la utilización de la digestión anaerobia se ha expandido significativamente alrededor del mundo,

principalmente en Europa donde si tienen más de cuatro mil reactores de tamaño medio tan solo en Alemania (Weiland, 2010)

Existen siete líneas de aplicación de la digestión anaerobia: Tratamiento de lodos residuales municipales; tratamiento de aguas residuales industriales, de industrias agroalimentarias o de industrias fermentativas; tratamiento de excretas de ganado; tratamiento de la fracción orgánica de Residuos Sólidos Urbanos; codigestión de excretas con la fracción orgánica de Residuos Sólidos Orgánicos; aprovechamiento de granos energéticos; y la codigestión de residuos de granjas de ganado con granos energéticos. Estos procesos convierten de manera satisfactoria los residuos en dos subproductos económicamente útiles, el biogás y un remediador de suelo (digestato) (Ahring *et al.*, 2003; Arthurson, 2009). La investigación acerca del uso de digestatos como fertilizantes aún se encuentra en desarrollo, ya que la mayoría de los trabajos se ha enfocado en la evaluación de su estabilidad para reducir su carácter patogénico, los malos olores y su descomposición (Kirchmann y Bernal, 1997; Drennan y DiStefano 2010) y su aplicación en diversos procesos como la carbonización hidrotermal y pirólisis (Cao *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019), el cultivo de microalgas (Nguyen *et al.*, 2019; Nagarajan *et al.*,2019) y cultivos hidropónicos (Ronga *et al.*, 2019).

La producción y consumo de alimentos orgánicos ha crecido en el mercado global con incrementos de dos dígitos y ventas cercanas a los 80 mil millones de dólares en 2014. Por otro lado, México ocupa el cuarto lugar mundial de productores orgánicos (IFOAM, 2018). Esta tendencia creciente en la demanda de productos orgánicos representa una oportunidad para los agricultores, sin embargo, generalmente la productividad de la agricultura orgánica es menor que la de sistemas convencionales. Un factor limitante en los sistemas de producción orgánica es la carencia de fertilizantes orgánicos adecuados y certificados, ya que se tiene una gran variabilidad en el contenido de nutrientes y la complejidad de las materias primas utilizadas como fertilizantes (Treadwell *et al.*, 2007).

En los fertilizantes líquidos, la concentración y composición de nutrientes y su disponibilidad dependen del tipo de biomasa y el método de producción utilizado (Hartz *et al.*, 2010; Martínez-Alcantara *et al.*, 2016b). Por ejemplo, el nitrógeno disponible en pollinaza digerida anaeróbicamente, puede contener entre 60 y 80% del nitrógeno (Bujoczek *et al.*, 2000) sin embargo su contenido puede ser entre 46 y 53% en extracto acuoso (Wang *et al.*, 2012).

Balancear el suministro de nutrientes esenciales en los fertilizantes líquidos a partir de vegetales representa un reto, ya que frecuentemente las concentraciones de potasio, cloro y sodio son excesivas comparadas con el nitrógeno (Martínez-Alcantara *et al.*, 2016b).

JUSTIFICACIÓN

En México diariamente se generan alrededor de 103 mil Toneladas de Residuos Sólidos Urbanos, de los cuales solo el 9.63% se recicla. De estos RSU aproximadamente el 66% corresponde a residuos orgánicos, los cuales contribuyen de manera importante a la generación de gases de efecto invernadero (SEMARNAT, 2016). Es por esto que se buscan opciones para el aprovechamiento de estos desechos que mitiguen su impacto ambiental.

Por otro lado, en México el uso de fertilizantes orgánicos para la producción de cultivos clasificados como orgánicos es cada vez mayor. En el país se destinan aproximadamente un millón de hectáreas para el cultivo de productos agrícolas. México es el cuarto país con la producción de alimentos orgánicos más importante del mundo. En 2018 el consumo nacional de fertilizante fue de 5.4 millones de Toneladas, de las que solo el 34% se produjo en México (SIAP, 2018). Según la OMRI tan solo el 16% de sus productos certificados para la producción orgánica son mexicanos. Dentro de las listas de OMRI se listan dentro de "Productos de Fermentación" 12 fertilizantes orgánicos líquidos de los cuales ninguno es fabricado en México (OMRI, 2020).

El aprovechamiento de RSO por medio de digestión anaerobia depende de la materia prima y su composición, así los residuos con alto contenido de lignina no son fácilmente aprovechables al ser un compuesto altamente recalcitrante y requiere de tratamientos previos o tiempos de tratamiento mucho más largos (Khan y Ahring, 2019).

En estudios previos se ha probado que los efluentes (digestato) resultantes del proceso de digestión anaerobia alimentada con desechos orgánicos de frutas y verduras, contiene nutrientes que favorecen el desarrollo de las plantas (Sandoval *et al.*, 2019). Sin embargo, el digestato es un producto residual al que ya se le han eliminado la mayoría de sus componentes por el proceso de digestión anaerobia, debido a que el propósito principal es la eliminación de la mayor cantidad de materia orgánica y la producción de biogás (Gell *et al.*, 2011). Algunos de los factores que determinan si el digestato puede utilizarse como fertilizante o enmienda del suelo son el tipo y las propiedades del sustrato, la concentración y la forma de

los nutrientes (principalmente N, P y K) en el digestato y las necesidades de nutrientes del cultivo objetivo (Mostafazadeh-Fard *et al.*, 2019).

El nitrógeno es un nutriente que tiene un gran impacto en el rendimiento y la calidad de los cultivos. La cantidad de nitrógeno aplicada tiene que ser adecuada para garantizar las necesidades de nitrógeno de la cosecha, pero no debe ser excesiva para evitar la contaminación ambiental (lixiviación de nitratos y emisiones gaseosas de N) (Fangueiro *et al.*, 2009) y las altas concentraciones de amonio (NH_4^+) que hace que el pH del suelo aumente y que este se convierte en amoníaco (NH_3), el cual es fitotóxico incluso a bajas concentraciones (Frerichs *et al.*, 2020). Las fuentes de nitrógeno de liberación lenta, como la composta y los digestatos, no proporcionan un suministro adecuado de N para satisfacer las necesidades de los cultivos, especialmente en las últimas etapas de la temporada de crecimiento, por lo que es necesario un aporte suplementario de N (Gross *et al.*, 2012).

Considerando lo anterior, se propone la elaboración de un fertilizante orgánico liquido a partir de la fracción soluble de frutas y verduras previamente seleccionados mediante la hidrólisis anaerobia en un reactor de biopelícula. Se probarán distintas formulaciones para asegurar que el fertilizante orgánico contenga la proporción de nutrientes adecuada para cultivos orgánico, al adicionar fuentes de proteína para mejorar los niveles de nitrógeno disponible y se estudiará la inhibición de las bacterias por la presencia de amoniaco.

HIPOTESIS

Es posible elaborar un Fertilizante Orgánico Líquido (FOL) que contenga nutrientes asimilables por las plantas en una proporción adecuada, a partir de la hidrólisis anaerobia de Residuos de Frutas y Verduras (RFV) adicionado con una fuente de nitrógeno en un reactor de biopelícula anaerobia.

OBJETIVOS

Elaborar un Fertilizante Orgánico Líquido (FOL) a partir de la hidrólisis anaerobia de la fracción líquida de Residuos de Frutas y Verduras (RFV) selectivamente separados en un reactor de biopelícula a nivel laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y fabricar un reactor anaerobio de biopelícula adecuado para la producción de un FOL.
- Estudiar la degradación de la fracción líquida de cada especie de frutas y verduras seleccionadas en un reactor anaerobio de biopelícula.
- Desarrollar el proceso de elaboración de un FOL a partir de RFV selectivamente separados.
- Evaluar diferentes formulaciones de RFV y caracterizar los fertilizantes elaborados
- Enriquecer la formulación seleccionada con un residuo rico en proteínas como fuente de nitrógeno, evaluando su efecto en el fertilizante y la posible inhibición del reactor.
- Comparar la eficiencia del FOL con un Fertilizante Inorgánico (FI) en el crecimiento de una especie vegetal.
- Estudiar la dinámica de las poblaciones microbianas en el reactor de biopelícula mediante biología molecular.

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO

I. APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO

- Estudio de la degradación de la fracción líquida de los RSOFV seleccionadas en un reactor anaerobio de biopelícula.
- Utilización de un biorreactor de biopelícula anaerobia para realizar la hidrólisis de RSOFV.
- Implementación de la hidrólisis de la fracción líquida de RSOFV para generar un FOL.
- Estudio de la dinámica poblacional bacteriana en la biopelícula anaerobia.

II. APORTACIÓN AL DESARROLLO TECNOLOGICO

- Desarrollo de la formulación adecuada de RSOFV adicionados con una fuente de nitrógeno para la obtención de un FOL.
- Desarrollo de un FOL de alto rendimiento y con posibilidad de ser patentado.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

De acuerdo con la bibliografía consultada en el estado del arte y los antecedentes de la presente investigación, se seleccionaron las investigaciones más relevantes y se realizó una comparativa de las áreas estudiadas con respecto a las áreas de investigación de esta tesis doctoral. En la Tabla 1 se muestran las investigaciones que incluyen la digestión anaerobia y producción de un FOL junto con las principales áreas de investigación y se comparan con la presente investigación.

Se revisaron distintas investigaciones recientes de las cuales el artículo de Ahuja *et al.*, (2020) y dos patentes (Evans, 2017; Baker *et al.*, 2013) son las más relevantes para esta investigación. La comparación de estas tres investigaciones con la investigación a realizar durante el doctorado (última fila), se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de las investigaciones relacionadas con las diferentes áreas estudiadas durante el doctorado.

AUTORES, (AÑO)	TÍTULO	Fracción liquida de residuos	Desechos de Frutas y Verduras	Digestión Anaerobia	Digestión por etapas	Hidrólisis Anaerobia	Digestato	FOL	Genotipificación
Mostafazadeh-Fard *et al.*, (2019)	Producción de fertilizante orgánico líquido a través de digestión anaerobia de recortes de césped.			✓	✓			✓	
Peng *et al.*, (2020)	Manejo del digestato de la digestión anaerobia de sólidos orgánicos de alto contenido sólido.			✓			✓		
Alvarado-Vallejo Andrea (presente investigación)	Hidrólisis anaerobia de residuos sólidos de frutas y verduras en un reactor de biopelícula para su aprovechamiento como fertilizante orgánico líquido	✓	✓	✓		✓		✓	✓

Continuación Tabla 1. Comparación de las investigaciones relacionadas con las diferentes áreas estudiadas durante el doctorado.

AUTORES, (AÑO)	TÍTULO	Fracción liquida de residuos	Desechos de Frutas y Verduras	Digestión Anaerobia	Digestión por etapas	Hidrólisis Anaerobia	Digestato	FOL	Genotipificación
Samani, (2010)	Patente No. 7,771,504: Producción de fertilizante orgánico líquido a partir de sustratos orgánicos. Se produce a partir de plantas principalmente.			✓	✓			✓	
Zhang *et al.*, (2017)	Digestor anaerobio de tres etapas para desperdicio de alimentos.		✓ Desechos de comida	✓	✓	✓			✓
Arreola-Vargas *et al.*, (2018)	Efecto de la tasa de carga orgánica sobre el rendimiento y las poblaciones microbianas durante el tratamiento anaeróbico de las vinazas de tequila en un reactor de lecho empacado a escala piloto.			✓					✓
Alvarado-Lassman *et al.*, (2017)	Producción de biogás a partir de la fracción líquida pretratada mecánicamente de residuos sólidos orgánicos municipales clasificados.	✓	✓	✓					
Ahuja *et al.*, (2020)	Los peces y los fertilizantes a base de desechos de pescado en la agricultura orgánica, con estatus en Noruega.			✓	✓		✓	✓	
Evans, (2017)	Patente No. 15/098,040. Fertilizante orgánico del digestato anaeróbico y producto de pescado líquido estabilizado.	✓		✓			✓	✓	
Baker *et al.*, (2013)	Patente No. 13/749,528. Métodos y sistemas de producción de fertilizantes orgánicos.			✓	✓		✓	✓	
Alvarado-Vallejo Andrea (presente investigación)	Hidrólisis anaerobia de residuos sólidos de frutas y verduras en un reactor de biopelícula para su aprovechamiento como fertilizante orgánico líquido	✓	✓	✓		✓		✓	✓

A diferencia de las investigaciones relacionadas consultadas, se realiza la implementación de la hidrólisis de la fracción líquida de RFV para elaborar un FOL. En la patente de Samani (2010) y la investigación de Mostafazadeh-Fard y colegas (2019) se describe la fabricación de un fertilizante líquido orgánico mediante digestión anaerobia, pero utilizan como sustratos plantas y recortes de pasto respectivamente y no RFV, y se realiza digestión anaerobia por etapas en ambos casos y no solo mediante hidrólisis anaerobia.

En la presente investigación se utilizará un reactor de biopelícula anaerobia para realizar la hidrólisis de RSOFV. Generalmente los reactores utilizan biomasa granular o biomasa en suspensión. No se encontraron investigaciones que utilizaran un reactor de biopelícula para hidrólisis anaerobia para la elaboración de un fertilizante líquido orgánico.

De igual manera, se realizará un estudio de la dinámica poblacional microbiana presente en el reactor anaerobio y en la biopelícula anaerobia en diferentes etapas del proceso. Se encontraron investigaciones de la genotipificación de la población bacteriana dentro de reactores anaerobios, sin embargo, estas investigaciones se centran en reactores para el tratamiento de otro tipo de residuos con alta carga orgánica (vinazas o desperdicios de alimentos) para la producción de biogás (Zhang *et al.*, 2017; Arreola-Vargas *et al.*, 2018), y no se ha estudiado las poblaciones microbianas en la etapa de hidrólisis anaerobia para la producción de un fertilizante orgánico.

Por otro lado, se estudiará la inhibición por amoniaco en la hidrólisis de RSOFV complementados con residuos con alto contenido de proteínas. No se encontraron investigaciones donde se analizará la inhibición por amoniaco al agregar complementos con alto contenido de proteínas para la producción de un FOL. En la investigación de Mostafazadeh-Fard y colegas (2019) se realizan tres ciclos de digestión anaerobia con la hipótesis de evitar el acumulamiento excesivo de ácidos volátiles que podrían inhibir o desestabilizar el proceso de digestión anaerobia, sin embargo, no se analiza la inhibición por amoniaco ni se adicionó al sustrato residuos con alto contenido proteico como se realiza en la presente investigación.

Las dos patentes mencionadas previamente y que son relevantes para esta investigación pertenecen a dos compañías de productos de agricultura sustentable. WISErg Corp cuenta con una patente para la producción de FOL (Wiserganic 3-2-2) a partir de la fracción sólida de los residuos sólidos orgánicos municipales, mediante digestión anaerobia en dos etapas y el uso del digestato para la producción del fertilizante (Baker *et al.*, 2013). True Organic Products, Inc. cuenta con una patente para la producción de FOL a base de pescado con productos como TRUE 3-5-1 y TRUE 4-0-2. La combinación de digestato anaeróbico y uno o más productos líquidos de pescado estabilizados se procesan para obtener el producto de fertilizante orgánico basado en el digestato anaeróbico (Evans, 2017). Las principales diferencias de esta investigación con ambas patentes son: el uso de la fracción líquida de los RFV como sustrato y que el proceso de producción se realizará mediante hidrólisis anaerobia.

CAPÍTULO 2. ESTADO DEL ARTE

V. RESIDUOS SÓLIDOS DE FRUTAS Y VERDURAS

Los residuos se definen en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) como aquellos materiales o productos cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentran en estado sólido o semisólido, liquido o gaseoso y que se contienen en recipientes o depósitos en función de sus características y origen, se clasifican en tres grupos: residuos sólidos urbanos (RSU), Residuos de Manejo Especial (RME) y Residuos Peligrosos (RP) (DOF, 2003).

Los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) son los que se generan en las casas habitación como resultado de la eliminación de los materiales que se utilizan en las actividades domésticas o de actividades desarrolladas dentro de establecimientos o en la vía pública. Estos residuos son contabilizados mediante la metodología establecida en la norma NMX-AA-61-1985 sobre la Determinación de la Generación de Residuos Sólidos (Secretaría de Comercio, 1985). En el 2015 en México se generaron alrededor de 53.1 millones de Toneladas de RSU al año, lo que equivale a cerca de 145 mil Toneladas de RSU al día, de los cuales el 52.4% corresponde a residuos orgánicos (residuos de comida, jardines y materiales orgánicos similares) (SEMARNAT, 2016).

Existen diversas fuentes que generan RFV en cantidades significativas como lo son: industria procesadora de frutas y hortalizas, supermercados, casas habitación, mercados municipales, agroindustrias, empacadoras, entre otras. Describiendo una fuente de generación importante (García-Peña *et al.*, 2011). Los mercados municipales han sido considerados grandes generadores de residuos en el ámbito local, al ser recintos de carácter colectivo, concurrencia pública y actividad diaria. Su gestión es responsabilidad de la administración del mercado, y por ello, es imprescindible que la entidad gestora conozca la situación de su mercado y dé una salida adecuada a los residuos que en él se generan.

En México se desperdician más 10 mil Toneladas de alimentos cada año que representan 37% de la producción agropecuaria en el país. De la producción de frutas y verduras se cuenta con datos de aquellas que más se desperdiciaron: el 54% del aguacate; 28.8% del jitomate;

32% de la cebolla; 41% del melón; 57.7% de la guayaba, 54.5% del mango y 49% de las manzanas (Sedesol, 2013). Específicamente en el municipio de Orizaba, durante el año 2017, se generaron aproximadamente 36,832.66 Toneladas de residuos sólidos municipales, con un promedio aproximado de 98.71 Ton/día (Coordinación de limpia pública y ecología, 2017). Cabe mencionar que la generación y composición de los residuos sólidos municipales está directamente ligada a la participación de la industria y al comercio de la localidad, siendo en el caso Orizaba, un punto geográfico muy importante en el abasto regional de alimentos (Juárez-García, 2016).

a. COMPONENTES DE LAS FRUTAS Y VERDURAS

Se ha encontrado en varios estudios que la composición de los residuos de alimentos varía de acuerdo a la ubicación geográfica, los cambios estacionales, los métodos de cocción y patrones de consumo. Sus componentes orgánicos principales son proteínas, carbohidratos (almidón, celulosa, hemicelulosas y lignina), lípidos y ácidos orgánicos. Los desechos de alimentos como las frutas y verduras son considerados sustratos orgánicos fácilmente biodegradables debido a su alto contenido de humedad (Edwiges *et al.*, 2018).

En el caso de los RFV se ha reportado que tienen un bajo contenido de lípidos y un contenido celulósico relativamente alto. En estudios previos se ha informado que el contenido de lípidos en RFV es de 11.8%, el contenido aproximado de solidos totales es de 10.7% y de solidos volátiles es 41%, lo cual indica que el contenido de agua es de entre 60 y 90% en frutas y verduras (Pramanik *et al.*, 2019). En otros estudios, se reporta el contenido de RFV como fracción de DQO, con un contenido del 50.1% de carbohidratos, 15.6% de lignina, 10% de lípidos, 37.4% de matriz lignocelulósica y el 2.4% de nitrógeno con referencia a los solidos totales (Pagliaccia *et al.*, 2019).

b. CARACTERÍSTICAS DE LA FRACCIÓN SOLUBLE Y FRACCIÓN LIGNOCELULÓSICA

FRACCIÓN SOLUBLE

La fracción soluble se obtiene al separar la parte sólida de los residuos orgánicos mediante métodos como triturado y filtrado. En estudios previos se calcula que el contenido de agua presente en RFV varía entre 60 y 90% en frutas y verduras (Pramanik *et al.*, 2019). En estudio

donde se realiza la caracterización de la fracción soluble baja en solidos de Residuos Sólidos Orgánicos (RSO), en la Tabla 2 se muestran los resultados de los parámetros analizados. Se obtuvo que la fase líquida de RFV es aproximadamente del 80%, y se reportan los siguientes parámetros: 38,400 mg/L de solidos suspendidos totales, 32,450 mg/L de solidos suspendidos volátiles, 56,840 mg/L de DQO total y 49,720 mg/L de DQO soluble (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de la fracción soluble obtenida de la separación de 1 kg de residuo de frutas y verduras (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017).

Parámetros	Unidades	Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación Estándar
Fracción líquida	%	89.63	58.4	77.61	6.64
Volumen	L	0.84	0.5	0.664	0.067
pH	-	5.56	3.34	4.55	0.32
SST	mg/L	62,900	9,640	38,400	8.7
SSV	mg/L	56,200	5,940	32,450	8.7
DQO_t	mg/L	102,220	22,120	56,840	12.99
DQO_s	mg/L	92,770	13,790	49,720	11.54

FRACCIÓN LIGNOCELULÓSICA

La lignocelulosa es el principal componente de la membrana celular de las especies vegetales, y esta formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de otros componentes en menor cantidad como cenizas, pectina y proteínas. En la Figura 1 se puede observar la estructura de la lignocelulosa en la membrana celular. Los desechos agrícolas, los residuos forestales, los pastos y los materiales leñosos son considerados materiales lignocelulósicos (Koupaie *et al.*, 2019). La proporción y composición de celulosa, hemicelulosa y lignina y los tipos de enlaces que forman varían con la biomasa, la parte del material vegetal, el momento de la cosecha y cómo se cultivó (Seidl y Goulart, 2016). Típicamente, la mayor parte de la biomasa lignocelulósica agrícola está compuesta por

aproximadamente 10 - 25% de lignina, 20 - 30% de hemicelulosa y 40 - 50% de celulosa (Anwar *et al.*, 2014).

La celulosa es un polímero altamente estable que consiste en cadenas lineales de D-glucosa, con enlaces β -1,4-glucósidicos (Hendriks y Zeeman, 2009; Moglia, 2008). Sus moléculas están unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals que son responsables de su estructura cristalina compacta (Seidl y Goulart, 2016). Se sabe que la insolubilidad de la celulosa es el resultado de estos enlaces y que sus características dificultan su biodegradación o digestión (Behera *et al.*, 2014).

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo y ramificado de diferentes polisacáridos que incluye pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y azucares ácidos (ácido glucurónico y ácidos urónicos) (Hendriks y Zeeman, 2009; Moglia, 2008; Koupaie *et al.*, 2019). La xilospiranosa forma la cadena principal del polímero y está conectada con enlaces b-1,4 glucosídicos (Anwar *et al.*, 2014). La naturaleza ramificada de la hemicelulosa le permite formar fuertes enlaces con celulosa (enlaces de hidrógeno) y lignina (enlaces covalentes) que aumentan la rigidez general del material lignocelulósico (Koupaie et a.l, 2019). Se informa que la solubilidad de la hemicelulosa en agua comienza a una temperatura de aproximadamente 150 °C - 180°C (Hendriks y Zeeman, 2009).

La lignina es un compuesto complejo y grande hecho de unidades de fenilpropano (3 carbonos unidos con 6 anillos de átomos de carbono) unidas en una estructura tridimensional principalmente unidas por enlaces éter (Zheng *et al.*, 2014; Anwar *et al.*, 2014). Los principales monómeros de la lignina son el alcohol p-hidroxifenílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Moglia, 2008; Koupaie et a.l, 2019). La lignina actúa como un pegamento para formar la estructura tridimensional rígida de la pared celular de la planta (Koupaie et a.l, 2019; Anwar *et al.*, 2014). Además, la lignina es insoluble en agua y se considera un material ópticamente inerte que se ha demostrado que solo se disuelve en agua a temperaturas elevadas (a partir de 180 °C). Estas propiedades hacen que la lignina sea el componente más resistente de la biomasa lignocelulósica a la degradación biológica y química (Koupaie et a.l, 2019; Zheng *et al.*, 2014).

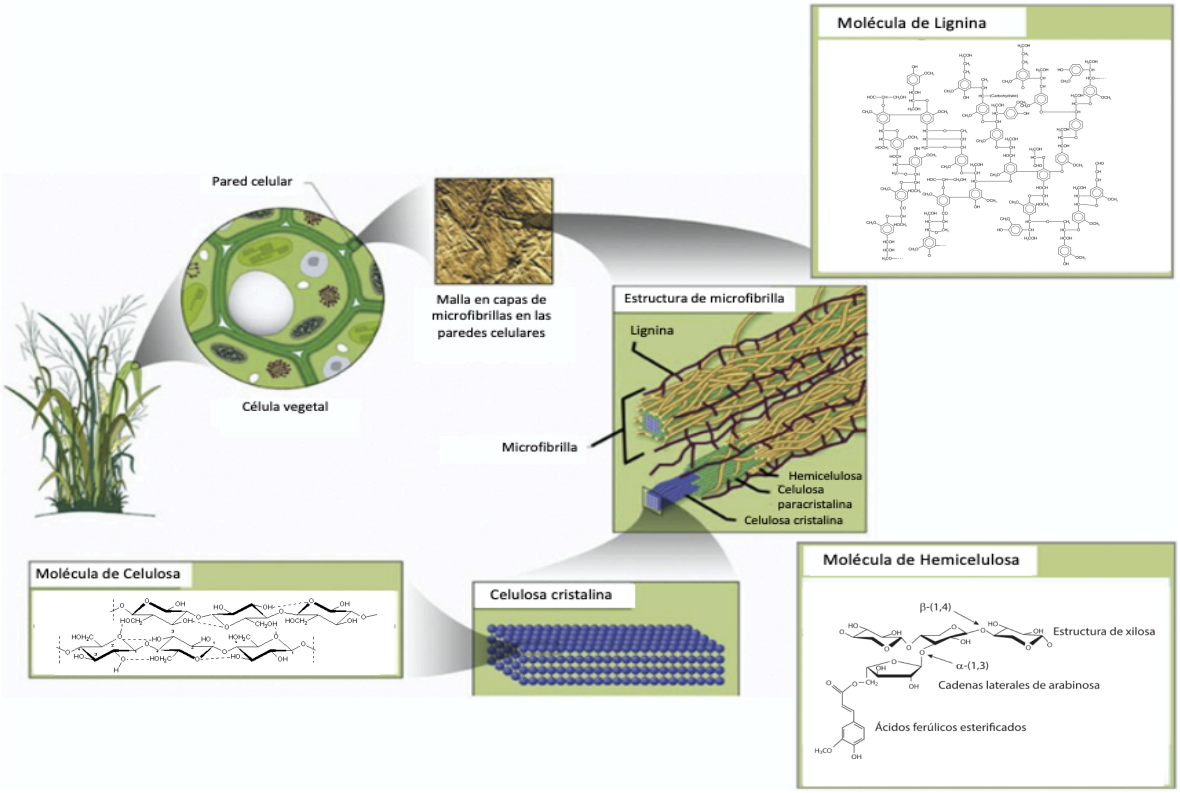


Figura 1. Estructura y composición de la lignocelulosa adaptada de Seidl y Goulart, 2016.

VI. DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno que da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono), conocida como "biogás" y a una suspensión acuosa o "lodo" que contiene los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica (Adekunle y Okolie, 2015). Es un proceso en etapas en el que cada grupo microbiano, relacionado tróficamente, aprovecha como sustrato los productos generados por el metabolismo de los microorganismos responsables del paso anterior (Holm-Nielsen *et al.*, 2009).

La materia prima preferentemente utilizada para ser sometida a este tratamiento es cualquier biomasa residual que posea un alto contenido en humedad, como restos de comida, restos de hojas y hierbas al limpiar un jardín o un huerto, residuos ganaderos, lodos de plantas depuradoras de aguas residuales urbanas y aguas residuales domésticas e industriales (Adekunle y Okolie, 2015). Sin embargo, composición química y la estructura de los materiales lignocelulósicos dificultan la tasa de biodegradación de los Residuos Sólidos

Orgánicos. Se ha documentado que la hidrólisis de la materia orgánica compleja en compuestos solubles es la etapa limitante de los procesos anaerobios para desechos con un alto contenido de sólidos. En consecuencia, se requieren diversos tratamientos físicos, químicos y enzimáticos para aumentar la solubilidad del sustrato y acelerar la tasa de biodegradación de los residuos orgánicos sólidos (Khalid *et al.*, 2011).

La digestión anaerobia de residuos orgánicos se utiliza comúnmente como una tecnología ambiental útil. Los beneficios de este proceso consisten en reducir la contaminación ambiental de dos formas principales: el entorno sellado del proceso evita la salida de metano a la atmósfera, el cual puede ser aprovechado como sustituto de combustibles fósiles y la remoción de materia orgánica y otros compuestos (Khalid *et al.*, 2011). En la actualidad la digestión anaerobia se utiliza para muchos procesos, por ejemplo: el tratamiento de aguas residuales, el tratamiento de residuos industriales, residuos agrícolas, residuos de tipo urbano, agua residual bruta, y la fracción orgánica de residuos sólidos municipales. (Holm-Nielsen *et al.*, 2009). Es así como, la digestión anaeróbica, es un método de tratamiento de residuos, que permite disminuir la cantidad de materia orgánica contaminante, al estabilizarla y la producción también de fertilizantes orgánicos. Así mismo, contribuye a mejorar las condiciones sanitarias mediante el control de la contaminación (Tambone *et al.*, 2010).

a. ETAPAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Durante este proceso participan varios grupos de microorganismos que dividen el proceso de descomposición anaerobia de la materia orgánica en cuatro etapas (Mata-Alvarez et. Al., 2000). En la Figura 2 se pueden observar las etapas de la digestión anaerobia.

La primera fase es la **hidrólisis** de partículas y moléculas complejas (proteínas, carbohidratos y lípidos) que son hidrolizadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos acidogénicos o fermentativos. Como resultado se producen compuestos solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga) que serán metabolizados por las bacterias **acidogénicas** dando lugar, principalmente, a ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, hidrógeno, dióxido de carbono y otros productos intermedios. Los ácidos grasos de cadena corta son transformados en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, mediante la acción de los microorganismos **acetogénicos**. Por último, los

microorganismos **metanogénicos** producen metano a partir de ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono (Varnero-Moreno, 2011).

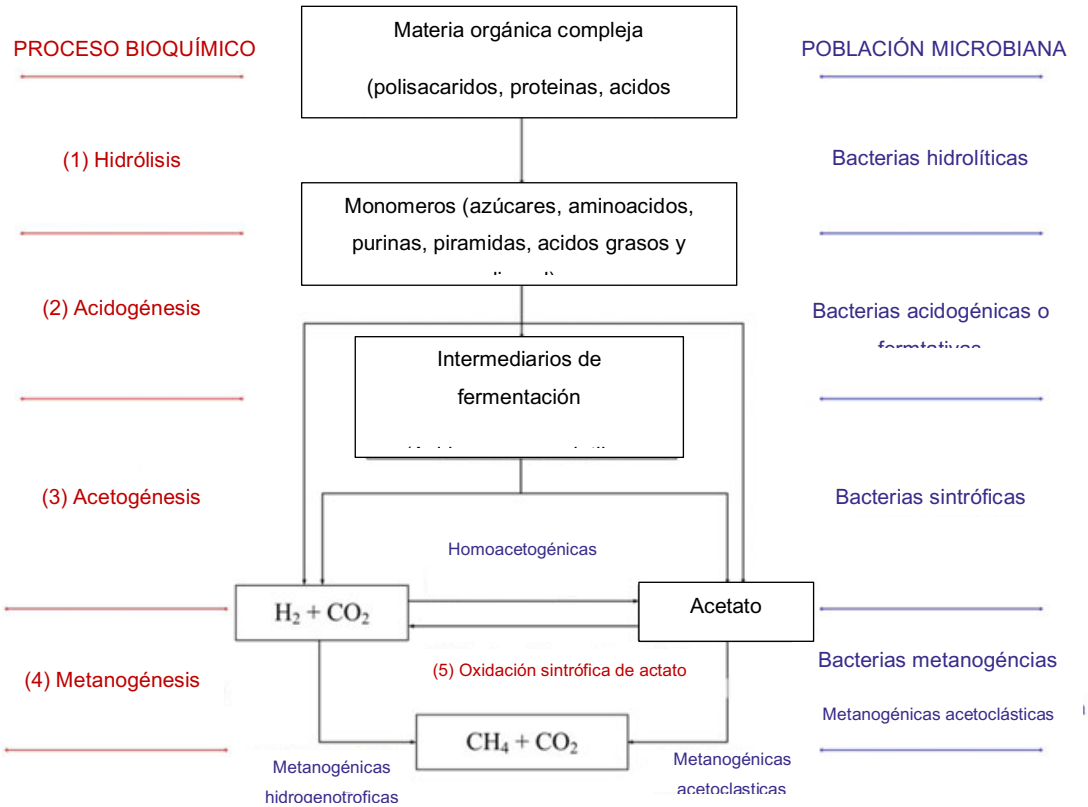


Figura 2. Etapas de la digestión anaerobia adaptada de Batstone y col., 2002

b. BIOQUÍMICA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Los residuos orgánicos están compuestos principalmente carbohidratos, proteínas y grasas, que se pueden usar como materia prima para la digestión anaerobia. La conversión de materias orgánicas en biogás se puede expresar mediante la siguiente ecuación (Jiraprasertwong *et al.*, 2019; Sivamani *et al.*, 2020):

$$C_c H_h O_0 N_n S_s + y\, H_2O \rightarrow x\, CH_4 + (c - x)\, CO_2 + n\, NH_3 + s\, H_2S$$

$$x = 1/8\,(4c + h - 2o - 3n + 2s)$$

$$y = 1/4\,(4c - h - 2o + 3n + 3s)$$

Las ecuaciones de reacción para la conversión de carbohidratos, proteínas y grasas a biogás son (Jiraprasertwong *et al.*, 2019; Sivamani *et al.*, 2020):

Carbohidratos: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3\,CH_4 + 3\,CO_2$

Lípidos: $C_{12}H_{24}O_6 + 3\,H_2O \rightarrow 7.5\,CH_4 + 4.5\,CO_2$

Proteínas: $C_{13}H_{25}O_7N_3S + 6\,H_2O \rightarrow 6.5\,CH_4 + 6.5\,CO_2 + 3\,NH_3 + H_2S$

La proporción de CO_2 y CH_4 generada depende de la composición de la materia prima y el nivel de degradación. Cuando simplemente se usan carbohidratos, grasas o proteínas como materia prima, el contenido teórico de metano en el biogás es respectivamente del 50%, 62.5% y 38.2%.

Se definen la bioquímica en cada etapa de la digestión anaerobia.

HIDRÓLISIS

En la etapa de hidrólisis, los compuestos macromoleculares insolubles como los carbohidratos, las grasas y las proteínas deben hidrolizarse en compuestos solubles como azúcares solubles, ácidos grasos, glicerina y aminoácidos mediante catálisis de enzimas extracelulares (como proteasa, celulosa, hemicelulosa, amilasa y lipasa) secretadas por bacterias hidrolíticas (Sivamani *et al.*, 2018).

En esta reacción, los enlaces covalentes de la sustancia macromolecular se rompen. Generalmente, la reacción se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$R - X + H_2O \rightarrow R - OH + X^- + H^+$$

En este proceso, los microorganismos anaerobios facultativos consumirán oxígeno disuelto en agua y disminuirán el potencial redox para proporcionar condiciones de crecimiento favorables para los microorganismos anaerobios obligados (Jiraprasertwong *et al.*, 2019; Sivamani *et al.*, 2020).

ACIDOGÉNESIS

En esta etapa las bacterias fermentativas usan hidrolizados como sustratos para convertirlos en ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y micro moléculas como el etanol, H_2 y CO_2, dependiendo de las características del sustrato empleado. El proceso de acidogénesis se completa con una gran cantidad de bacterias fermentativas. Este grupo de microorganismos

se compone de bacterias facultativas y anaeróbicas obligadas, colectivamente denominadas bacterias formadoras de ácidos (Parawira *et al.*, 2004; Jiraprasertwong *et al.*, 2019)

ACETOGÉNESIS

Los metabolitos intermedios, como el ácido propiónico, el ácido butírico y el ácido láctico producidos en la etapa de acidogénesis, pueden ser utilizados por las arqueas matogénicas solo después de convertirse en micromoléculas más simples por medio de bacterias acetogénicas para la producción de ácido acético e hidrógeno. La producción de ácido acético a partir de varios sustratos se enumera en la Tabla 3. En esta etapa también podemos encontrar las bacterias homoacetogénicos. Durante la producción de hidrógeno y ácido acético, las bacterias homoacetogénicas pueden utilizar continuamente H_2 para reducir el CO_2, producir ácido acético y liberar energía y el ácido acético es utilizado por los metanógenos (Kalia, 2007; Jiraprasertwong *et al.*, 2019).

$$2\,CO_2 + 4\,H_2 \leftrightarrow CH_3COOH + 2\,H_2O$$

Casi el 30% del metano durante la digestión anaeróbica se produce mediante la reducción de CO2 en H2. Pero solo el 5–6% del metano se produce por la reducción de CO2 disuelto en agua por H2 (Khanal, 2008).

Tabla 3. Producción de ácido acético a partir de algunos sustratos en condiciones estándar (25 °C), adaptada de Khanal, 2008.

Sustrato	Reacción
Etanol	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow\ CH_3COO^- +\ H^+ + 2\,H_2$
Ácido propiónico	$CH_3CH_2COO^- +\ 2\,H_2O \rightarrow\ CH_3COO^- + HCO_3^- +\ H^+ + 3\,H_2$
Ácido butírico	$CH_3CH_2CH_2COO^- +\ 2\,H_2O \rightarrow\ 2\,CH_3COO^- +\ H^+ + 2\,H_2$
Acido Benzoico	$C_6H_5COO^- +\ 7\,H_2O \rightarrow\ 3\,CH_3COO^- + HCO_3^- +\ 3\,H^+ + 3\,H_2$

METANOGÉNESIS

El proceso de producción de metano es realizado por las metanógenos hidrogenotróficos que utilizan como sustrato los productos de la acetogénesis. Sin embargo, otros microorganismos que utilizan hidrógeno, como las bacterias reductoras de sulfato, pueden competir con las

bacterias metanogénicas por el hidrógeno, lo que puede reducir el sustrato disponible para los metanógenos e influir en la producción de metano. Además, el H_2S producido por las bacterias reductoras de sulfato puede afectar a los metanógenos (Ziemiński y Frąc, 2012; An *et al.*, 2008). La degradación del ácido acético por las bacterias metanogénicas se puede representar con las siguientes reacciones (Khanal, 2008; Sivamani *et al.*, 2020):

$$CH_3COOH \leftrightarrow CH_4 + CO_2$$

$$CO_2 + 4\,\frac{NADH^+}{H} \leftrightarrow CH_4 + 2\,H_2O + 4\,NAD^+$$

A pesar de que la reducción de CO_2 para producir metano puede liberar más energía y es más fácil de proceder termodinámicamente, el 70% del metano se produce a través de la fermentación de acetato (Khanal, 2008).

c. BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA

Una sustancia o compuesto es biodegradable si puede descomponerse por la acción de microorganismos. Los microorganismos utilizan estos compuestos como fuente de carbono o de energía. Por otro lado, los compuestos orgánicos pueden mineralizarse (convertirse en compuestos inorgánicos) para alcanzar los productos terminales, que en el caso de la digestión anaerobia son el dióxido de carbono y el metano o bien no lograr una completa mineralización produciéndose solo compuestos intermediarios. Al tratar compuestos orgánicos complejos la degradación anaerobia puede ocurrir suministrando energía y una fuente de carbono al microorganismo (metabolismo) o bien por el proceso de co-metabolismo donde el compuesto solamente se degrada en la presencia de otro compuesto generalmente fácilmente biodegradable (Holliger *et al.*, 2016).

Los métodos para evaluar la biodegradabilidad anaerobia son diversos, pero todos tienen que ver con la medición de uno o más productos de la digestión o con la medición del agotamiento del sustrato. Los métodos basados en la medición de productos aprovechan la formación de biogás o los ácidos grasos volátiles para dar seguimiento de la biodegradabilidad. El biogás producido se mide por el incremento de volumen a presión constante o por el incremento de presión a volumen constante o midiéndolo por métodos cromatográficos. Los métodos basados en el agotamiento del sustrato se basan en la medición de parámetros agrupados

como son los sólidos volátiles, la DQO o el carbono orgánico disuelto o bien en la medición directa de los compuestos utilizados como sustrato (Rozzi y Remigi, 2001).

La concentración de los residuos o el agua residual suele expresarse en forma de Demanda Química de Oxígeno (DQO) o como Sólidos Volátiles (SV). En el caso de la DQO se mide la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar completamente la materia orgánica mediante un agente químico oxidante que en la mayoría de los casos es el dicromato de potasio (APHA, 1992). El contenido de SV describe el contenido de materia orgánica en el residuo y se define como la pérdida de materia en una muestra seca después calcinarla (APHA ,1992). El método se basa en el hecho de que la mayoría de los materiales orgánicos combustionan a 550 °C y la mayoría de los compuestos inorgánicos requieren temperaturas mayores.

Si se conoce la composición del material orgánico entonces puede calcularse la relación entre DQO y SV a través de la estequiometría de la oxidación completa del material. Por ejemplo, en el caso de la glucosa se tiene la siguiente ecuación:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

Si se conoce la composición de la materia orgánica, se puede calcular la relación DQO/SV tomando como base la oxidación completa del material.

En el caso de la glucosa la relación DQO/SV= 1.067 gDQO/g SV y dependiendo del estado de oxidación del carbono es cercano al cero como en el caso de la glucosa por lo que la relación DQO/SV será cercana a uno. En forma general los carbohidratos, proteínas y lípidos tienen una relación 1.19, 1.42 y 2.9 gDQO/g SV respectivamente.

d. DQO FÁCIL Y DIFÍCILMENTE BIODEGRADABLE

Aunque los procesos de oxidación bioquímica y química tienen un carácter separado, en varios casos, existe una correlación entre DQO y DBO_5, que permite estimar inicialmente la biodegradabilidad de los contaminantes (Płuciennik-Koropczuk y Myszograj, 2019). Los residuos con carga orgánica utilizados como sustrato para la digestión anaerobia pueden considerarse susceptibles a la biodegradación si 1.5 < DQO/DBO5 < 2.5, siendo fácilmente biodegradables aquellos con un valor de $DQO/DBO_5 < 2$. Un valor alto de la relación DQO/DBO_5 (> 2.5) indica una degradación lenta y un alto contenido de sustancias orgánicas

que difícilmente pueden ser biodegradables, que pueden ser causadas por materiales lignocelulósicos presentes en el sustrato (Tabla 4).

Tabla 4. Biodegradabilidad de los compuestos orgánicos (Płuciennik-Koropczuk y Myszograj, 2019).

DQO/DBO$_5$	**Remoción de DQO (%)**	**Susceptibilidad a Biodegradación Bioquímica**
< 2.0	> 90	Fácilmente biodegradable
2.0 – 2.5	50 – 90	Biodegradable
2.5 – 5.0	10 – 50	Lentamente biodegradable
> 5.0	< 10	Resistente a la biodegradación

El principal parámetro que determinan la cantidad de materia orgánica presente en residuos orgánicos es la Demanda Química de Oxígeno (DQO). Muchas veces los residuos orgánicos requieren de la aplicación de procesos de pretratamiento o tratamiento terciario para eliminar nutrientes y materia orgánica refractaria, dependiendo de la composición del sustrato con el que se alimenta el reactor anaerobio. Es por esto, que se realiza una clasificación de la materia organice de acuerdo a su biodegradabilidad. La DQO total de la materia orgánica se puede clasificar en las cuatro fracciones: DQO fácilmente biodegradable (FB DQO), DQO difícilmente biodegradable (DB DQO), DQO soluble no biodegradable (SNB DQO) y DQO en partículas no biodegradable (PNB DQO) (Figura 3).

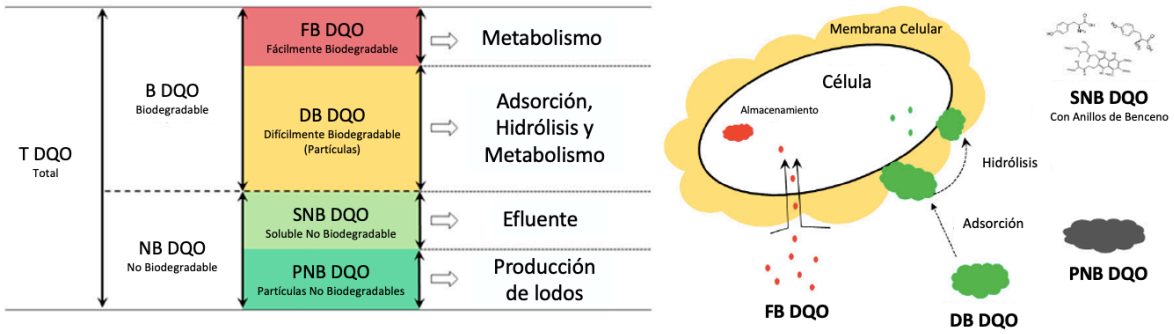


Figura 3. Diagrama esquemático de las fracciones de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y sus destinos, adaptado de Choi *et al.*, 2017.

La DQO fácilmente biodegradable (FB DQO), como los Ácidos Grasos Volátiles, se degrada fácilmente por el metabolismo microbiano. La DQO difícilmente biodegradable (DB DQO), compuesto de materia orgánica en partículas, se degrada lentamente por una serie de acciones microbianas, como la adsorción, la hidrólisis y el metabolismo. La DQO soluble no biodegradable (SNB DQO), que es limitante de la biodegradación, puede estar contenida en descargas industriales. Los compuestos aromáticos se utilizan en diversas industrias y son ejemplos típicos de SNB DQO. La DQO de partículas no biodegradables (PNB DQO) tampoco es degradable por medios biológicos, pero se elimina fácilmente por sedimentación. Además, se reportó previamente que los residuos vegetales como frutas y verduras contienen en su membrana celular materiales lignocelulósicos, como la lignina que se sabe que no es biodegradable (Choi *et al.* 2017; Van Loosdrecht, 2008: Płuciennik-Koropczuk y Myszograj, 2019).

e. HIDRÓLISIS ANAEROBIA

La hidrólisis es el primer paso necesario para la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos (carbohidratos, lípidos y proteínas). La etapa hidrolítica puede ser la etapa limitante de la velocidad del proceso global, sobre todo tratando residuos con alto contenido en sólidos. Incluso en caso donde las fases acidogénicas o metanogénicas son consideradas como pasos limitantes, la hidrólisis puede afectar el conjunto del proceso (Pavlosthatis y Giraldo-Gómez,1991).

Para llevar a cabo la biodegradación, ciertos microorganismos secretan diferentes tipos de enzimas, llamadas enzimas extracelulares que “cortan” moléculas grandes en pedazos más pequeños para que los microorganismos pueden tomar dentro de la célula y utilizarla como una fuente de energía y nutrición (Hassan y Nelson, 2012). La hidrólisis de los polímeros naturales se realiza a través de enzimas sintetizadas por los microorganismos, tales como celulasa, proteasa y lipasa. Estas enzimas, denominadas hidrolíticas, pueden ser excretadas al medio (exoenzimas) o estar asociadas a la envoltura celular. Se necesita una amplia variedad de bacterias para asegurar la presencia de exoenzimas y endoenzimas para la degradación del sustrato presente (Parra-Huertas y Campos-Montiel, 2013). Los principales géneros que hacen parte de los microorganismos hidrolíticos se encuentran: *Bacillus*, *Peptostreptococus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Miroccus* y *Clostridium*, *Acetovibrio*,

Micrococcus y *Staphylococcus* (Gerardi, 2003). Las bacterias hidrolíticas son responsables de la degradación de monómeros que estarán disponibles para el siguiente grupo de bacterias, si la materia base es compleja, la fase hidrolítica es relativamente lenta, por lo que esta etapa como se mencionó anteriormente es considerada la limitante del proceso anaerobio (Poirrier-González, 2015).

HIDRÓLISIS DE CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos están formados a partir de la unión de monosacáridos por medio de enlaces glicosídicos, y su hidrólisis requiere la acción de diversos sistemas enzimáticos específicos y modos de acción diferentes. Por ejemplo, la degradación de celulosa es llevada a cabo por una mezcla enzimática compuesta por exoglucanasas, endoglucanasas y celobiasas, siendo esta mezcla comúnmente denominada celulasas. Las quitinasas hidrolizan la quitina y el quitosano; y el almidón requiere de la acción de una compleja mezcla enzimática formada por α y β amilasas, glucoamilasas y glucanasas. Si bien es cierto, no se ha determinado que la presencia de aminoácidos ejerza algún efecto negativo sobre la actividad enzimática, se encontró que el amonio puede inhibir la fermentación de carbohidratos (Elbeshbishy *et al.*, 2012). La hidrólisis de los residuos puede ser catalizada por el mismo número de microorganismos; sin embargo, la velocidad de hidrólisis de polímeros puede ser diferente. En los reactores durante esta etapa, los procesos anaerobios de hidrólisis de polímeros a monómeros son más lentos que la fermentación de monómeros a ácidos y otros productos de fermentación (Lim y Wang, 2013).

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

La hidrólisis óptima de proteínas requiere de un pH neutro. En contraste a la fermentación de carbohidratos, lo cual disminuye el pH debido a la formación de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), la fermentación de aminoácidos en reactores de aguas residuales no provoca un cambio de pH significativo debido a la formación de amonio y ácidos (Lim y Wang, 2013). Las proteínas son hidrolizadas por proteasas en péptidos. Los péptidos son desdoblados por peptidasas a aminoácidos. Los aminoácidos son degradados por diferentes rutas a varios productos finales, incluyendo ácidos orgánicos, amonio, CO_2 y pequeñas cantidades de H_2 y componentes conteniendo sulfuro. En la oxidación de aminoácidos, el electrón aceptor puede

ser otro aminoácido o bacterias consumidoras de hidrógeno (Hassan y Nelson, 2012). Generalmente la tasa de hidrólisis de proteínas es menor que la de los carbohidratos.

HIDRÓLISIS DE LÍPIDOS

Los lípidos generalmente están presentes en la forma de triacilglicéridos, siendo hidrolizados a glicerol y una mezcla de tres ácidos grasos de cadena larga. Este proceso es llevado a cabo por enzimas denominadas comúnmente lipasas; este tipo de enzima actúa solo en la interfase agua-aceite y no en el medio. Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) están compuestos principalmente de ácido oleico, ácido linoleico y ácido palmitoleico, siendo los principales subproductos intermedios del proceso de degradación de los lípidos (Zhang *et al.* 2014). El proceso de biodegradación LCFA se considera el paso limitante de la velocidad del proceso de digestión anaerobia, ya que pueden ser tóxicos debido a que se absorben sobre la superficie celular bloqueando los mecanismos de transporte (Vavilin *et al.*, 2008)

f. MÉTODOS PARA SEPARAR O INHIBIR LAS ETAPAS DE LA DA

El pH es el parámetro más significativo que afecta el rendimiento y la estabilidad de un digestor anaeróbico. Cada grupo de bacterias necesita ciertos rangos de pH para su crecimiento. Anteriormente se ha reportado el pH óptimo para las distintas etapas de la digestión anaerobia: para la hidrólisis es 5.5 - 6, para la acidogénesis 5.5 - 6.5, para la acetogénesis 6 – 7 y para la metanogénesis 6.5 – 8.2, con un pH óptimo de 7 (Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2019; Pramanik *et al.*, 2019). La tasa de crecimiento de los metanógenos se reduce en gran medida a niveles de pH inferiores a 6.6, mientras que el pH óptimo de la hidrólisis y acidogénesis se encuentra entre pH 5.5 y 6.5 (Pramanik *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2019). Por lo que se pueden separar las etapas del proceso de digestión anaerobia controlando el pH en dos grupos: los procesos de hidrólisis/acidogénesis y de acetogénesis/metanogénesis (Mao *et al.*, 2019).

Se ha reportado que algunos factores principales que contribuyen a la fluctuación del pH son: la alcalinidad, los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), la producción de CO_2, y la concentración de bicarbonato (HCO_3) durante el proceso de digestión anaerobia (Zhang *et al.*, 2014). Los AGVs pueden verse afectados por el pH dentro del reactor anaerobio, a pH bajo los AGVs principales son los ácidos acético y butírico, mientras que el ácido acético y propiónico

desempeñaron predominan con pH cercano a 8. Es necesario controlar la relación entre las concentraciones de AGVs y HCO_3, ya que ayuda a ajustar el pH óptimo durante el proceso de digestión anaerobia. Para un proceso de digestión estable y bien amortiguado, es importante mantener al menos 1.4: 1 (relación molar) de HCO_3/VFA o una capacidad de amortiguación de 70 meq $CaCO_3$/L (Appels et al, 2008; Pramanik *et al.*, 2019).

En los procesos de digestión anaerobia, el amoníaco se produce a través de la degradación de sustratos ricos en nitrógeno, principalmente proteínas (Zhang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2019). Se ha reportado anteriormente que una concentración baja de amonio (50 y 200 mg/L) tiene un efecto beneficioso en los procesos anaerobios, ya que el nitrógeno amoniacal es un elemento esencial para la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, y por lo tanto es crítico para el crecimiento bacteriano (Jiang *et al.*, 2019). Además, el amoníaco, como base, neutraliza los ácidos orgánicos (AGVs) producidos por las bacterias fermentativas y, por lo tanto, puede funcionar como amortiguador. Sin embargo, si está presente en altas concentraciones, el amoníaco es inhibidor de la digestión anaerobia (Zhang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018).

El amoniaco está presente en forma de iones de amonio (NH_4^+) estable en fase acuosa y en forma gaseosa como amoniaco libre (NH_3), siento este ultimo la principal causa de inhibición. La producción de amoniaco se ve afecta por la temperatura y el pH. Un aumento en el pH de 7 a 8 conducirá a un aumento de ocho veces de la concentración de amoníaco libre en condiciones mesofílicas, y a un aumento aun mayor en condiciones termofílicas. Se demostró que el amoníaco en altas concentraciones es un inhibidor de muchas bacterias, ya que el amoníaco libre puede difundir la membrana celular y dificultar aún más el funcionamiento celular al interrumpir el equilibrio de potasio y protones en el interior la célula (Akindele y Sartaj, 2018; Zhang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2019).

VII. IDENTIFICACIÓN BACTERIAS HIDROLÍTICAS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR

Con el desarrollo de técnicas moleculares, especialmente la aparición de la tecnología de secuenciación de próxima generación es posible obtener mayor información sobre la comunidad bacteriana en los reactores anaerobios para comprender mejor la interacción metabólica (Ma *et al.*, 2017).

Para la identificación de bacterias hidrolíticas es necesaria la toma de muestra; la extracción de ADN; la purificación del ADN; la detección, cuantificación y amplificación de ciertas secuencias presentes en el ADN de bacterias hidrolíticas por medio de PCR; la secuenciación de los amplicones; y comparación con bases de datos de microorganismos secuenciados (Bartlett y Stirling, 2003).

a. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Actualmente se cuenta con Kits de extracción y purificación de ADN, como el FastDNA Soil Kit (MP Biomedicals, USA), mediante el cual se realiza la lisis celular, precipitación de proteínas, precipitación de lípidos y finalmente la precipitación del ADN (Ma *et al.*, 2017; Arreola-Vargas *et al.*, 2018).

b. DETECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Para la detección, cuantificación y amplificación de las secuencias especificas presentes en el ADN de bacterias hidrolíticas se realiza por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Hay diferentes técnicas de PCR como: q-PCR (PCR cuantitativa o en Tiempo Real); RT-PCR (PCR Transcripción Reversa); PCR-SSCP (PCR Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla); PCR-aninada o NESTED-PCR; RFLP (Técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) (Rajalakshmi, 2017).

Q-PCR (PCR EN TIEMPO REAL)

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativo (q-PCR) es necesario contar con el DNA molde que se desea amplificar, y un termociclador, la DNA polimerasa, magnesio (Mg+), nucleótidos (dNTP's), los primers, una solución amortiguadora buffer, agua purificada Mili-Q y el marcador fluorescente. La enzima, el magnesio, los dNTP's, el buffer y el reportero fluorescente para detectar los productos amplificados generalmente se venden juntos en una solución conocida como "Master Mix". Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb, si estos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente (Garibyan y Avashia, 2013).

Los pasos para la realización de la amplificación por medio del termociclador para el método de q-PCR, son los mismos que para la PCR de punto final o convencional. Se realizan 3 pasos

repetidos: desnaturalización del DNA doble cadena, unión de los primers al DNA cadena sencilla y alargamiento de las cadenas de DNA molde (Figura 4). Con la diferencia de que en la q-PCR se agrega un marcador flourescentes que permite la cuantificación y obtención de información a lo largo del proceso de amplificación. El reportero fluorescente comúnmente usado por los investigadores es SBYR Green debido a su bajo costo. Durante cada ciclo, se mide la fluorescencia y la señal de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de DNA replicado, por lo cual, el DNA se cuantifica en "tiempo real" (Figura 5). Esta técnica es no especifica, es decir, que solo permite la detección de un blanco (target) a la vez (Rebrikov y Trofimov, 2006; Smith y Osborn, 2009; Ginzinger, 2002; Ramakers *et al.*, 2003).

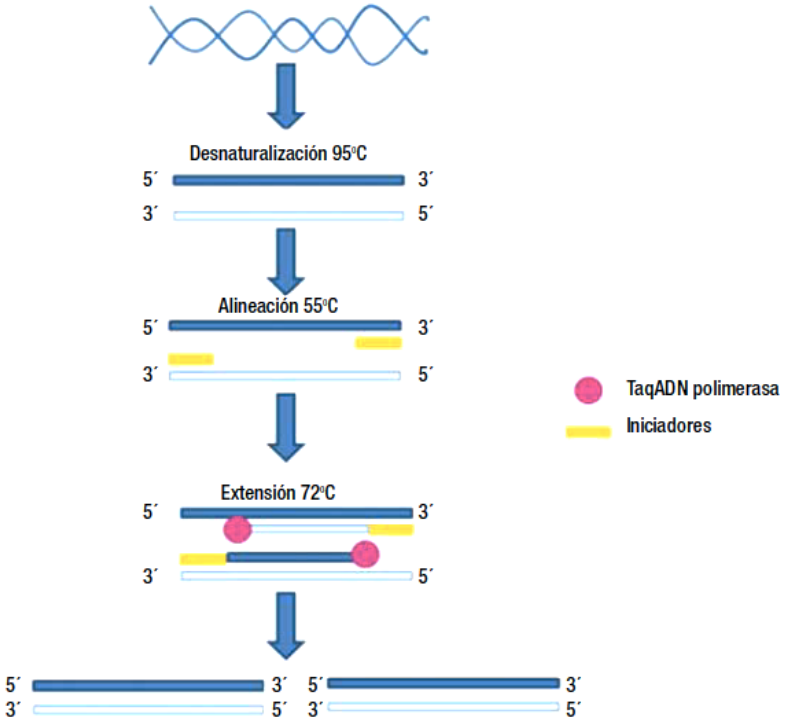


Figura 4. Tres pasos de un ciclo de PCR (Ramírez-Pacheco *et al.*, 2013).

Es por esto que en ensayos de diagnóstico mediante q-PCR, se prefiere la utilización de q-PCR con métodos específicos al agregar sondas, ya que permite detectar simultáneamente muchos blancos (targets) en cada muestra. Hay varios tipos de diseños de sonda disponibles, pero el tipo más común es una sonda de hidrólisis, que incorpora el uso de un fluoróforo y un extintor (quencher). Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas

como TaqMan (Figura 6). La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) evita la emisión del fluoróforo a través del extintor mientras la sonda está intacta, sin embargo, durante la reacción de PCR la sonda se hidroliza, lo cual separa el fluoróforo del extintor y da como resultado un aumento de la fluorescencia dependiente de la amplificación. De este modo, la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de la secuencia blanco de la sonda presente en la muestra (Smith y Osborn, 2009, Ginzinger, 2002).

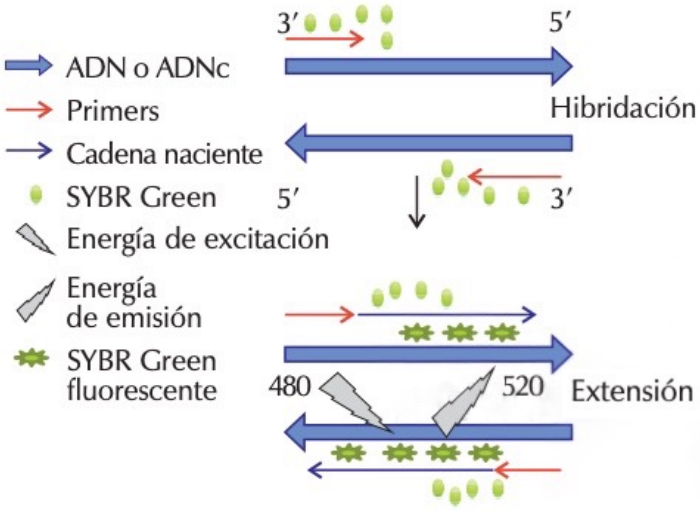


Figura 5. Método no específico para la q-PCR, mediante el fluoroforo SYBR Green (Tamay de Dios *et al.*, 2013)

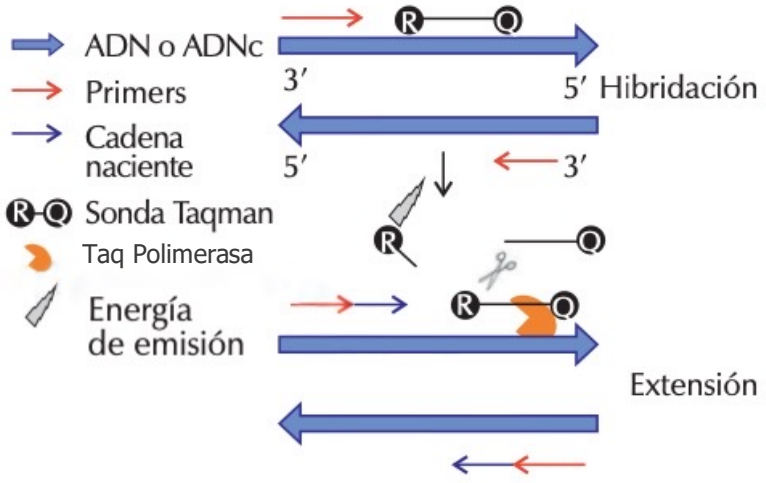


Figura 6. Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

c. SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación automática de ADN se basa en la detección de fluorescencia específica para cada uno de los nucleótidos trifosfatos que forman el ADN (adenina, guanina, citosina y timina), los cuales pueden ser identificados al ser marcados con un fluorocromo distinto que emite luz de diferente longitud de onda, al excitarse con un rayo láser. Dicha fluorescencia es recibida por un detector que interpreta la señal generando un registro de los perfiles de color, que combinados se interpretan como una secuencia y los datos resultantes se dan como cromatogramas, que son gráficas que registran los picos de fluorescencia (Hutchison 2007; Shendure y Ji, 2008). La tecnología más avanzada de secuenciación es la Secuenciación de Nueva Generación (NGS), que tiene la capacidad de secuenciar en menor tiempo y con menor cantidad de muestra, de forma masiva y paralela (Aguilar-Bultet y Flanquet, 2015; Koneman *et al.*, 2008; Shendure y Ji, 2008). Actualmente hay servicios de secuenciación como el ofrecido por el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Ciudad de México o el Laboratorio de Biotecnología Medioambiental INRA-Transfert Environnement en Narbonne, Francia.

d. COMPARACIÓN CON BASES DE DATOS

Una vez obtenida la secuencia de interés, es indispensable compararla con las secuencias que se pueden encontrar en las diferentes bases de datos disponibles. El programa más usado para llevar a cabo este análisis es BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI, que compara similitudes de las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística.

Si se está trabajando con una región codificante es indispensable obtener la secuencia de la proteína para la que codifica la secuencia de ADN obtenida, ubicar los codones y poder analizar tasas de mutación por posición de nucleótido y evaluar si la secuencia consenso se obtuvo de manera apropiada.

Dependiendo del propósito del estudio, se pueden generar hipótesis de homología de las bases al comparar y alinear las secuencias entre los organismos secuenciados. En un proceso de alineación de secuencias, el mecanismo básico es simplemente colocar en la misma posición a todas las bases. Para este propósito el programa más usado es CLUSTAL X disponible en programas de edición de secuencias como BioEdit.

VIII. FERTILIZANTES PARA CULTIVOS VEGETALES

Hay al menos 16 elementos que se sabe que son esenciales para el crecimiento de las plantas (Tabla 5). Del 94 al 99.5 % del material vegetal fresco está compuesto de carbono, hidrógeno y oxígeno, y se obtiene del aire y agua. Los otros nutrientes constituyen del 0.5 a 6.0 % restante y se obtienen a partir del suelo y la adición de fertilizantes (Savoy, 1999; Uchida, 2000).

Tabla 5. Nutrientes escenciales para las plantas (Savoy, 1999).

Suministrado a partir de aire y agua	**Suministrado a partir del suelo y fertilizantes**	
	Macronutrientes	**Micronutrientes**
Carbono (C)	Nigrógeno (N)	Zinc (Zn)
Hidrógeno (H)	Fósforo (P)	Cobre (Cu)
Oxígeno (O)	Potasio (K)	Fierro (Fe)
	Sulfuro (S)	Manganeso (Mn)
	Calcio (Ca)	Boro (B)
	Magnesio (Mg)	Cloro (Cl)
		Molibdeno (Mo)
		Cobalto (Co)

Fertilizante se refiere a cualquier compuesto que contiene uno o más elementos químicos, orgánicos o inorgánicos, naturales o sintéticos, que se incorporan al suelo o se aplican directamente sobre las plantas para lograr un crecimiento óptimo (FAO, 2009; Dittmar *et al.*, 2000).

Los fertilizantes comerciales deben garantizar la disponibilidad de uno o más nutrientes necesarios para las plantas (FAO, 2009). Los fertilizantes se pueden clasificar en: fertilizantes estándar y fertilizantes especiales. Los fertilizantes estándar pueden ser sólidos (puro, multinutrientes, de cal) o líquidos (de nitrógeno, multinutientes, NP, NPK, de alto análisis o en suspensión). Los fertilizantes especiales puede ser: sales solubles en agua, fertilizantes foliares, micronutrientes, de liberación lenta y controlada, inhibidores de nitrificación y

ureasa, y fertilizantes orgánicos (lodos de tratamientos residuales, composta y estiércol.) (FAO, 2009; Dittmar *et al.*, 2000)

Todos los fertilizantes deben mostrar el análisis de nutrientes garantizado en la etiqueta. Se muestra el contenido de tres nutrientes principales: nitrógeno, fosforo como oxido fosfórico (P_2O_5) y potasio como óxido de potasio (K_2O), en porcentaje de peso correspondiente al peso total del fertilizante, como una serie de tres números (Ej: 12-32-16) (FAO, 2009)

a. FERTILIZANTES ORGÁNICOS

La agricultura orgánica es un sistema de producción respetuoso con la naturaleza y el medio ambiente. Garantiza que el suelo tenga un rendimiento sostenible (mejorar sus propiedades físicas, su fertilidad, su porosidad y su densidad aparente), aumenta la resistencia de las plantas, promueve métodos biológicos sin utilizar productos químicos en la protección de las plantas, y tiene como objetivo aumentar la calidad del producto en la producción (Kaya y Coşkun, 2020; Hai *et al.*, 2017).

Los fertilizantes orgánicos están compuestos principalmente de diversas fuentes de residuos orgánicos como los residuos de cultivos, los desechos del procesamiento de alimentos, el estiércol animal, los biosólidos municipales (lodos de depuradora) y algunos residuos industriales (Hai *et al.*, 2017). Otro grupo de fertilizantes orgánicos son las mezclas de sales fertilizantes (N, P, K) con turba, corteza compostada, polvo de lignito o lodo seco. La diferencia entre estos fertilizantes y los fertilizantes fabricados con materias primas secundarias es que el producto primario de origen orgánico no se clasifica como residuo. En el caso de la turba, se agregan diferentes combinaciones de sales fertilizantes (N, NP, NPK, PK). En el caso de corteza compostada, lignito o lodo seco, solo se suministran mezclas con fertilizantes NPK (Roba, 2018; Dittmar *et al.*, 2000). La cantidad de fertilizante a emplear está determinada por la cantidad de nutrientes y por la cantidad de carga contaminante permitida debido a la protección del suelo (Bloem *et al.*, 2017; Dittmar *et al.*, 2000). Los fertilizantes se pueden clasificar por su contenido de contaminantes como se muestra en la Figura 7.

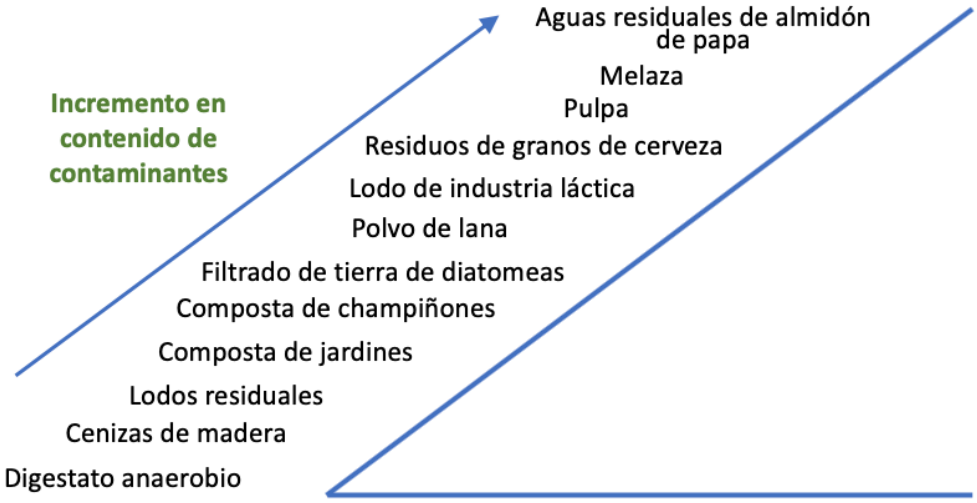


Figura 7. Distintos fertilizantes aceptados para su uso en cultivos por contenido de contaminantes (arriba menos a aceptados, abajo más aceptados) (Dittmar *et al.*, 2000)

Los fertilizantes orgánicos también se pueden clasificar según su función (Kyakuwaire, 2019; Dittmar *et al.*, 2000):

- Fertilizantes con efecto mejorador del suelo, con contenido orgánico estable y un suministro lento de nitrógeno (N) (baja concentración de nitrógeno altamente disponible). Como digestato anaerobio, compostas de jardín y los fertilizantes a base de turba.

- Fertilizantes con suministro de nutrientes a corto plazo, tienen un alto contenido de nitrógeno mineral y/o compuestos orgánicos de nitrógeno fácilmente degradables. Como lodos residuales (alta concentración de NH_4), harina de sangre y aguas residuales de almidón de papa.

Otra clasificación de los fertilizantes orgánicos con o sin la adición de sales fertilizantes minerales es (Kyakuwaire, 2019; Martínez-Alcantara *et al.*, 2016a; Dittmar *et al.*, 2000):

- Fertilizantes a partir de turba (o materiales de estabilidad similar): turba, composta de corteza, lignito.

- Fertilizantes a partir de materiales de desecho de origen animal: cuernos, harina de huesos, harina de sangre, harina de piel, harina de plumas, guano.

- Fertilizantes a partir de materiales de desecho de origen vegetal (ejemplos de desechos industriales): torta de ricino, desechos de cacao, granos de cerveza, colza (orujo), vinazas, pulpa, aguas residuales de almidón de papa, filtrado de tierra de diatomeas.
- Fertilizantes a partir de residuos municipales: lodos residuales, digestato y residuos de jardín.

b. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE FERTILIZANTES ORGÁNICOS

Algunos de los beneficios presentados en estudios anteriores al usar fertilizantes orgánicos de manera periódica en cultivos orgánicos muestran que estos pueden aumentar las porciones de macro-agregados del suelo (Zhang *et al.*, 2020), la materia orgánica del suelo y los niveles de nitrógeno total (NT) (Liu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2016), los niveles de carbono en la biomasa microbiana, los niveles de nitrógeno en la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas (Liu *et al.*, 2010), que ayudan a mantener el rendimiento de los cultivos y la calidad de los alimentos (Liu *et al.*, 2016; Tejada & Benítez, 2020). De igual manera, los fertilizantes que se obtienen de una fuente orgánica tienen un potencial de combustión y un potencial de lixiviación menores (Love *et al.*, 2020).

Por otro lado, la implementación de la agricultura orgánica pude representar algunos retos en comparación con la agricultura convencional. En estudios anteriores se ha afirmado que el uso de fertilizantes orgánicos da lugar a un promedio de 19.8 a 25% menos de rendimiento de los cultivos que los fertilizantes químicos (Ponti, Rijk & Ittersum, 2012; Seufert, Ramankutty & Foley, 2012; Ponisio *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se utilizan buenas prácticas de gestión , como la rotación de cultivos y los fertilizantes orgánicos adecuados, el rendimiento de un sistema orgánico puede igualar o incluso superar el de un sistema químico (Liu *et al.*, 2016; Cen *et al.*, 2020). De igual manera, la mayoría de los fertilizantes derivados de una fuente orgánica tienen un contenido de nitrógeno inferior al 3% y el nitrógeno es normalmente de baja liberación en comparación con fertilizantes sintéticos que proporcionan un nivel más alto de nitrógeno y una liberación más rápida en la tierra que la planta puede absorber (Love *et al.*, 2020).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

I. DISEÑO Y MONTAJE DE UN REACTOR ANAEROBIO DE BIOPELÍCULA A NIVEL LABORATORIO

Se realizó el diseño del reactor anaerobio de biopelícula a nivel laboratorio para la generación de un FOL. Las características deseadas son: debe estar construido con materiales resistentes a la corrosión y al uso continuo; se debe mantener un ambiente anaerobio (sin oxígeno) y sin presencia de luz en el interior (para evitar formación de algas); además, debe contar con accesorios para la toma de muestras (entrada y salida del efluente), recirculación y captación de biogás generado; con respecto a la biopelícula, es necesario diseñar una estructura interior

Es deseable a su vez que el reactor se encuentre en un ambiente aislado del exterior con un sistema de calentamiento para mantener la temperatura en el rango mesofílico (35 °C) y que a su vez permita un fácil acceso y manipulación del reactor.

El diseño se realizó en papel para hacer cambios y posteriormente se trasladó el diseño final a Solid Works.

II. DISEÑO Y ADAPTACIÓN UN SISTEMA DE MONITOREO DE PH AUTOMATIZADO.

Los sensores de pH comerciales tienden a saturarse si son introducidos directamente en el reactor lo que provocaría lecturas erróneas de este parámetro. Como solución se puede colocar el sensor en un puerto del reactor que permita retirarlo, sin embargo, esto puede provocar perdida del ambiente anaerobio y fugas del biogás, además, es poco conveniente al tener que retirar el sensor cada cierto tiempo y volverlo a calibrar.

Como solución a esto, se propuso retirar muestras líquidas del interior del reactor de la línea de recirculación mediante un sistema automatizado que a su vez mide el pH y cuenta con un sistema de limpieza del sensor para evitar su saturación. El sistema se automatizo mediante el programa Arduino.

III. INVENTARIO DE RESIDUOS DE FRUTAS Y VERDURAS (RFV) DE UN MERCADO MUNICIPAL.

En primer lugar, se realizó un estudio del manejo y disposición de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) de la ciudad de Orizaba, principalmente de mercados municipales con información proporcionada por la Dirección de Servicios Municipales. Con esta información se seleccionó un mercado municipal para la realización del inventario de RFV.

Posteriormente, se realizó el inventario de frutas y verduras con muestras del mercado municipal seleccionado durante las 4 estaciones del año, con la finalidad de obtener las especies de mayor abundancia en todo el año para las formulaciones del FOL. Se realizó el muestreo para la cuantificación de Residuos Sólidos Orgánicos Municipales (RSOM) mediante el Método de cuarteo descrito en la Norma Mexicana NMX-AA-15-1985 (PROTECCIÓN AL AMBIENTE - CONTAMINACIÓN DEL SUELO - RESIDUOS SÓLIDOS MUNICIPALES - MUESTREO - MÉTODO DE CUARTEO), con la modificación de separar los residuos inorgánicos y residuos sólidos orgánicos de difícil biodegradación (cartón, papel y residuos cárnicos, etc.), y así solo manipular en el muestreo los residuos orgánicos de frutas y verduras.

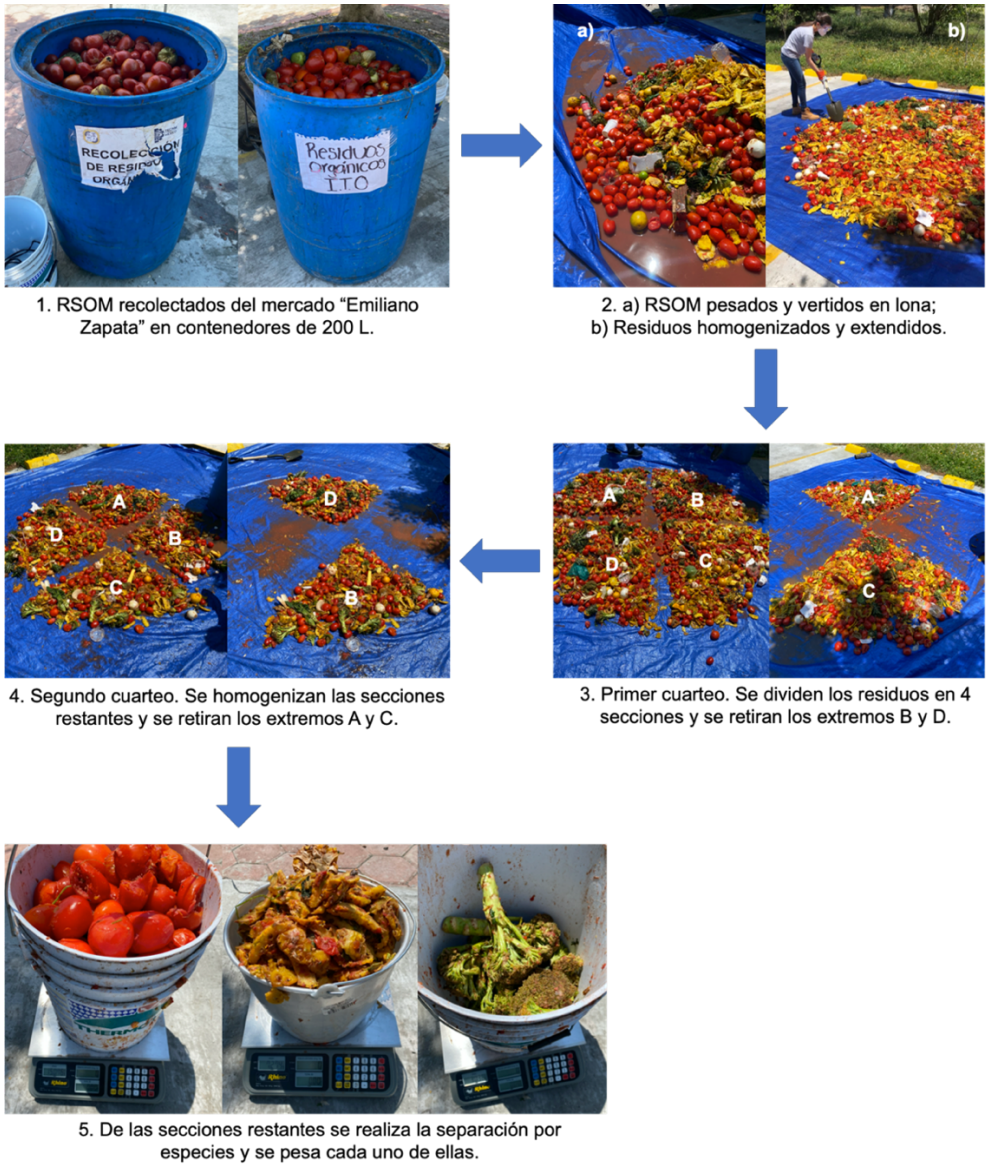
Se realizó el inventario de frutas y verduras del mercado municipal por duplicado, para la estación de Primavera, Verano, Otoño e Invierno mediante la siguiente metodología:

1. Se recolectó una muestra representativa del mercado. Se depositaron en 2 contenedores de 200 L frutas y verduras variadas de los desperdicios producidos por los locatarios del mercado.
2. Los RFV recolectados fueron transportados a las instalaciones del Instituto Tecnológico de Orizaba (ITO) para realizar el método de cuarteo.
3. Para el método de cuarteo se pesaron todos los residuos recolectados, se separó la parte líquida (lixiviado) de los Residuos Sólidos Orgánicos (RSO) recolectados y se pesó. Posteriormente se vertieron los residuos sólidos formando una pila sobre una lona de 4 m x 4 m.
4. La pila de Residuos Sólidos Orgánicos Municipales (RSOM) se homogenizó con una pala y se dividió en aproximadamente cuatro partes (A, B, C y D). Se eliminaron las

partes opuestas A y C o B y D, repitiendo la operación hasta dejar un mínimo de 50 kg de RSOM.

5. Se pesó el total de RSOM obtenidos después de realizar 2 cuarteos, y se realizó la separación de las frutas y verduras por especie. Finalmente, se pesó cada especie, y se obtuvieron los porcentajes de cada una de ellas.

El método de cuarteo para realizar el inventario se muestra de manera esquemática en la Figura 8.



1. RSOM recolectados del mercado "Emiliano Zapata" en contenedores de 200 L.

2. a) RSOM pesados y vertidos en lona; b) Residuos homogenizados y extendidos.

3. Primer cuarteo. Se dividen los residuos en 4 secciones y se retiran los extremos B y D.

4. Segundo cuarteo. Se homogenizan las secciones restantes y se retiran los extremos A y C.

5. De las secciones restantes se realiza la separación por especies y se pesa cada uno de ellas.

Figura 8. Esquema del método de cuarteo para la realización del inventario de RFV del mercado municipal de Orizaba, Ver.

Para obtener el inventario, posterior al método de cuarteo realizado por duplicado, se obtuvieron los promedios por especie (en caso de presentarse en ambos cuarteos de la estación) y sus respectivos porcentajes. Los porcentajes de cada especie se obtuvieron considerando el pesó de la parte sólida de los residuos. La parte líquida de los residuos (lixiviado) recolectados se separó y se pesó.

IV. MONITOREO, CONDICIONES DE OPERACIÓN Y RENDIMIENTOS DEL REACTOR ANAEROBIO DE BIOPELÍCULA

Durante toda la operación del reactor anaerobio de biopelícula, se determinaron de las propiedades fisicoquímicas del sustrato y de la biomasa de acuerdo a los métodos mostrados en la Tabla 6 y se cuantificó el biogás producido y su composición.

Tabla 6. Métodos para la medición de las propiedades fisicoquímicas para el sustrato y la biomasa.

Parámetro físicoquímico	Unidad	Método	Muestra
pH	-	Método potenciométrico 4500-H+ B Standard Methods	Sustrato
Sólidos Totales (ST)	mg ST/L	Método gravimétrico 2540 B Standard Methods	Sustrato y Biomasa
Sólidos Volátiles (SV)	mg SV/L	Método gravimétrico 2540 E Standard Methods	Sustrato y Biomasa
Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)	mgAGVs/L	Método de separación por cromatografía (HPLC) 5560 B Standard Methods	Sustrato
Factor de Alcalinidad	-	Método de titulación potenciométrica propuesta por Jenkins *et al.*, 1991	Sustrato
Demanda Química de Oxigeno Total (DQOt)	gDQOt/L	Método colorimétrico de flujo cerrado 5220 C Standard Methods	Sustrato
Demanda Química de Oxigeno Soluble (DQOs)	gDQOs/L		Sustrato

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL SUSTRATO

Desde el arranque del reactor anaerobio de biopelícula, se tomaron muestras del sustrato alimentado y del sustrato del interior del reactor a través de la manguera de recirculación para el monitoreo de su degradación. Se realizó el análisis de pH, Sólidos Totales (ST), Sólidos

desplazamiento de agua . Se toman muestras del biogás recolectado para el análisis de su composición mediante un cromatógrafo de gases (Buck Scientific Instruments LLC., Norwalk, Estados Unidos), con detector de conductividad térmica (TCD) formado por una columna empacada (All Tech CRTI) de 6’’de longitud y ¼’’ de diámetro, la cual capta CH_4, CO_2, O_2 y N_2. Se inyectaron 2.5 mL de muestra y se utilizó como gas de acarreo helio a 70 psi, y la columna y el detector a una temperatura de 36 °C y 121 °C respectivamente.

A partir de los datos determinados durante el monitoreo del reactor, se obtuvieron las condiciones de operación (concentración de sustrato, HRT, OLR) y los rendimientos del reactor (tasa de producción volumétrica de metano, rendimiento de metano, volumen de biogás y contenido de metano). Estos valores se reportaron para cada etapa del reactor anaerobio de biopelícula diseñado y montado para la elaboración de un FOL.

V. ETAPA I Y II: INOCULACIÓN Y ARRANQUE Y ESTIMULACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

a. INOCULACIÓN Y ARRANQUE DEL REACTOR ANAROBIO DE BIOPELÍCULA

El reactor anaerobio de biopelícula previamente diseñado y montado cuenta con una capacidad útil para la producción de FOL de 8.4 L, la cámara de biogás con una capacidad de 1.85 L.

Para el arranque del reactor anaerobio de biopelícula, se inoculó el con 5.2 L de lodos anaerobios diluidos (Figura 10) obtenidos de un reactor de hidrólisis anaerobia de la Planta Piloto de Aprovechamiento de Residuos Sólidos Municipales que se encuentra en las instalaciones del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba.

Una vez vertidos los lodos dentro del reactor anaerobio, se mantuvo durante un día sin sustrato y sin recirculación.



Figura 10. (A) Lodos anaerobios diluidos; y (B) inoculación del reactor anaerobio de biopelícula con los lodos anaerobios.

El reactor de biopelícula diseñado es tipo batch con recirculación mediante una bomba peristáltica de 3600 mL/min/canal. Se alimenta por lotes de la fracción líquida de frutas y verduras previamente seleccionadas de acuerdo el inventario de RSO del Mercado Municipal Emiliano Zapata, mediante el recipiente contenedor de sustrato y una bomba peristáltica. Durante las etapas de arranque y formación de biopelícula el reactor operó a condiciones metanogénicas, se mantuvo a una temperatura de 35 °C para propiciar las condiciones mesofílicas y un pH de entre 6.5 a 8.2, buscando un valor óptimo de 7.

La etapa de arranque del reactor anaerobio de biopelícula consistió en un periodo de 68 días con recirculación cada 12 horas a 300 mL/min, durante el cual se alimentaron 1,910 mL de sustrato concentrado. Se utilizó como sustrato la fracción líquida de jitomate, al ser la especie de mayor abundancia y presente durante todas las estaciones del año según los resultados obtenidos en el inventario de RFV del Mercado Municipal Emiliano Zapata. La fracción líquida de jitomate se obtuvo mediante trituración y filtración con una malla de 2 mm (#10).

Durante esta etapa se realizaron varias mejoras al reactor anaerobio de biopelícula:

- Se instaló un manómetro, para la detección de fugas de biogás. Se monitorearon las presiones dentro del reactor y se detectó una fuga del biogás.
- Se ajustaron los tornillos de la tapa y la chaqueta de hule hasta que no se tuvieron fugas al mantenerse la presión dentro del reactor.

a. FACTIBILIDAD DEL USO DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA COMO SUSTRATO

Para estudiar la biodegradabilidad de la fracción líquida, se utilizó el residuo de jitomate ya que es el más abundante en el mercado "Emiliano Zapata" durante dos estaciones del año (primavera e invierno), según los resultados del metodo de cuarteo. Se realizaron 8 cinéticas de la fracción líquida de jitomate en un anaerobio de biopelícula. El sustrato alimentado se obtuvo del mismo lote de residuos de jitomate, del cual se obtuvo la fracción líquida mediante su trituración y filtrado a través de una malla de 2 mm (#10). La concentración inicial del sustrato utilizado fue de 12 g DQO/L.

En las Cinéticas 3, 4, 5 y 7 se estudió la fracción soluble (parte líquida) (3 y 6) y la fracción sólida (parte sólida) (5 y 7) de la fracción líquida del jitomate, para lo cual, se centrifugó el sustrato previamente filtrado y se recuperó la fracción líquida (sobrenadante) y la fracción sólida por separado para la alimentación del reactor. En la Tabla 7 se muestran las condiciones de alimentación y duración para cada cinética de jitomate realizada.

Tabla 7. Condiciones de alimentación y duración de las cinéticas de la fracción líquida de jitomate como sustrato.

Cinética	Sustrato	Sustrato (mL)	Dilución	Duración (días)	Duración (h)
1	Fracción líquida de Jitomate	500	1:3.3	11.16	267.91
2	Fracción líquida de Jitomate	500	1:3.3	11.24	269.77
3	Parte líquida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	530	1:3.3	4.84	116.108
4	Parte sólida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	250	1:3.3	27.85	668.52
5	Fracción líquida de Jitomate	500	1:3.3	4.85	116.359
6	Parte líquida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	382	1:3.3	2.97	71.35
7	Parte sólida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	118	1:3.3	3.81	91.4
8	Fracción líquida de jitomate	500	1:2	4.95	118.75

Para cada cinética se realizó la medición de la producción biogás de manera continua y la obtención de las velocidades instantáneas y la velocidad máxima de producción de biogás. El potencial de producción de metano se realizó obteniendo los rendimientos de biogás y metano por gramo de SV alimentado para las cinéticas 5, 8 y una cinética alimentando la fracción líquida de jitomate concentrado.

b. COMPARACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE LA FRACCIÓN LIQUIDA POR ESPECIE VEGETAL

Se realizaron cinéticas de las tres principales especies según los resultados obtenidos del inventario de frutas y verduras. Las condiciones de operación de cada cinética se presentan en la Tabla 8. Se alimentó un valor similar de concentración de sustrato (g DQO/L) de la Fracción Líquida 2 (FL-2) de cada especie (jitomate, lechuga, naranja). La Fracción Líquida 2 (FL-2) se obtuvo mediante trituración y filtración usando una criba de 0.2 mm (#70). Cada cinética se ajustó considerando la respiración endógena como se describe en la siguiente sección y su duración se determinó al tener una curva de producción de biogás y metano con pendiente 0. La duración de cada cinética oscilo entre 43.16 y 51.03 horas.

Tabla 8. Condiciones de operación de las cinéticas por especie (jitomate, lechuga, naranja).

No. Cinética	Sustrato	Sustrato (mL)	Dilución del sustrato	Duración (días)	Duración (h)	Concentración del sustrato (gDQOt/L)	Caudal Q (L/d)	HRT (d)	OLR (gDQO/L d)
1	FL-2 Jitomate	230	1:2	1.94	46.55	29.90	0.12	70.84	0.42
2	FL-2 Jitomate	230	1:2	1.99	47.80	29.90	0.12	72.73	0.41
3	FL-2 Jitomate	230	1:2	1.91	45.90	29.90	0.12	69.84	0.43
4	FL-2 Lechuga	319	1:2	2.13	51.03	21.50	0.15	55.99	0.38
5	FL-2 Lechuga	319	1:2	1.88	45.03	21.50	0.17	49.41	0.44
6	FL-2 Lechuga	319	1:2	1.81	43.54	21.50	0.18	47.77	0.45
7	FL-2 Naranja	90	1:2	1.91	45.75	76.60	0.05	177.90	0.43
8	FL-2 Naranja	90	1:2	1.80	43.16	76.60	0.05	167.84	0.46
9	FL-2 Naranja	90	1:2	1.82	43.75	76.60	0.05	170.12	0.45

c. AJUSTE DE LAS CURVAS DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS CONSIDERANDO LA RESPIRACIÓN ENDÓGENA

La respiración endógena (RE) (es decir, la autodestrucción de la biomasa, el mantenimiento celular, la depredación y la muerte y lisis celular) se produce durante el proceso de degradación y disminuye la concentración de biomasa activa (Maleki *et al*., 2018). Cuando los microorganismos mueren, se descomponen en carbohidratos y proteínas (a través del proceso de desintegración) y serán consumidos como sustrato por microorganismos viables (Kythreotou *et al.* 2014; Maleki *et al*., 2018). El proceso de respiración endógena contribuye a la producción de biogás y, por lo tanto, debe ser considerada para obtener la producción real a partir del sustrato durante las pruebas del potencial bioquímico de metano.

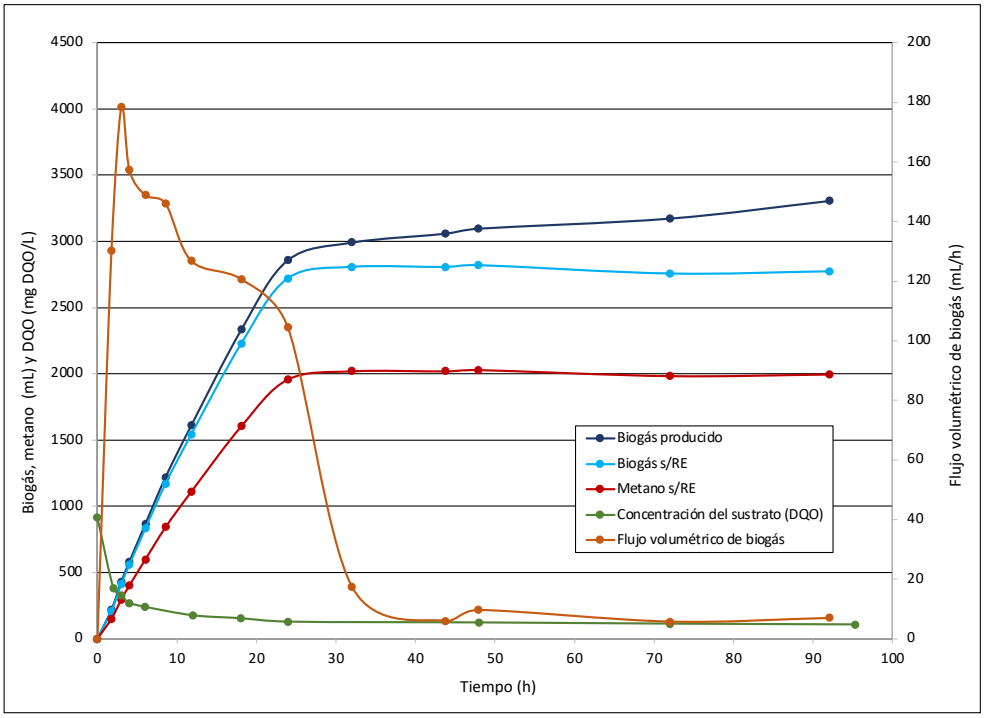


Figura 13. Gráfica de Biogás (mL) y Metano (mL) sin Respiración Endógena (RE) alimentando la Fracción Líquida 2 (FL-2) de Naranja al reactor anaerobio de biopelícula.

Se ajustaron las curvas de producción de biogás para cada lote del reactor anaerobio de biopelícula considerando la cantidad de biogás producido a partir de la respiración endógena, basándose en el método descrito por Ajeej, *et al.* (2016) y Thanikal, *et al.* (2015). Se consideró las gráficas del flujo volumétrico de biogás (mL/h) y la degradación del sustrato (mg DQO/L) para observar el comienzo de la respiración endógena (pendiente ≅ 0). Se

obtuvo el promedio del flujo volumétrico de biogás a partir del comienzo de la actividad endógena. Este promedio del flujo volumétrico de biogás (mL/h) se utilizó para obtener el biogás producido durante el periodo de respiración endógena y se restó al biogás monitoreado para obtener la gráfica ajustada de biogás (mL).

En la Figura 13 se muestran las gráficas ajustadas correspondientes a la FL-2 de Naranja y en la Figura 14 las gráficas ajustadas de la FL-2 de Naranja.

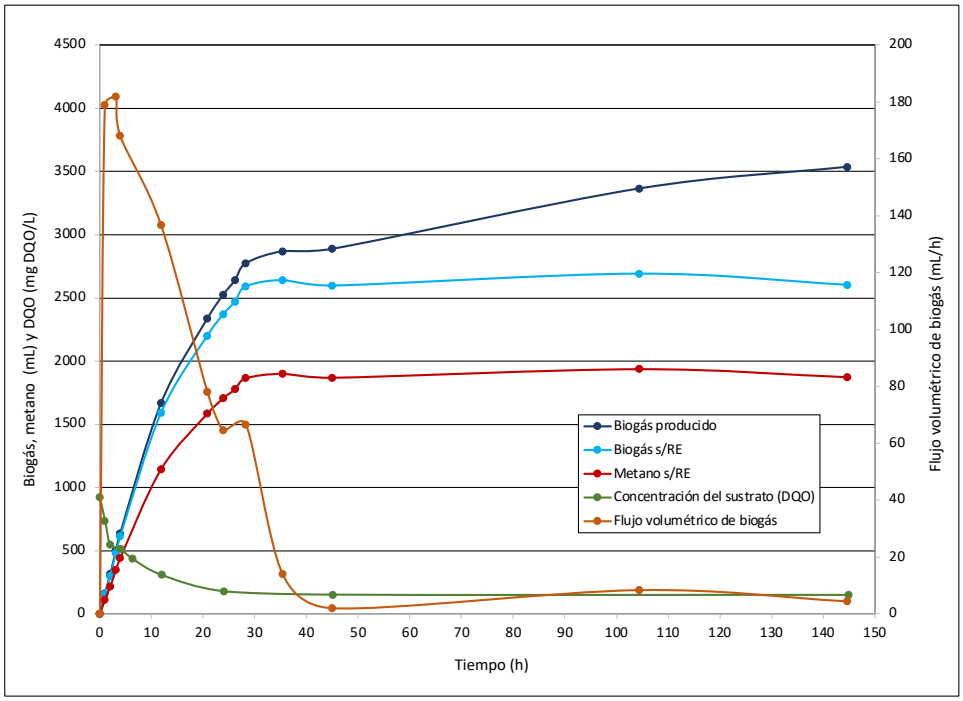


Figura 14. Gráfica de Biogás (mL) y Metano (mL) sin Respiración Endógena (RE) alimentando la Fracción Líquida 2 (FL-2) de Lechuga al reactor anaerobio de biopelícula.

d. MODELADO DE DATOS EXPERIMENTALES DE PRODUCCIÓN DE METANO (MODELO DE GOMPERTZ SIMPLE Y MODIFICADO)

La producción de metano durante las pruebas del potencial bioquímico se modeló ajustando los datos experimentales de producción de metano con el modelo de Gompertz simple o de primer orden (Ecuación 1) y el modelo de Gompertz modificado (Ecuación 2) (Nielfa *et al.*, 2015; Shamurad *et al.*, 2020), mediante Solver de MS-Excel®.

$$Y = Y_m[1 - \exp(-kt)] \quad (1)$$

$$Y = Y_m \cdot \exp\left\{-exp\left[\frac{R_{max} \cdot e}{Y_m}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (2)$$

Donde Y es la producción acumulada de metano (mL CH_4) en un tiempo de digestión en horas; Y_m es el potencial máximo de metano (mL CH_4); k es la constante de velocidad de producción de biogás (constante de velocidad de degradación del sustrato) (1/h); R_{max} es la tasa máxima de producción de metano (mL CH_4/h); e es una constante con valor de 2.71828 y; λ es la fase lag o de retardo (h). Para describir la bondad del ajuste entre el rendimiento experimental de metano y el rendimiento de metano predicho por el modelo, se calcularon el coeficiente de correlación (R^2) y el error cuadrático medio (ECM). La función Solver de Excel se utilizó para iterar los valores de las constantes de tal manera que el ECM fuera el menor posible. El error cuadrático medio (ECM) se calculó utilizando la ecuación 3.

$$ECM = \sqrt{\left(\frac{1}{m}\sum_{j=1}^{m}\left(\frac{d_j}{Y_j}\right)^2\right)} \quad (3)$$

Donde m es el número de pares de datos; j son los j-ésimos valores; Y es la producción de metano medida (mL); d son las desviaciones (diferencias) entre el rendimiento de metano experimental y el predicho.

e. BALANCE DE ST EN LAS FRACCIONES SÓLIDAS (FS) Y LÍQUIDAS (FL)

Se realizó el balance de materia (ST) para la obtención de la fracción líquida 2 (FL-2) de los residuos de frutas y verduras previamente seleccionados (jitomate, lechuga y naranja), a partir de la fracción líquida 1 (FL-1) con una criba de 0.05 mm (#270). El balance se realiza considerando la fracción sólida 2 (FS-2) que corresponde al residuo de la filtración de la FL-1, la muestra de la FL-1 tomada para realizar pruebas fisicoquímicas y la merma. La FL-1 se obtiene previamente al filtrar el residuo de frutas y verduras previamente seleccionado y triturado a través de una malla de 2 mm (#10).

VII. PRUEBAS DE HIDRÓLISIS ANAEROBIA PARA LA FORMULACIÓN DEL FOL

Después de realizar las pruebas del potencial bioquímico de metano mediante cinéticas por especie de jitomate, lechuga y naranja, se cambiaron las condiciones de operación del reactor anaerobio de biopelícula para la hidrólisis anaerobia de la fracción líquida (FL) de residuos de frutas y verduras (RFV) previamente seleccionadas (jitomate, lechuga y naranja). La etapa de adaptación a las condiciones hidrolíticas del reactor duró 40 días. Se alimentó la FL-2 de jitomate, lechuga y naranja, según su disponibilidad en el mercado municipal de estudio "Emiliano Zapata".

Posteriormente, para aumentar el contenido de nitrógeno del FOL, se adicionó una fuente con alto contenido proteico (cascara de camarón) a la mezcla de frutas y verduras. Se realizó la hidrólisis anaerobia de la FL-2 de una mezcla de los residuos de jitomate, lechuga y naranja (JLN) adicionado con la FL-1 de cascara de camarón en el reactor anaerobio de biopelícula. Las condiciones de operación para ambas etapas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de operación del reactor anaerobio de biopelícula para la hidrólisis anaerobia de a) fracción líquida de frutas y verduras (FL-FV) y b) fracción líquida de frutas y verduras complementada con una fuente proteica (FL-FV + fuente proteica)

Hidrólisis anaerobia	**a) FL-FV**	**b) FL-FV + fuente proteica**
Duración (días)	40	20
Sustrato	FL-2 jitomate, lechuga y naranja	FL-2 jitomate, lechuga y naranja FL-1 cascara de camarón
Sustrato (L)	425	352.8
Dilución	01:02.5	01:02.5
pH Sustrato	4.90 ± 1.30	5.25 ± 0.42
Concentración del sustrato (g-DQO/L)	24.15 ± 8.25	35.14 ± 10.61
Caudal Q (L/d)	11.32	12.6
TRH (d)	4.42	3.97
OLR (g-DQO/L d)	5.47	8.86

El rendimiento del reactor anaerobio de biopelícula durante este periodo se evaluó tomando muestras del influente y el efluente para medir los parámetros fisicoquímicos: 1) pH a través del sistema de monitoreo previamente descrito. 2) Demanda Química de Oxígeno (DQOt) por el método colorimétrico de flujo cerrado 5220 C (Standard Methods) utilizando un reactor de DQO 839800 (Hanna Instruments, Rhode Island, EE.UU.) y un fotómetro de DQO de alto rango A-7325 (CHEMetrics, Virginia, EE.UU.); 3) Sólidos Volátiles (SV) utilizando el Método Gravimétrico 2540 E (Standard Methods).

a. CARACTERIZACIÓN DE LOS FOL OBTENIDOS

Se caracterizó el efluente de la hidrólisis anaerobia de a) la fracción líquida de frutas y verduras (FL-FV) y b) la fracción líquida de frutas y verduras complementada con una fuente proteica (FL-FV + fuente proteica), para medir la concentración de los principales nutrientes de interés para el crecimiento de las plantas (N, P, K). Los métodos y equipos utilizados para la medición de nutrientes se reporta en la Tabla 10.

Tabla 10. Metodos y equipos utilizados para la medición de macronutrientes en los FOL.

Macronutriente	Metodo	Equipo
Nitrogeno (N)	Nitrógeno Total Kjeldahl NMX-AA-026-SCFI-2010	-
Fosforo (P)	Adaptación de los Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18ª edición, método del azul de heteropolimolibdeno.	Phosphate High-Range Checker® HC - HI717 (Hanna Instruments, Rhode Island, USA)
Potasio (K)	Adaptación del método turbidimétrico del tetrafenilborato	Potassium Low and Medium-Range Portable Photometer with CAL Check – HI97750

El efluente obtenido de la hidrólisis anaerobia de la fracción líquida de frutas y verduras adicionado con una fuente de proteína se estabilizó con un tratamiento térmico a 70°C durante 1 h. Una vez estabilizado, se obtiene como producto final un FOL para la nutrición base de cultivos.

VIII. PRUEBAS DE EFICIENCIA DEL FOL

Se obtuvo la aprobación de un proyecto titulado “Valorización de residuos sólidos de frutas y verduras para la producción de un fertilizante orgánico líquido por medio de hidrólisis anaerobia” (CP 0111 1258/2023) en la SEGUNDA CONVOCATORIA DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE DESARROLLO TECNOLÓGICO, financiado por el Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (COVEICYDET). En este proyecto se contempla el uso del FOL producido durante esta tesis para el cultivo de una especie vegetal con relevancia en la Región de las Altas Montañas de Veracruz. Por lo cual, seleccionó la flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) para su aplicación.

a. CULTIVO DE UNA ESPECIE VEGETAL (FLOR DE CALABAZA)

Se sembraron 72 semillas de flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en el Instituto Tecnológico de Orizaba, con el apoyo de agricultores del Instituto Tecnológico Superior de Zongolica, los cuales forman parte del proyecto mencionado anteriormente. Se plantaron 2 semillas por surco y se dividió la parcela en 3 partes iguales (24 plantas por sección).



(a) **(b)**

Figura 15. (a) Semilla y (b) Cultivo de Flor de Calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en Instituto Tecnológico de Orizaba.

b. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL FOL CON UN FERTILIZANTE INORGANICO (FI) APLICADO EN FLOR DE CALABAZA

Para analizar la eficiencia del FOL se planteó un Diseño de Experimento (DOE) por bloques aleatorizados, con 3 tratamientos: T1) Control (sin fertilizante); T2) Fertilizante Orgánico Líquido (FOL, este estudio); y T3) Fertilizante inorgánico (FI). Las semillas se plantaron de manera aleatoria, sin ser previamente seleccionadas. Los tratamientos se aplican a las secciones previamente divididas, y cada sección cuenta con 24 plantas (2 plantas por surco).

Según lo reportado por Apáez-Barrios *et al.,* (2019), la fertilización es necesaria después del crecimiento de las dos primeras hojas verdaderas de la flor de calabaza y los requerimientos por planta para una fertilización inorgánica son: 2.88 g de Urea (46 N) y 4.3 g de Fosfato diamónico (18 N 46 P) durante 25 días y posteriormente 2.88 g de Urea durante 20 días. Los requerimientos de Nitrógeno por planta de flor de calabaza son de 105 mg N durante 25 días y 66 mg N durante los 20 días posteriores. Se obtuvieron las equivalencias para que el FOL (6 g N/L) cumpliera con las necesidades de Nitrógeno. La dosis de aplicación diaria de los Tratamientos 2 (FOL) y 3 (FI), se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Dosis de aplicación diaria de Tratamientos 2 (FI) y 3 (FOL) por planta de Flor de Calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

Periodo de aplicación (d)	**T2 (FOL)**	**T3 (F1)**
	Dosis de aplicación por planta (mL)	**Dosis de aplicación por planta (g)**
25 días	17.8	Urea: 2.88 Fosfato diamónico: 4.3
20 días	11.2	Urea: 2.88

Se monitorearon las variables de respuesta de crecimiento y rendimiento del cultivo por planta para los 3 tratamientos: 1. longitud de tallo (cm); 2. diámetro de tallo (mm); 3. longitud de hoja (cm); 4. ancho de hoja (cm); 5. rendimiento de cultivo (no. de flores). Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianzas (ANOVA).

II. DISEÑO Y ADAPTACIÓN UN SISTEMA DE MONITOREO DE PH AUTOMATIZADO.

Se diseñó un sistema de monitoreo de pH automatizado y se adaptó al reactor anaerobio de biopelícula para la producción de un FOL.

El sistema cuenta con los componentes mostrados en la Tabla 14. Estos componentes se integraron y colocaron en la parte posterior del cuarto de temperatura controlada como se observa en la Figura 39. El sistema de monitoreo de pH funciona de la siguiente manera:

Tabla 14. Componentes del sistema de monitoreo de pH para un reactor anaerobio de biopelícula.

Cantidad	Componente
1	Sensor de pH con módulo PH-4502C
1	Conector BNC
1	Microcontrolador (Arduino Nano)
1	Cable USB – Mini-B
1	Protoboard
1	Módulo de 4 reveladores 5VDC
8	Cable dupont
1	Caja de proyectos
1	Eliminador de 12 VDC
1	Cable duplex calibre 18
6	Terminal conector zapata hembra
3	Electroválvula solenoide de ½” N/C 12VDC
7	Conector rápido hembra ½” - manguera de ¼”
1	Conector rápido T para manguera de ¼”
1	Manguera neumática transparente ¼”
1	Recipiente para toma de muestra (PVC cédula 40)
1	Recipiente para agua destilada (PVC cédula 80)
1	Recipiente de plástico para descarga
1	Computadora

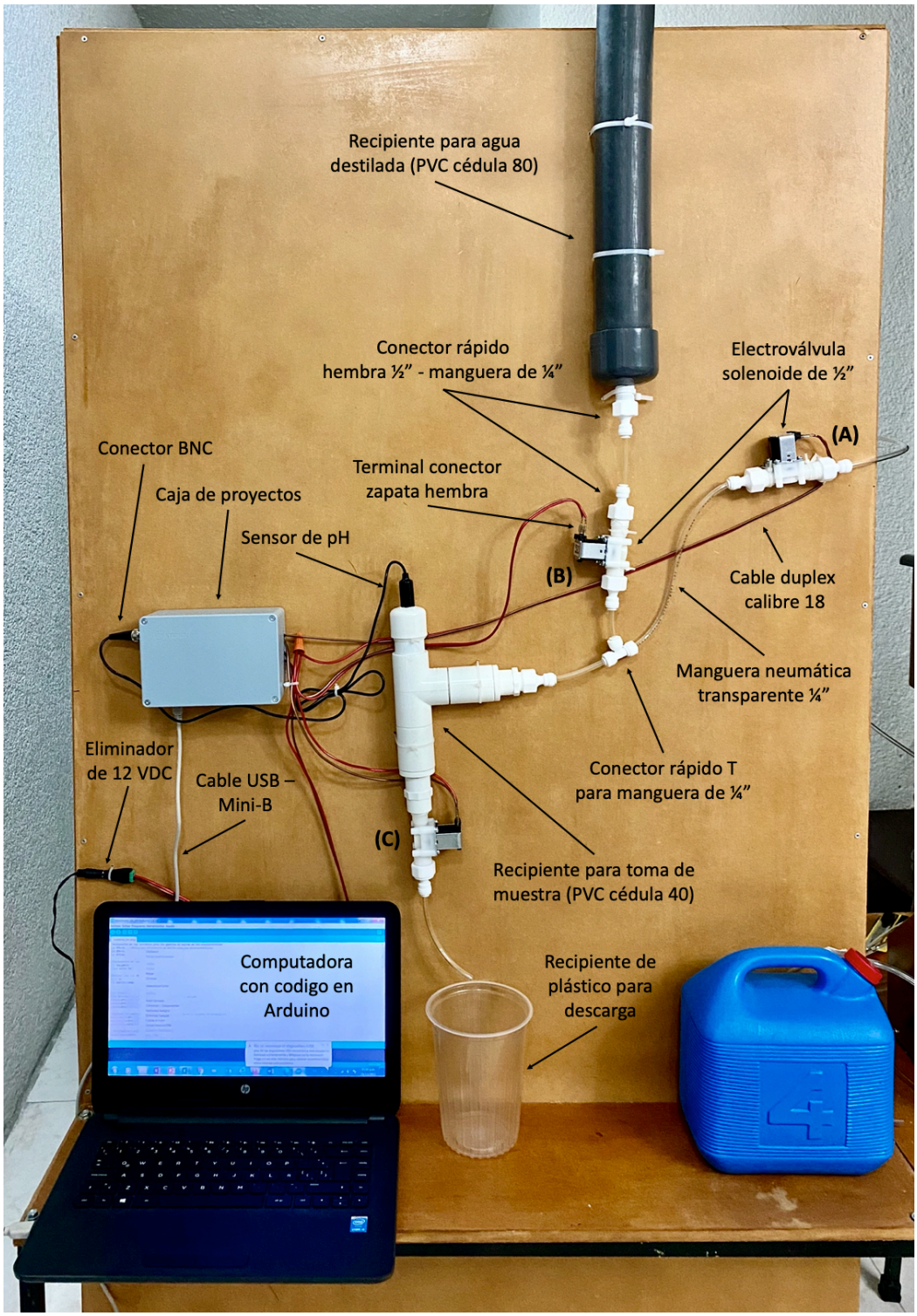


Figura 39. Componentes del sistema de monitoreo de pH adaptado a un reactor anaerobio de biopelícula. (A) Electroválvula para la toma de muestra; (B) electroválvula para enjuague del sensor de pH; y (C) electroválvula para descarga (muestra y agua destilada).

1. La electroválvula solenoide (Figura 39A), está conectada a la recirculación del reactor anaerobio de biopelícula. Cuando se abre la electroválvula permite la entrada del sustrato al recipiente para toma de muestra donde se encuentra el sensor de pH.
2. El sensor de pH (Figura 39) realiza la lectura del pH de la muestra y el valor es registrado en el programa Arduino.
3. Una vez registrado el pH, se abre la electroválvula (Figura 39C) y la muestra tomada se descarga en el recipiente de plástico.
4. Posteriormente, se abre la electroválvula (Figura 39B) y permite el paso del agua destilada que se encuentra en el recipiente PVC cédula 80. El agua destilada pasa al recipiente para toma de muestra y enjuaga el sensor de pH.
5. Para descargar el agua destilada de enjuague se abre la electroválvula (Figura 39C) que permite su paso al recipiente de plástico.

Tanto las electroválvulas solenoides (A, B, C), como el sensor de pH, están controlados de manera automática mediante los componentes electrónicos a través de un código programado en Arduino.

Los componentes electrónicos (sensor de pH con módulo PH-4502C, microcontrolador (Arduino Nano), protoboard y módulo de 4 reveladores 5VDC) se encuentran ensamblados dentro de la caja de proyectos como se observa en la Figura 40.

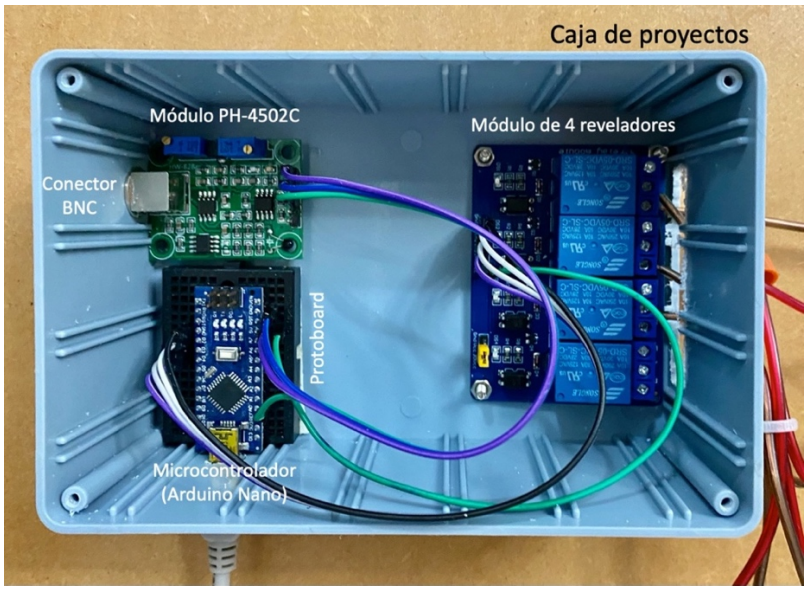


Figura 40. Ensamblaje de componentes electrónicos para el sistema de monitoreo de pH.

El Arduino Nano (5V, 8-bit) es un microcontrolador basado en ATmega328 que contiene una placa electrónica PCB (Printed Circuit Board) reprogramable y es el encargado de ejecutar las instrucciones programadas en el programa Arduino. El Arduino Nano se coloca en un protoboard y funciona con un cable Cable USB – Mini-B conectado a la computadora (Arduino, 2021).

El módulo de 4 relevadores (5VCD) recibe la señal del Arduino Nano y los relés del módulo se conectan a las electroválvulas. Los relés funcionan como un interruptor al permitir o interrumpir el paso de la corriente y así abrir o cerrar cada electroválvula.

Al abrirse la electroválvula (Figura 39B) el módulo PH-4502C realiza la lectura del pH de la muestra mediante el electrodo E201 para un conector BNC (Figura 41). El pin Po del módulo se conecta a un pin analógico del Arduino Nano, el cual es el encargado de recibir las lecturas de la diferencia de voltaje detectada por el sensor y calcular y registrar el valor del pH mediante el código programado en Arduino. El circuito es alimentado por un Eliminador de 12 VDC 2 A, conectado a la toma de corriente y es el encargado de convertir la corriente alterna (CA) a corriente directa (CD) de bajo voltaje.

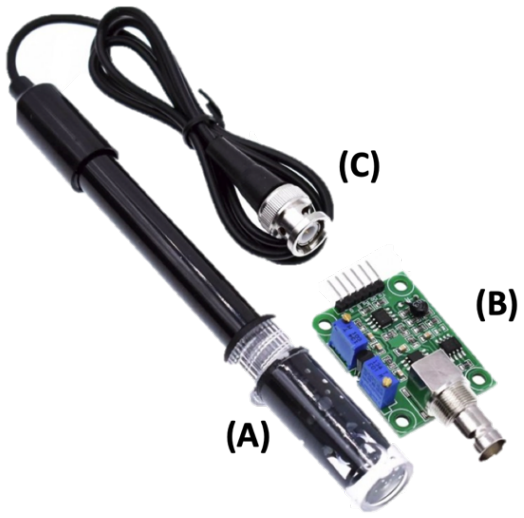


Figura 41. (A) Sensor de pH (electrodo E201); (B) módulo PH-4502C; y (C) conector BNC.

Para registrar el valor correcto de medición del pH, se calibró el sensor utilizando soluciones buffer de pH conocido (Figura 42) y se obtuvieron diferentes valores de voltaje. Con los

valores de pH y los de voltaje se obtuvo una ecuación lineal para realizar la conversión de la señal el programa de manera correcta.



Figura 42. Soluciones buffer para calibración del sensor de pH.

Una vez montado y calibrado el sistema de monitoreo de pH automatizado, se probó su funcionamiento en soluciones de pH conocido (4.01, 6.86 y 9.18). Para las 3 soluciones de pH conocido se realizaron las lecturas mediante el sensor de pH y se registraron las mediciones en un periodo de tiempo (s) a través del código programado en el software Arduino. Las lecturas obtenidas para las soluciones de pH 4.01, 6.86 y 9.18, se muestran en las Figuras 43, 44 y 45 respectivamente.

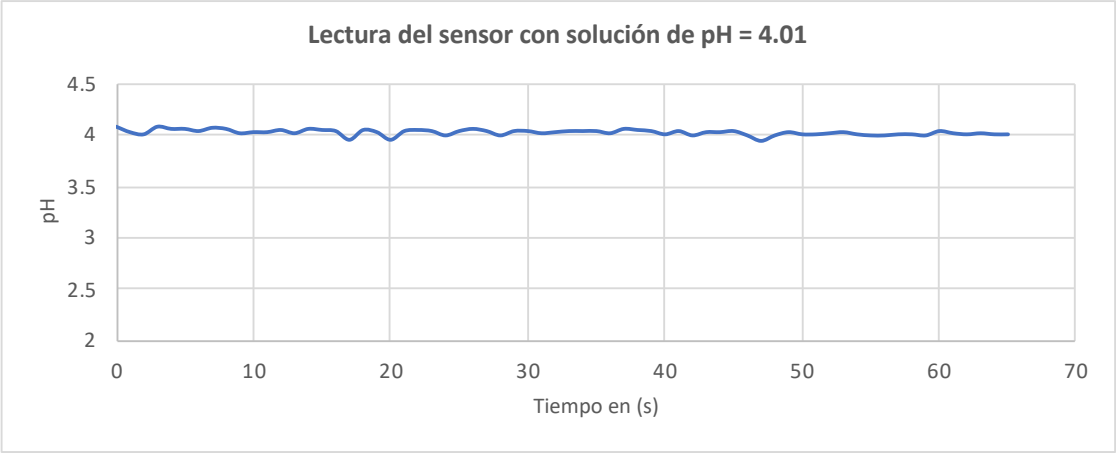


Figura 43. Gráfica de la medición de pH vs t para la solución de pH 4.01.

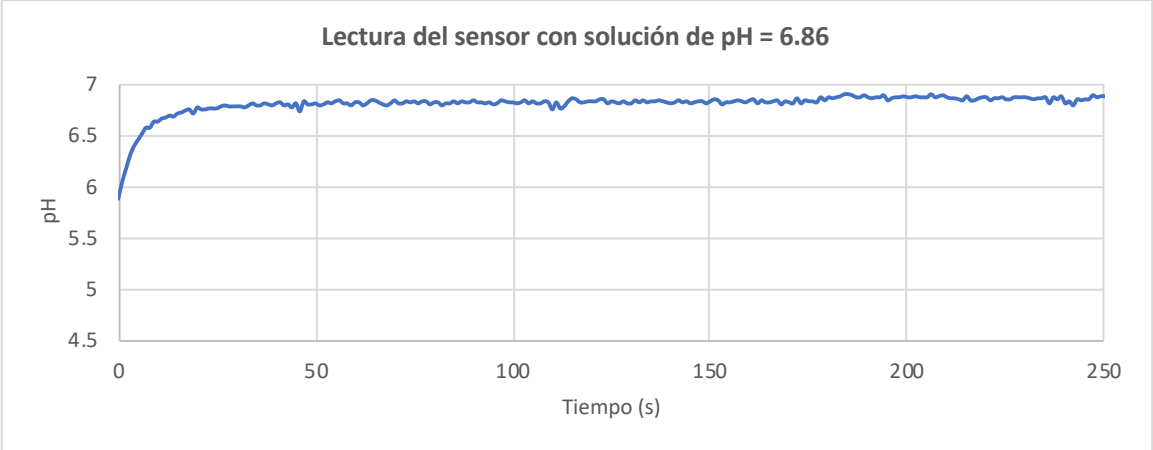


Figura 44. Gráfica de la medición de pH vs t para la solución de pH 6.86.

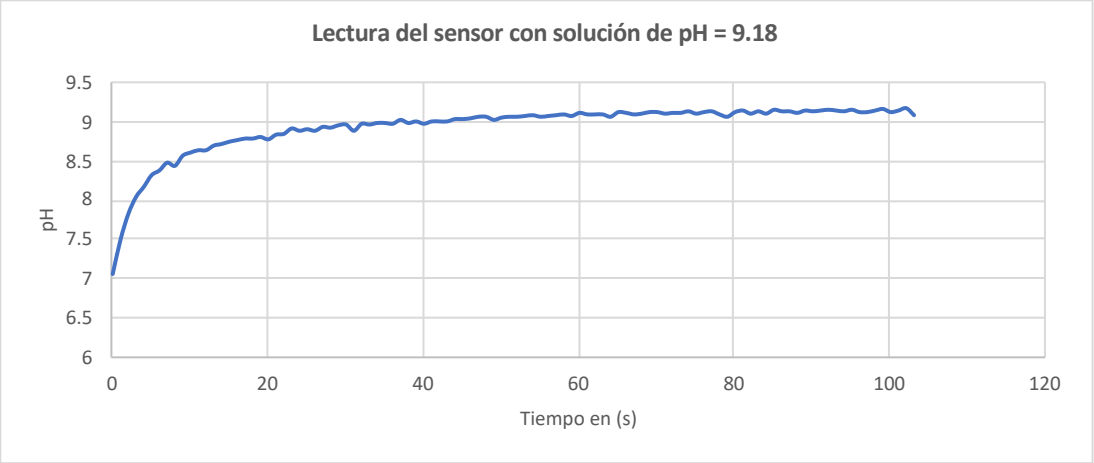


Figura 45. Gráfica de la medición de pH vs t para la solución de pH 9.18.

Se puede observar que las mediciones de pH mediante el sistema automatizado son estables y precisas, por lo cual es adecuado para su uso en las muestras tomadas del reactor anaerobio de biopelícula.

III. INVENTARIO DE RESIDUOS DE FRUTAS Y VERDURAS (RFV) DE UN MERCADO MUNICIPAL.

a. MANEJO Y DISPOSICIÓN DE LOS RSU EN ORIZABA Y EN EL MERCADO MUNICIPAL EMILIANO ZAPATA

Se realizó un esquema general del manejo de los RSU en la ciudad de Orizaba, Ver. (Figura 46), enfocándose principalmente en los mercados municipales, con la información proporcionada por la Dirección de Servicios Municipales.

De los mercados de Orizaba, se seleccionó el Mercado Municipal Emiliano Zapata para la realización del inventario de frutas y verduras, al producir una mayor proporción de residuos orgánicos en comparación con los otros mercados. Se puede observar en la Figura 46 que es el segundo en tamaño por cantidad de comerciantes y cantidad de residuos, con 1,400 comerciantes y 15 toneladas diarias de residuos, de las cuales el 90% corresponden a Residuos Sólidos Orgánicos Municipales (RSOM).

El Mercado Municipal Emiliano Zapata se ubica en Oriente 9 A, Colonia Emiliano Zapata, C.P.: 94320, Orizaba, Ver., se puede observar la ubicación satelital obtenida de Google Maps en la Figura 47. El plano oficial del mercado con la disposición de las naves proporcionado por la Dirección de Servicios Municipales se muestra en la Figura 48.

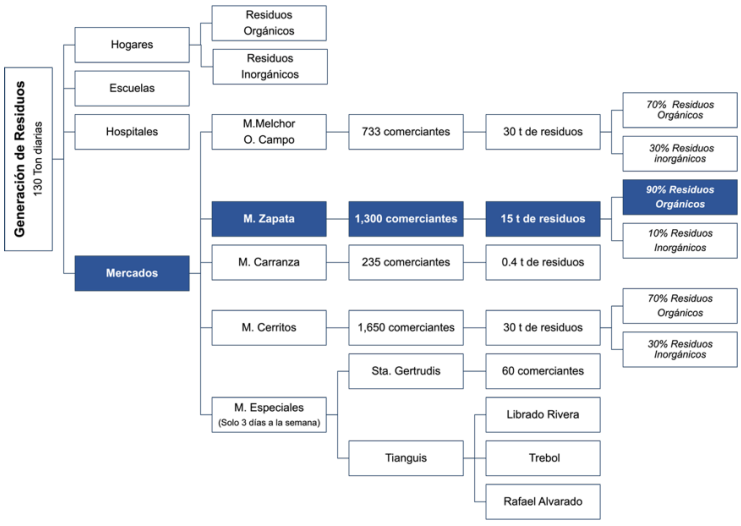


Figura 46. Esquema de Generación de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) en Orizaba, Veracruz (cantidad de residuos producidos en toneladas).

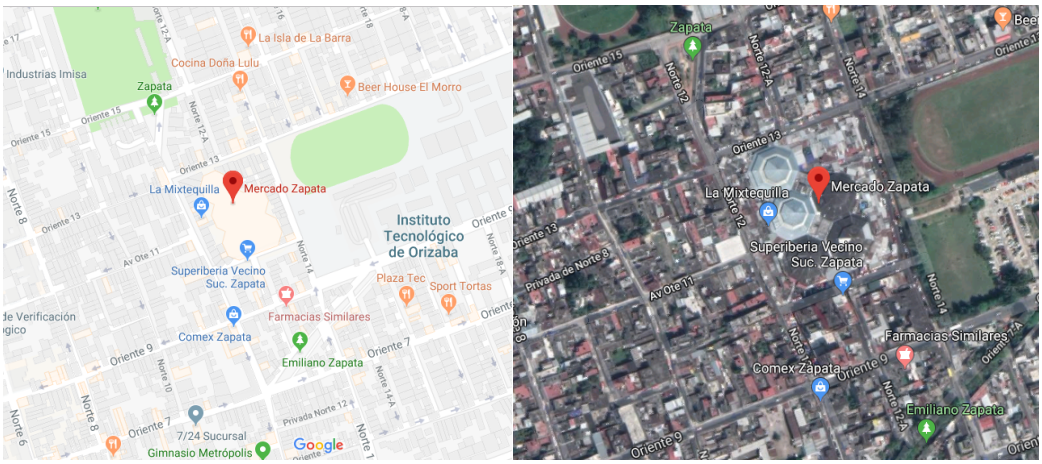


Figura 47. Ubicación satelital del Mercado Emiliano Zapata en Orizaba, Ver. obtenida de Google Maps.

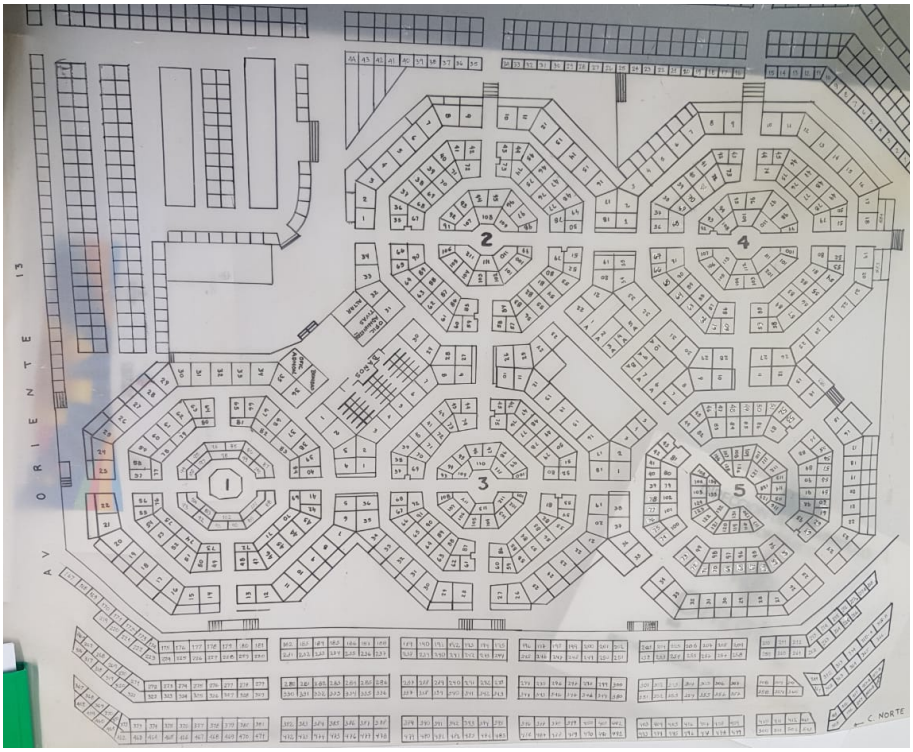


Figura 48. Plano Oficial de Mercado Emiliano Zapata.

El Mercado Emiliano Zapata consta de 1,300 locatarios los cuales están distribuidos en categorías generales:

- **Perecedero:** son aquellos que comercializan frutas, verduras, flores, hierbas, semillas, productos cárnicos y sus derivados. Estos corresponden al **60% total** de comerciantes (aprox. 780 locatarios).
- **Ropa y confección:** son aquellos dedicados a la venta de ropa nueva y/o usada, calzado, sombreros, etc. Estos corresponden al 10% total de comerciantes (aprox. 130 locatarios).
- **Comida:** incluye a todos aquellos dedicados a la venta de comida preparada (comida corrida, antojitos, pan, etc.). Esta categoría corresponde al 17% del total de comerciantes (aprox. 221 locatarios)
- **Otros:** incluye todo aquello no mencionado en las categorías anteriores, como artículos misceláneos, electrodomésticos, abarrotes por mayoreo y menudeo, etc. Estos corresponden al 13% del total de los comerciantes (aprox. 169 locatarios).

Los residuos generados en el mercado municipal estudiado varían, los días con mayor cantidad de residuos son el **miércoles y sábado de cada semana** y coinciden con los días de llegada de mercancía al mercado. Una vez desechados los residuos son separados en orgánicos e inorgánicos y recolectados mediante rutas preprogramadas por el municipio. De las 15 t diarias de RSM producidos en este mercado, el 90% corresponde a Residuos Sólidos Orgánicos (RSO) (aprox. 13.5 t diarias) y 10% corresponde a Residuos Sólidos Inorgánicos (RSI) (aprox. 1.5 t diarias).

Para la recolección de RSU en el Mercado Emiliano Zapata se cuenta con 12 personas de limpia pública municipal que realizan 7 turnos en la mañana y 5 en la tarde. Este personal está encargado de barrer el mercado y sus límites exteriores 2 veces al día. De igual manera, se encargan de la recolección de residuos sólidos orgánicos e inorgánicos separados mediante unidades recolectoras para residuos. Los residuos recolectados y separados son recogidos por camiones de basura para RSO y RSI y un supervisor se encarga de corroborar que la colecta de los residuos sea la correcta. El esquema de recolección de RSU para su disposición final se observa en la Figura 49.



Figura 49. Recolección de RSU del Mercado Emiliano Zapata. (A) Camión de recolección de basura para RSO; (B) Camión de recolección de basura llegando al Mercado Emiliano Zapata; (C) Unidades recolectoras de RSO (verde) y RSI (amarillo); y (D) RSO recolectados por el camión de basura para su disposición final.

b. INVENTARIO DE FRUTAS Y VERDURAS DEL MERCADO MUNICIPAL EMILIANO ZAPATA

El inventario de frutas y verduras se realizó con muestras del Mercado Municipal Emiliano Zapata durante las 4 estaciones del año, con la finalidad de obtener las especies de mayor abundancia en todo el año para las formulaciones del FOL.

Del método de cuarteo realizado por duplicado para cada estación del año, se obtuvieron los inventarios de RSO por especie. Los inventarios de las estaciones Primavera, Verano, Otoño e Invierno con los porcentajes correspondientes para cada especie se observan en las Figuras 50, 51, 52 y 53 respectivamente. Se puede observar que las principales especies obtenidas en Primavera son: jitomate, piña, naranja, brócoli y cebolla; en Verano: naranja, mango, limón, melón y chayote; en Otoño: lechuga, cebolla, naranja, calabacita y mandarina; y en Invierno: jitomate, naranja china, lechuga, naranja y acelga.

En la Tabla 15, se observa la comparación de las especies y la proporción (%) en la que se encuentran en cada estación. Las especies se presentan ordenadas de mayor a menor cantidad

y se marcó con gris las especies que se encuentran presentes en al menos 3 de las estaciones del año con mayor abundancia. Considerando estos dos factores (cantidad y presencia en las estaciones), se considera que las especies de interés para su estudio son: **jitomate, naranja, lechuga, brócoli, cebolla, chayote y tomate verde**. A partir de la fracción soluble de estas especies se realizará las formulaciones para el FOL.

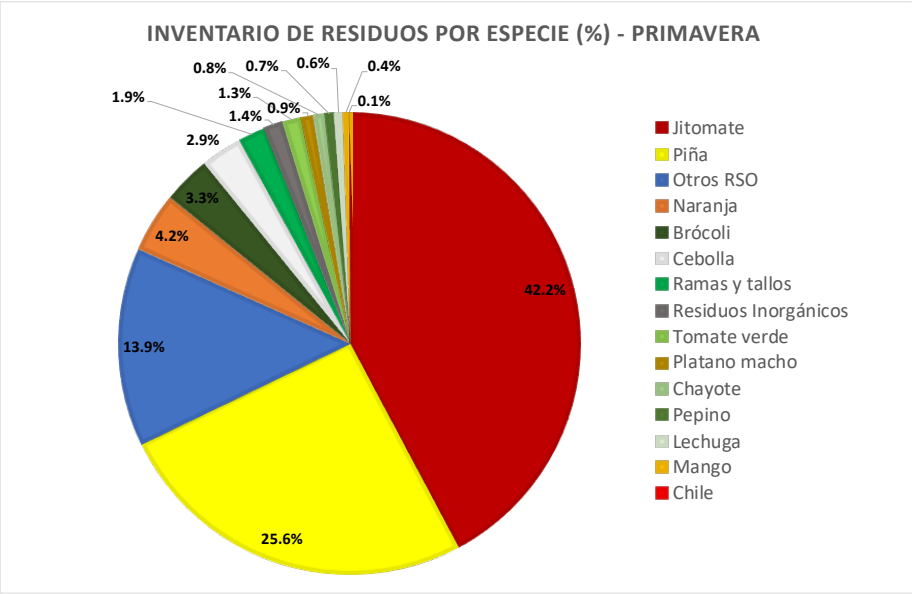


Figura 50. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Primavera.

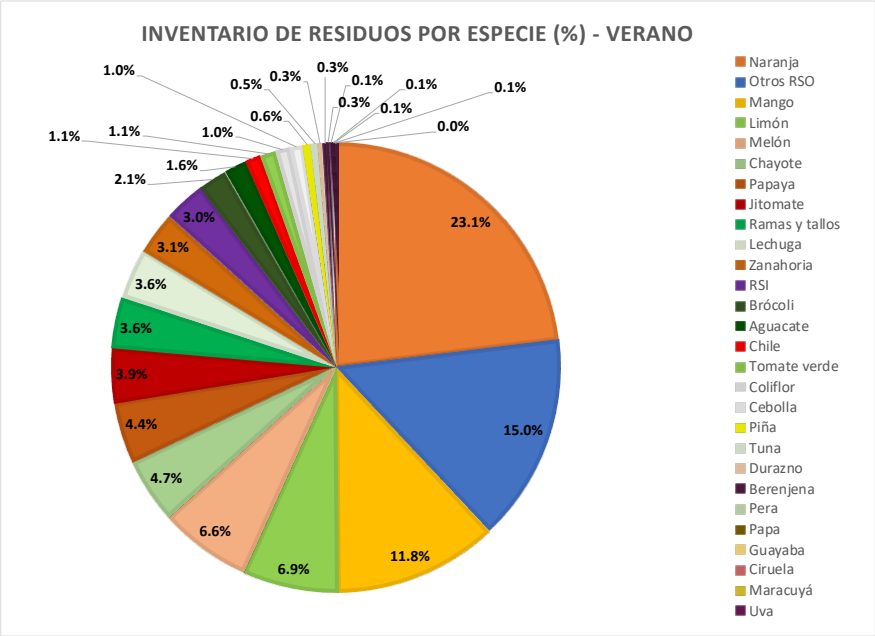


Figura 51. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Verano.

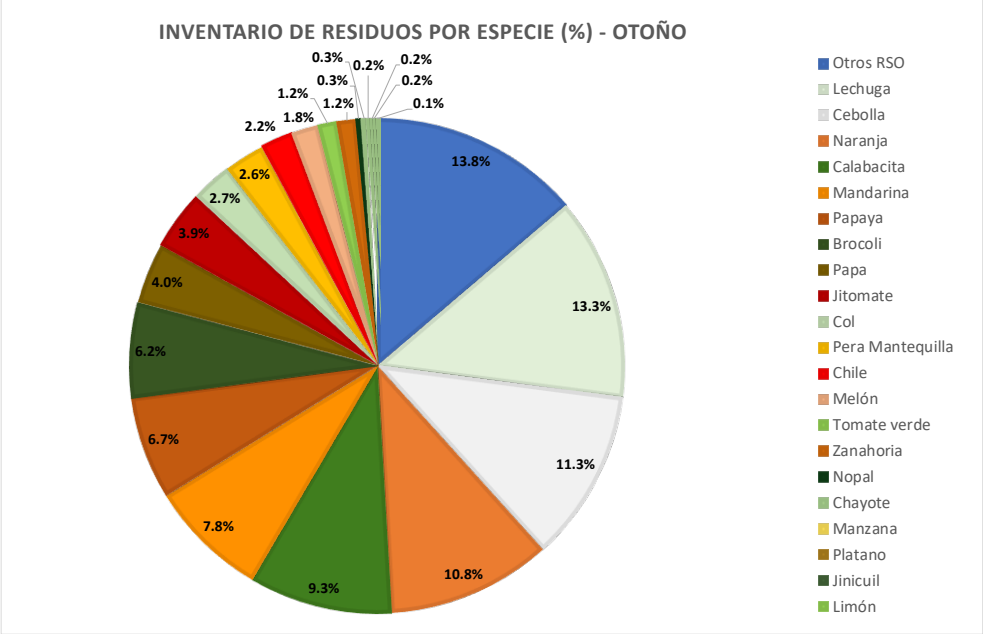


Figura 52. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Otoño.

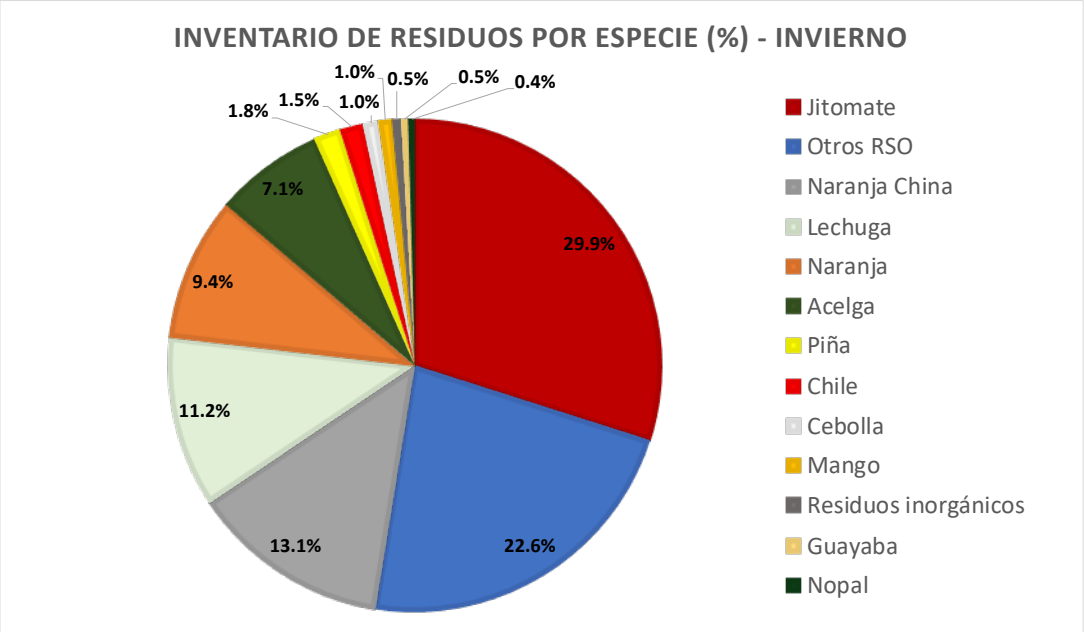


Figura 53. Gráfica del porcentaje (%) de RFV por especie obtenidos en Invierno.

Tabla 15. Resumen por estación del inventario de RSO por especie del Mercado Emiliano Zapata

PRIMAVERA		VERANO		OTOÑO		INVIERNO	
Especie	**Cantidad (%)**	**Especie**	**Cantidad (%)**	**Especie**	**Cantidad (%)**	**Especie**	**Cantidad (%)**
Jitomate	42.19%	Naranja	23.06%	Otros RSO	13.76%	Jitomate	29.93%
Piña	25.63%	Otros RSO	14.97%	Lechuga	13.29%	Otros RSO	22.64%
Otros RSO	13.87%	Mango	11.84%	Cebolla	11.27%	Naranja China	13.06%
Naranja	4.16%	Limón	6.86%	Naranja	10.77%	Lechuga	11.21%
Brócoli	3.33%	Melón	6.63%	Calabacita	9.34%	Naranja	9.45%
Cebolla	2.89%	Chayote	4.68%	Mandarina	7.77%	Acelga	7.14%
Ramas y tallos	1.92%	Papaya	4.43%	Papaya	6.70%	Piña	1.77%
Residuos Inorgánicos	1.36%	Jitomate	3.91%	Brócoli	6.22%	Chile	1.49%
Tomate verde	1.30%	Ramas y tallos	3.64%	Papa	3.95%	Cebolla	0.97%
Plátano macho	0.85%	Lechuga	3.63%	Jitomate	3.87%	Mango	0.96%
Chayote	0.79%	Zanahoria	3.09%	Col	2.68%	Residuos inorgánicos	0.54%
Pepino	0.66%	RSI	3.02%	Pera Mantequilla	2.63%	Guayaba	0.45%
Lechuga	0.57%	Brócoli	2.05%	Chile	2.15%	Nopal	0.39%
Mango	0.39%	Aguacate	1.64%	Melón	1.76%		
Chile	0.09%	Chile	1.13%	Tomate verde	1.24%		
		Tomate verde	1.12%	Zanahoria	1.22%		
		Coliflor	1.04%	Nopal	0.34%		
		Cebolla	1.00%	Chayote	0.32%		
		Piña	0.55%	Manzana	0.25%		
		Tuna	0.49%	Plátano	0.19%		
		Durazno	0.30%	Jinicuil	0.16%		
		Berenjena	0.28%	Limón	0.12%		
		Pera	0.27%				
		Papa	0.13%				
		Guayaba	0.09%				
		Ciruela	0.07%				
		Maracuyá	0.05%				
		Uva	0.04%				
TOTAL	**100%**	TOTAL	**100%**	TOTAL	**100%**	TOTAL	**100%**

IV. ETAPA I Y II: INOCULACIÓN Y ARRANQUE Y ESTIMULACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

a. CONDICIONES DE OPERACIÓN Y RENDIMIENTO DEL REACTOR

Tabla 16. Rendimiento del reactor. Reactor anaerobio de biopelícula a escala piloto al momento de obtener el inóculo (Previa) y reactor anaerobio de biopelícula a escala laboratorio durante las etapas de inoculación y arranque (I) y de estimulación de formación de biopelícula (II)

Etapa	Previa	I	II		
Condiciones de operación					
Duración (días)	38	68	14	4	4
Sustrato	Fracción líquida de RFV	Fracción líquida de Jitomate	Fracción líquida de Jitomate		
Proceso de preparación del sustrato	Trituración y filtración por malla de 3.36 mm (#6)	Trituración y filtración por malla de 2 mm (#10)	Trituración y filtración por malla de 2 mm (#10)		
Sustrato (mL)	5,800,000	1,910	7,000	2,000	1,000
Dilución	1:2	-	1:6.6	1:3.3	1:3.3
Sólidos Volátiles del Sustrato (g-SV/mL)	24.2	33.37	2.46	8.01	8.01
Concentración del sustrato (g-DQO/L)	14.79 ± 1.57	48.27 ± 4.23	5.96 ± 0.67	10.46 ± 3.68	12.3 ± 0.00
TRH (d)	4.03	131.58	16.80	16.80	33.60
OLR (g-DQO/L d)	3.67	0.37	0.36	0.62	0.37
Rendimiento del reactor					
Tasa de producción volumétrica de metano (L-CH4/L d)	50.34	3.15	8.04	14.11	8.58
Rendimiento de metano (L-CH4/g-DQO rem)	0.27	0.24	0.28	0.28	0.29
Rendimiento de metano (L-CH4/gSV alim)	0.16	0.34	0.67	0.36	0.44
Volumen de biogás (L)	5,6641.47	31.80	17.82	9.27	5.78
Contenido de metano (%)	40.53	69.12	64.76	62.42	60.88

Los valores de los gases estan dados en condiciones estandar de temperatura y presión (STP = 0 °C o 273.15 K y 0.987 atm)

La biomasa para la inoculación del reactor fabricado para la producción de un FOL se obtuvo de un reactor anaerobio de biopelícula a escala a piloto con un volumen total de 1,200 L (volumen útil de 700 L), alimentado con la fracción líquida de RFV diluidos 1:2. Las condiciones de operación y los rendimientos de este reactor al momento de tomar el inóculo se muestran en la Tabla 16.

Durante las primeras dos etapas el reactor anaerobio de biopelícula para la producción de un FOL, con un volumen total de 10.25 L (volumen útil de 8.4 L), se alimentó con la fracción líquida de jitomate. La etapa de inoculación y arranque duró 68 días, posteriormente se retiró la biomasa en suspensión y se comenzó segunda etapa de alimentación diaria durante 22 días para la estimulación de formación de biopelícula. Se obtuvieron los parámetros de operación y los rendimientos de ambas etapas y los resultados se muestran la Tabla 16.

Se puede observar que la primera etapa de inoculación y arranque consistió en la adaptación de la biomasa al sustrato y al reactor, al aumentar la concentración de sustrato de 14.79 ± 1.57 a 48.27 ± 4.23 g-DQO/L y el tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 4.03 a 131.58 dias, lo cual resulta en una disminución de la carga orgánica (OLR, por sus siglas en inglés) de 3.67 a 0.37 g-DQO/L d debido al gran aumento en el TRH. Durante la segunda etapa para la estimulación de formación de biopelícula se aumentó la cantidad de sustrato alimentado y se disminuyeron las concentraciones de sustrato que oscilan entre 5.96 ± 0.67 y 12.3 ± 0.00 g-DQO/L y los TRH a 16.80 y 33.60 días.

Tanto en la primera etapa de inoculación y arranque, como en la segunda etapa de estimulación de formación de biopelícula, se observó una gran disminución en el volumen de biogás producido y en la tasa de producción volumétrica de metano en comparación con el reactor del cual se obtuvo el inóculo, ya que están directamente relacionados con el volumen del reactor. Sin embargo, hubo un aumento en los valores de rendimiento del reactor a escala laboratorio para la producción de un FOL en comparación con el reactor a escala piloto: el contenido de metano del biogás aumentó de 40.53% a valores de entre 60.88 a 69.12 %; el rendimiento de metano por DQO removida primero disminuyó de 0.27 a 0.24 L CH_4/g-DQOrem en la primera etapa y posteriormente aumentó a 0.28 y 0.29 L CH_4/g DQOrem en la segunda etapa; por ultimo, el rendimiento de metano por gSV alimentado aumentó de 0.16 L CH_4/gSV alim a valores entre 0.34 y 0.67 L- CH_4/gSV alim.

Tabla 17. Cantidad de biogás producido (mL) y velocidad máxima de producción de biogás (mL/h) de las 8 cinéticas de jitomate como sustrato.

Cinética	Duración (h)	Sustrato	Sustrato (mL)	Dilución	Biogás producido (mL)	Vmax producción de biogás (mL/h)
1	267.91	Fracción líquida de Jitomate	500	1:3.3	7,910	385.3
2	269.77	Fracción líquida de Jitomate	500	1:3.3	6,270	151.32
3	116.108	Parte líquida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	530	1:3.3	2,940	132.29
4	668.52	Parte sólida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	250	1:3.3	5,300	74.46
5	116.359	Fracción líquida de Jitomate	500	1:3.3	3,260	163.71
6	71.35	Parte líquida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	382	1:3.3	2,180	134.13
7	91.4	Parte sólida de la fracción líquida de jitomate centrifugada	118	1:3.3	1,020	39.79
8	118.75	Fracción líquida de Jitomate	500	1:2	8,757	345.43

Los valores de los gases estan dados en condiciones estandar de temperatura y presión (STP = 0 °C o 273.15 K y 0.987 atm)

En la Figura 57 se observa la producción de biogás de la **fracción soluble (parte líquida)** (Cinéticas 3) y la **fracción sólida (parte sólida)** (Cinéticas 4) de la fracción líquida de jitomate alimentado y la suma de ambas (Cinética 3 y 4). De igual manera, en la Figura 58 se muestra la producción de biogás de la **fracción soluble** (Cinéticas 6) y la **fracción sólida** (Cinéticas 7) del sustrato alimentado y su suma (Cinética 6 y 7). En ambas gráficas se puede notar que la **la fracción soluble de jitomate** (Cinéticas 3 y 6) produce una mayor cantidad de biogás durante el mismo tiempo de residencia y a una mayor velocidad en comparación con la fracción sólida del sustrato (Cinéticas 4 y 7). La curva de la suma de las Cinéticas 3 y 4 se compara con la curva de la Cinética 5, y la curva de la suma de las Cinéticas 6 y 7 se compara con la curva de la Cinética 2. Para ambos casos podemos observar que la suma de la producción de biogás de la fracción soluble y la fracción sólida del sustrato corresponde a la producción de biogás de la fracción líquida de jitomate completa.

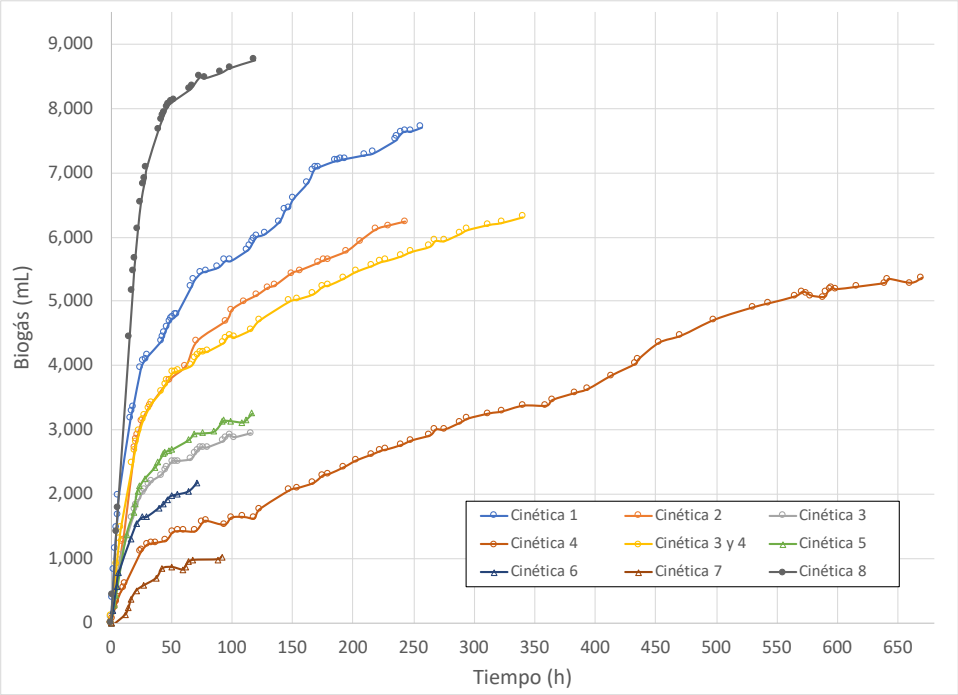


Figura 56. Gráfica de comparación de la producción de biogás (650 h) de las cinéticas de la fracción líquida de jitomate (sustrato) (día 105 al 178 a partir del arranque del reactor).

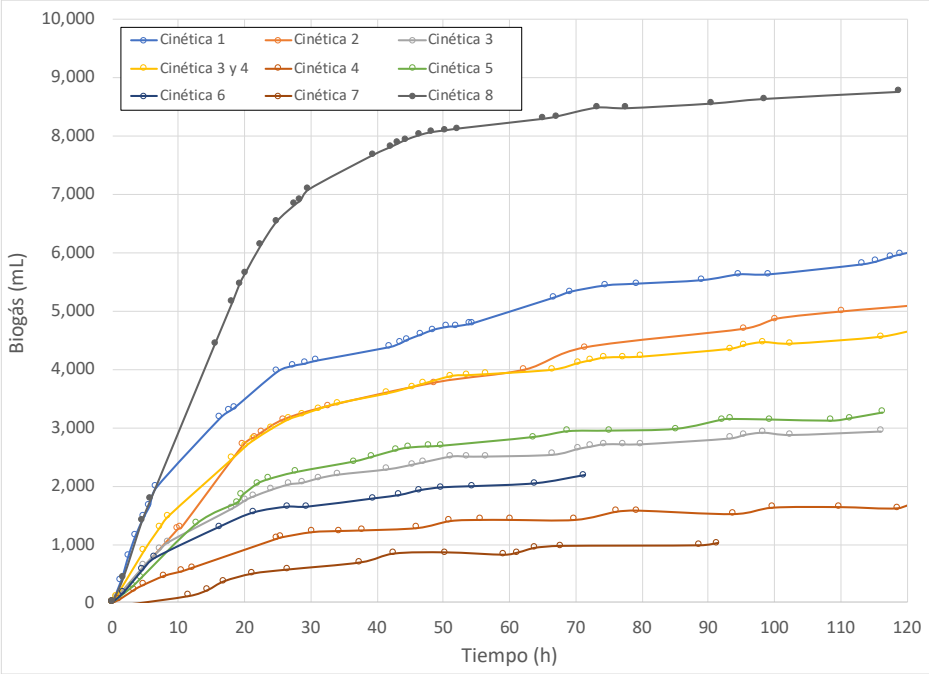


Figura 57. Gráfica de comparación de la producción de biogás (120 h) de las cinéticas de la fracción líquida de jitomate (sustrato) (día 105 al 178 a partir del arranque del reactor).

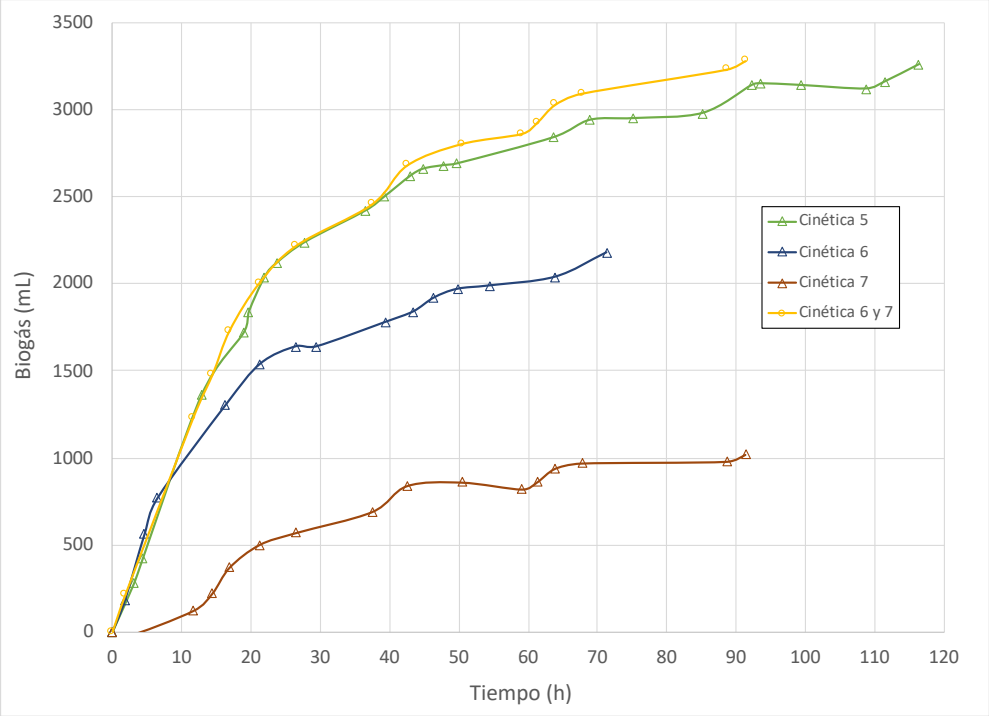


Figura 58. Gráfica de comparación de la producción de biogás (120 h) de las cinéticas 5, 6 y 7 de la fracción líquida de jitomate (sustrato) realizadas del día 161 al 173 a partir del arranque del reactor.

En la Figura 59, se observan las velocidades de producción de biogás durante las 8 cinéticas de la fracción líquida de jitomate del día 105 al 178 a partir del arranque del reactor. En el gráfico se marcan las velocidades correspondientes a cada cinética. Podemos notar que para todas las cinéticas la velocidad de producción de biogás aumenta de manera rápida después de la alimentación del sustrato hasta su Vmax (5-20 horas del inicio de la cinética) y a continuación la velocidad de producción disminuye de manera gradual. Las bacterias degradan primero y a mayor velocidad la fracción soluble del sustrato al estar compuesta de sustratos disueltos más biodisponibles. Una vez que se degradó la fracción soluble del sustrato, las bacterias degradan la fracción sólida a menor velocidad y durante más tiempo al estar compuesta de sustratos más complejos con menor biodisponibilidad.

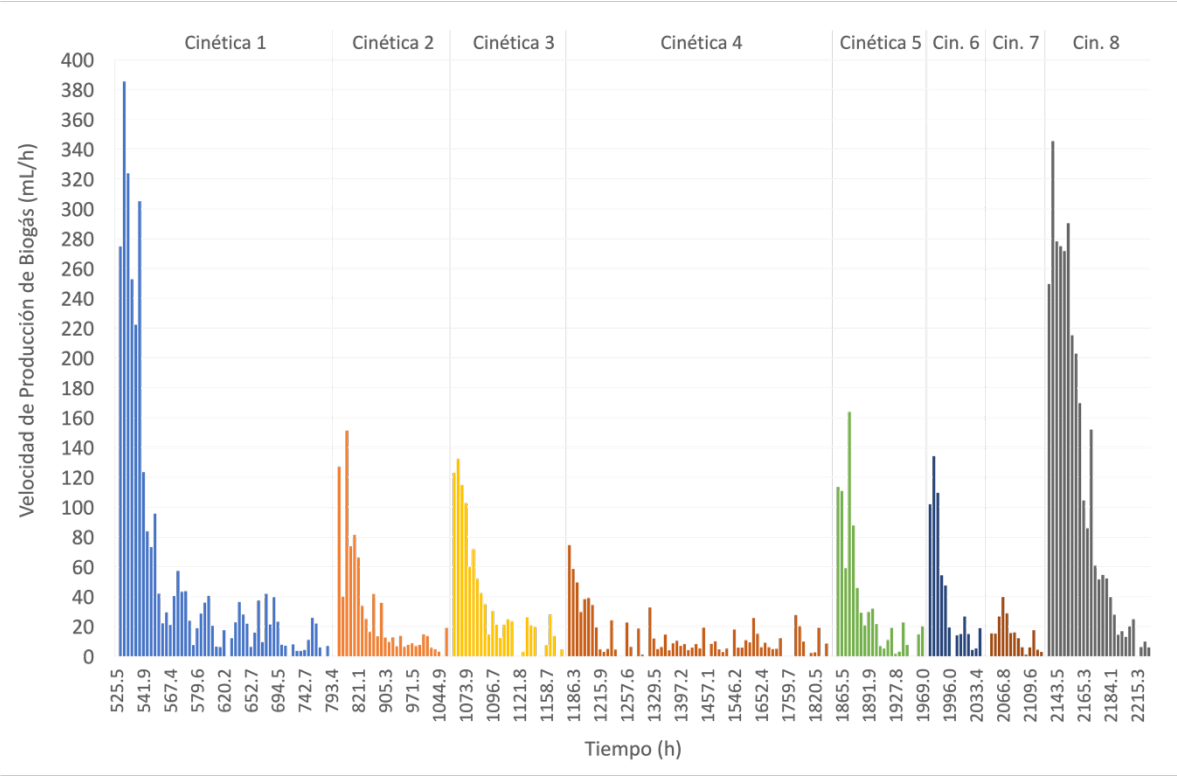


Figura 59. Gráfica de la velocidad de producción de biogás de las cinéticas de la fracción líquida de jitomate (sustrato) realizadas del día 105 al 178 a partir del arranque del reactor.

Considerando las Cinéticas 5, 8 y una cinética realizada con la fracción líquida del jitomte concentrado (Cinética 9), se obtuvo la cantidad de biogás y metano producido por cada gramo de materia orgánica contenida en la fracción líquida del jitomate con una concentración de 12 g DQOt/L (Tabla 18).

Tabla 18. Potencial de producción de biogas y metano a partir de la fracción líquida de jitomate.

Cinética	Duración (h))	Dilución	Biogás producido (mL)	Rendimiento biogás (mL biogás/gSV)	Contenido de metano (%)	Rendimiento de metano (mL CH_4/gSV
5	116.359	1:3.3	3,260	898.93	60.80%	546.55
8	118.75	1:2	8,857	1,069.65	63.82%	682.65
9	191.19	Concentrado	18,712	1,359.68	64.81%	881.21

Los valores de los gases estan dados en condiciones estandar de temperatura y presión (STP = 0 °C o 273.15 K y 0.987 atm)

El potencial de producción (rendimiento) de biogás para la fracción líquida de jitomate a diferentes diluciones se encuentra entre 898.93 y 1,359.68 mL biogás (STP)/gSV y el rendimiento de metano se encuentra entre 546.55 y 881.21 mL CH_4 (STP)/gVS . Se ha reportado previamente que el jitomate completo tiene un rendimiento de metano que oscila entre 199 y 384 mL CH_4 (STP)/gVS (Gunaseelan, 2004; Ward *et al.*, 2008; Dinuccio *et al.*, 2010; González-González y Cuadros, 2013; Calabro *et al.*, 2015). Por lo cual, la fracción líquida de jitomate tiene un mayor potencial de producción de metano que el jitomate completo.

b. COMPARACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE LA FRACCIÓN LIQUIDA POR ESPECIE VEGETAL

Se obtuvieron los rendimientos de las cinéticas por especie de las fracciones líquidas de jitomate, lechuga, naranja para estudiar su biodegradabilidad (Tabla 19). Posteriormente se realizó una comparación gráfica de la producción de biogás (Figura 60) y metano (Figura 61) de las cinéticas por especie.

Tabla 19. Rendimientos de las cinéticas por especie (jitomate, lechuga, naranja).

No. Cinética	Sustrato	Sustrato (mL)	g DQO removida	Biogás producido (mL)	Vmax Biogás (mL/h)	Contenido de Metano	Tasa de producción volumétrica de metano (LCH_4/L d)	Rendimiento de metano (LCH_4/gDQO rem)
1	FL-2 Jitomate	230	6.40	2873.96	257.58	0.72	0.127	0.323
2	FL-2 Jitomate	230	5.09	2871.62	262.66	0.72	0.124	0.406
3	FL-2 Jitomate	230	5.17	2822.09	304.71	0.72	0.126	0.393
4	FL-2 Lechuga	319	4.51	2826.63	187.62	0.72	0.114	0.451
5	FL-2 Lechuga	319	6.45	2597.53	181.82	0.72	0.119	0.290
6	FL-2 Lechuga	319	6.83	2732.82	263.16	0.72	0.129	0.288
7	FL-2 Naranja	90	6.88	2983.10	253.16	0.73	0.136	0.317
8	FL-2 Naranja	90	7.05	2887.79	236.69	0.72	0.138	0.295
9	FL-2 Naranja	90	6.35	2805.61	178.43	0.72	0.132	0.318

Los valores de los gases estan dados en condiciones estandar de temperatura y presión (STP = 0 °C o 273.15 K y 0.987 atm)

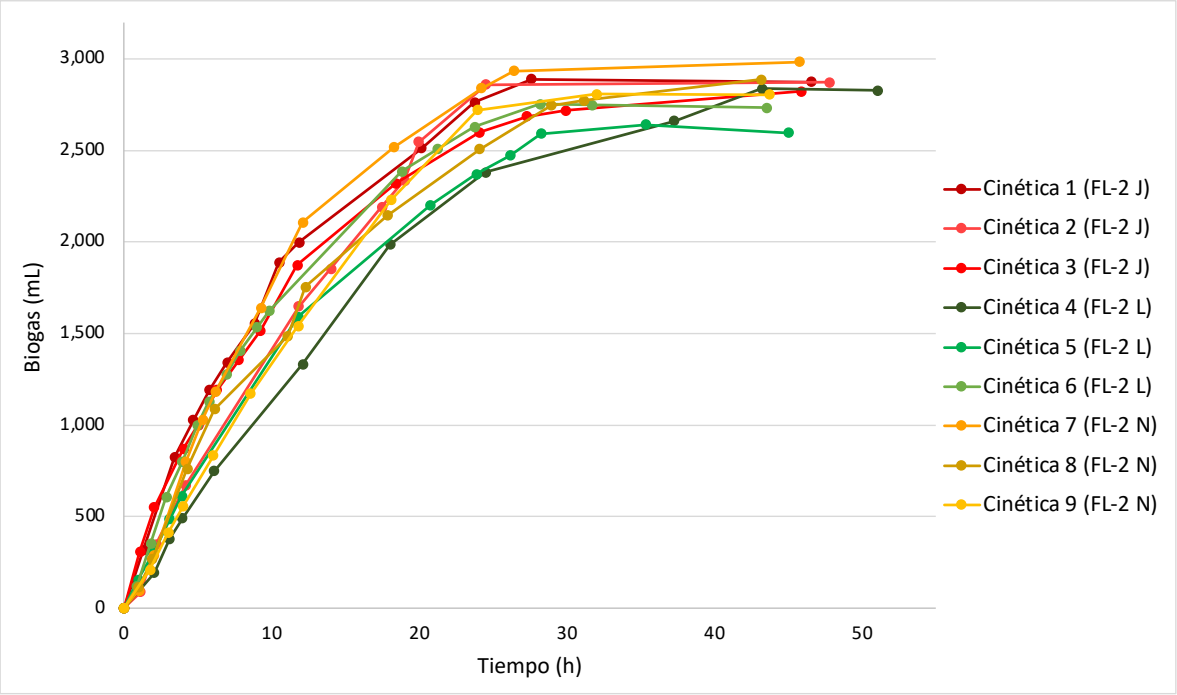


Figura 60. Gráfica de producción de biogás de las cinéticas alimentando la fracción líquida 2 (FL-2) por especie (J: jitomate, L: lechuga y N: naranja)

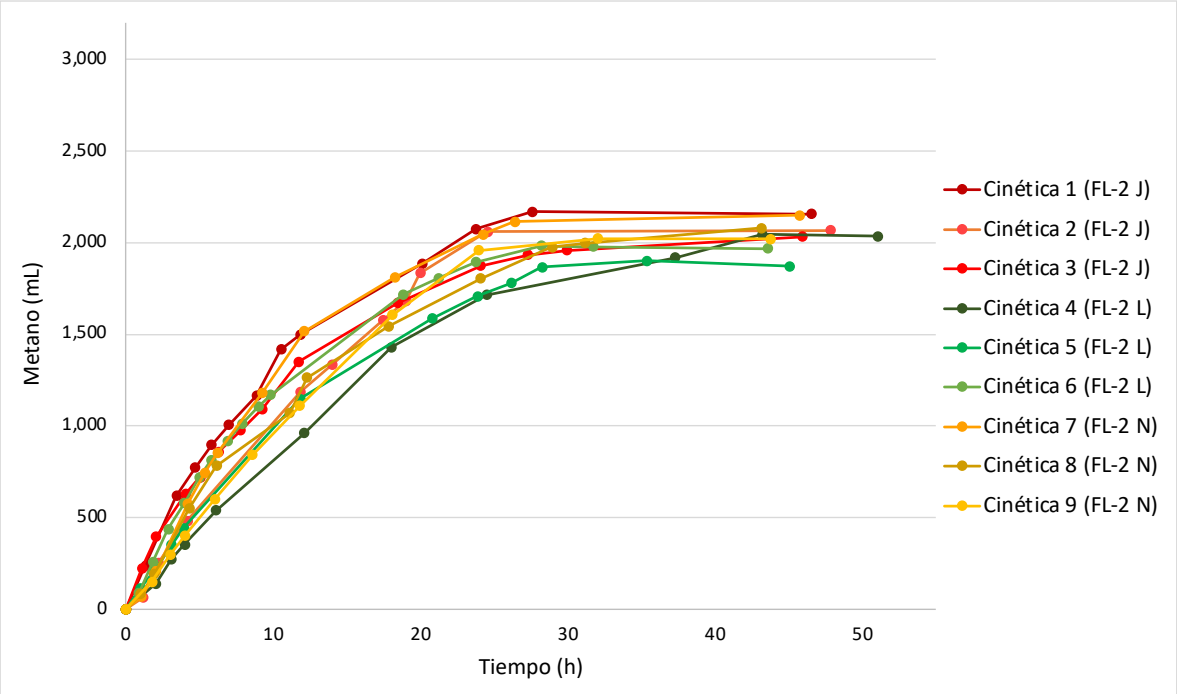


Figura 61. Gráfica de producción de metano de las cinéticas alimentando la fracción líquida 2 (FL-2) por especie (J: jitomate, L: lechuga y N: naranja)

Se puede observar que en las Figuras 60 y 61 que el comportamiento de la curva de producción de biogás y metano tiene un comportamiento similar para las tres especies de frutas y verduras estudiadas. Es importante considerar que se puede obtener una menor cantidad de la fracción líquida 2 a partir de la naranja en comparación con el jitomate y la lechuga debido al grosor de la cascara, sin embargo, se requiere alimentar entre 2.5 y 3.5 veces menos cantidad de FL-2 de naranja para obtener la misma concentración de sustrato a alimentar.

El contenido de metano en el biogás alimentando cada especie vegetal oscila entre 72% y 73% y en promedio el rendimiento de metano para el jitomate, lechuga y naranja son similares con valores de 0.374, 0.343 y 0.310 LCH_4/g DQO rem, respectivamente.

c. MODELADO DE DATOS EXPERIMENTALES DE PRODUCCIÓN DE METANO (MODELO DE GOMPERTZ SIMPLE Y MODIFICADO)

El modelado de los datos experimentales de producción de metano mediante el modelo de Gompertz simple y de Gompertz modificado se realizó para las pruebas del potencial bioquímico de metano. A continuación, se muestran los modelos para la producción de metano alimentando la FL-2 de Naranja (Figura 62) y para la producción de metano alimentando la FL-2 de Lechuga (Figura 63). Se obtuvieron los coeficientes de correlación (R^2), para la producción de metano a partir de la FL-2 de Naranja, el modelo de Gompertz simple tiene una R^2 de 0.991 y el modelo de Gompertz modificado tiene una R^2 de 0.998, para la producción de metano a partir de la FL-2 de Lechuga, el modelo de Gompertz simple tiene una R^2 de 0.995 y el modelo de Gompertz modificado tiene una R^2 de 0.998. El modelo de Gompertz modificado se ajusta de mejor manera a la producción de metano experimental para ambos sustratos.

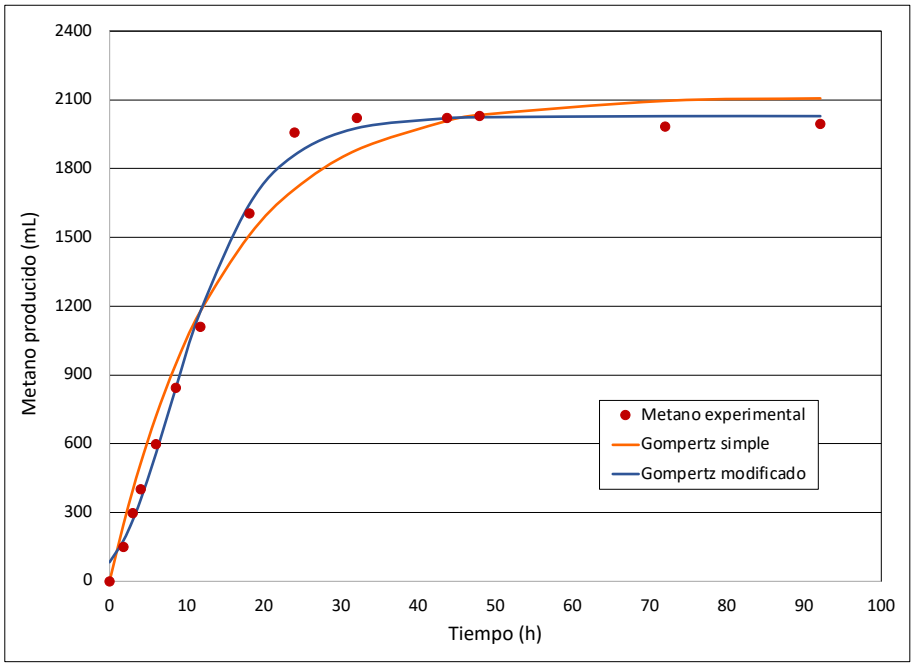


Figura 62. Producción de metano (mL) experimental y modelado con Gompertz simple y modificado, en reactor anaerobio de biopelícula alimentando con la Fracción Líquida 2 (FL-2) de Naranja.

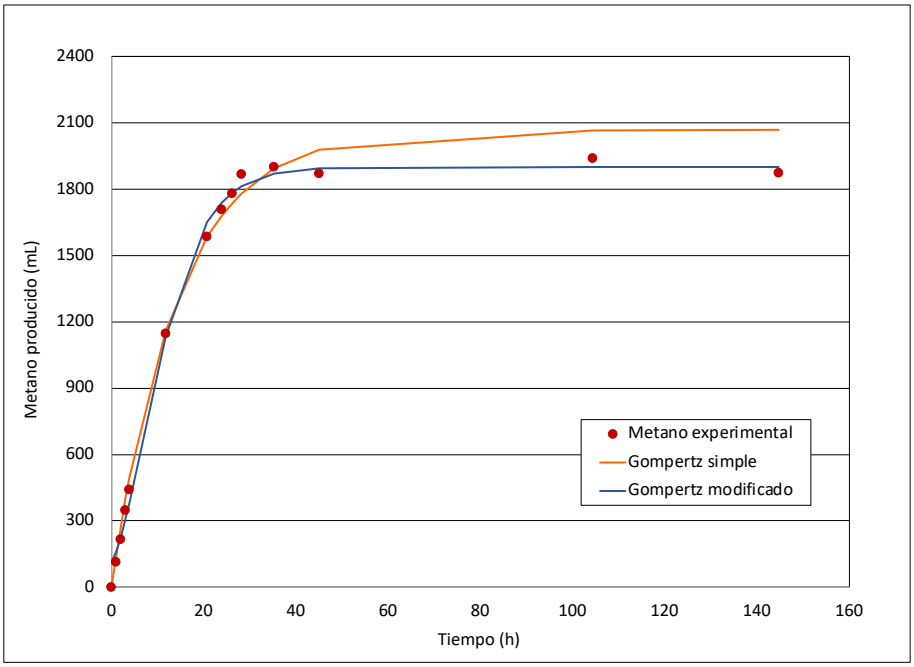


Figura 63. Producción de metano (mL) experimental y modelado con Gompertz simple y modificado, en reactor anaerobio de biopelícula alimentando con la Fracción Líquida 2 (FL-2) de Lechuga.

d. BALANCE DE ST EN LAS FRACCIONES SÓLIDAS (FS) Y LÍQUIDAS (FL)

El balance de materia (ST) se realizó para comprobar la eficiencia del proceso de obtención de la FL-2 de las especies de frutas y verduras. En la Figura 64 se observa el balance de ST para preparar el sustrato de lechuga. La FL-1 perdió 18.37 g ST (47.96%) al ser filtrada a través de la criba, los cuales se encuentran repartidos entre la FS-2 de Lechuga, la merma y la muestra.

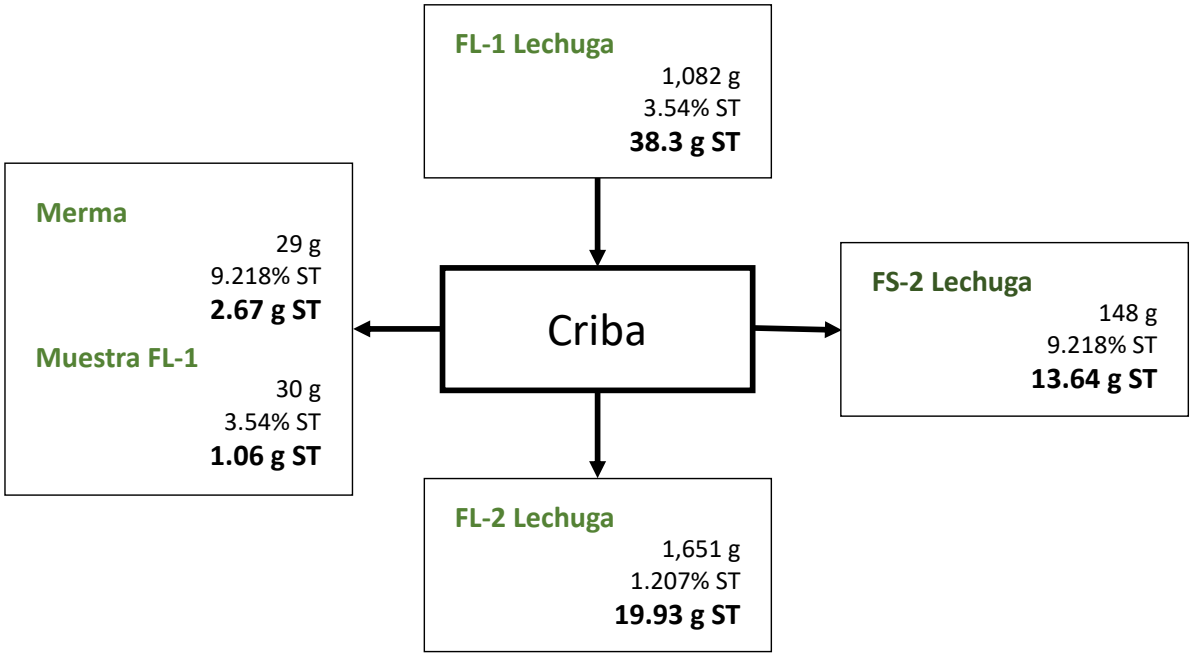


Figura 64. Balance de materia (ST) del proceso de obtención de la FL-2 de Lechuga a partir de la FL-1, mediante filtración con una criba de 0.05 mm (#270).

VI. PRUEBAS DE HIDRÓLISIS ANAEROBIA PARA LA FORMULACIÓN DEL FOL

Se puede observar en la Tabla 20, que las condiciones de operación y la alimentación semicontinua del sustrato, permitió mantener el pH del reactor en condiciones hidrolíticas y obtener una remoción de DQO de entre 24.58 ± 10.17 y 30.27 ±12.60%.

Tabla 20. Condiciones del reactor anaerobio de biopelícula para la hidrólisis anaerobia de a) fracción líquida de frutas y verduras (FL-FV) y b) fracción líquida de frutas y verduras complementada con una fuente proteica (FL-FV + fuente proteica)

Hidrólisis anaerobia	**a) FL-FV**	**b) FL-FV + fuente proteica**
Duración (días)	40	20
Sustrato	FL-2 jitomate, lechuga y naranja	FL-2 jitomate, lechuga y naranja FL-1 cascara de camarón
Sustrato (L)	425	352.8
pH Sustrato	4.90 ± 1.30	5.25 ± 0.42
Concentración del sustrato (g-DQO/L)	24.15 ± 8.25	35.14 ± 10.61
pH Efluente	5.25 ± 1.12	5.48 ± 0.25
Remoción de DQO (%)	24.58 ± 10.17	30.27 ± 12.60

a. CARACTERIZACIÓN DE LOS FOL OBTENIDOS

En la Tabla 21, se reportan las cantidades de macronutrientes presentes en el efluente obtenido de la hidrólsis anaerobia de a) fracción líquida de frutas y verduras (FL-FV) y b) la fracción líquida de frutas y verduras complementada con una fuente proteica (FL-FV + fuente proteica). Se tomó como nutriente limitante el nitrógeno debido a que es un factor clave en la fertilización. El nitrógeno permite el desarrollo del crecimiento vegetativo de la planta; en particular, contribuye al alargamiento de troncos y brotes y aumenta la producción de follaje y frutos. Con la suplementación con la fracción líquida de cascara de camarón, se logró aumentar el contenido de nitrógeno de 6 g/L a 9.58 g/L. Los macronutrientes presentes en el FOL suplementado con una fuente proteica tienen una concentración de 9.58 g N/L (0.96%), 1.25 g P/L (0.13%), y 1.13 g K/L (0.11%).

Tabla 21. Cantidad de macronutrientes en los FOL con diferentes sustratos: a) la fracción líquida de frutas y verduras (FL-FV) y b) la fracción líquida de frutas y verduras complementada con una fuente proteica (FL-FV + fuente proteica)

Macronutriente	a) FL-FV	b) FL-FV + fuente proteica
Nitrogeno (N)	6 g/L	9.58 g/L
Fosforo (P)	-	1.25 g/L
Potasio (K)	-	1.13 g/L

El efluente obtenido de la hidrólisis anaerobia de la fracción líquida de frutas y verduras adicionado con una fuente de proteína se estabilizó con un tratamiento térmico a 70°C durante 1 h. Una vez estabilizado, se obtiene como producto final un FOL (1-0.1-0.1) para la nutrición base de cultivos.

VII. PRUEBAS DE EFICIENCIA DEL FOL

a. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL FOL CON UN FERTILIZANTE INORGANICO (FI) APLICADO EN FLOR DE CALABAZA

El crecimiento de las plantas y las flores de calabaza cultivadas según el tratamiento utilizado (C, FOL y FI) se pueden observar en las Figuras 65, 66 y 67.

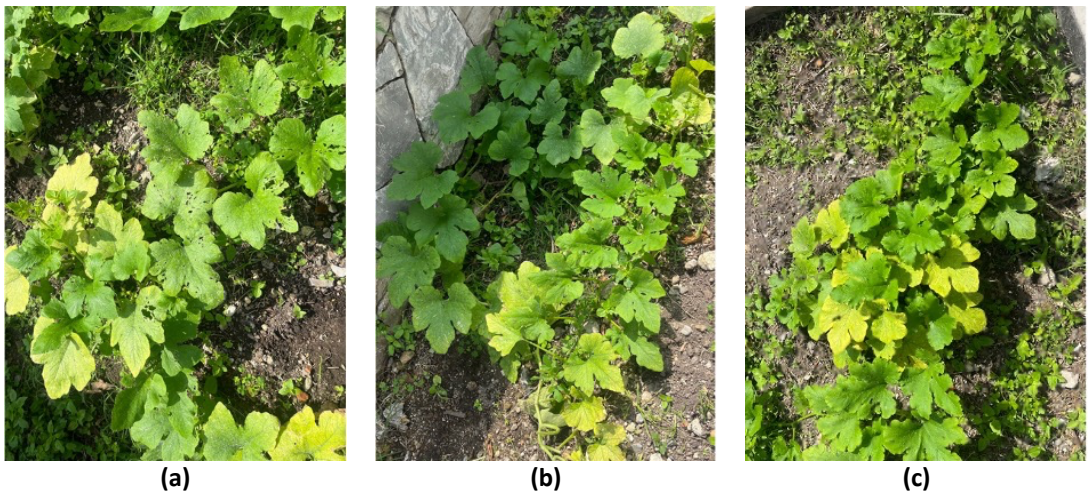


Figura 65. Crecimiento de la planta de Flor de Calabaza (*Cucurbita pepo*) 59 días posterior a la siembra con la aplicación de los 3 tratamientos: (a) Control; (b) FOL; (c) FI.



(a) (b) (c)

Figura 66. Aparición de flores del cultivo de *Cucurbita pepo* con la aplicación de los 3 tratamientos a diferentes días después de la siembra: (a) Control, 87 días; (b) FOL, 84 días; (c) FI, 83 días.



(a) (b) (c)

Figura 67. Flores de calabaza cultivadas después de la aplicación de los 3 tratamientos: (a) Control; (b) FOL; (c) FI.

Los resultados del crecimiento y rendimiento de cultivo monitoreados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianzas (ANOVA). Para cada variable de respuesta se realizó: a) planteamiento de hipótesis; b) comprobación de los supuestos de ANOVA (normalidad y homocedasticidad); c) ANOVA; d) prueba de diferencia mínima significativa (LSD) cuando se rechaza la H_o. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

1. Longitud de tallo (cm)

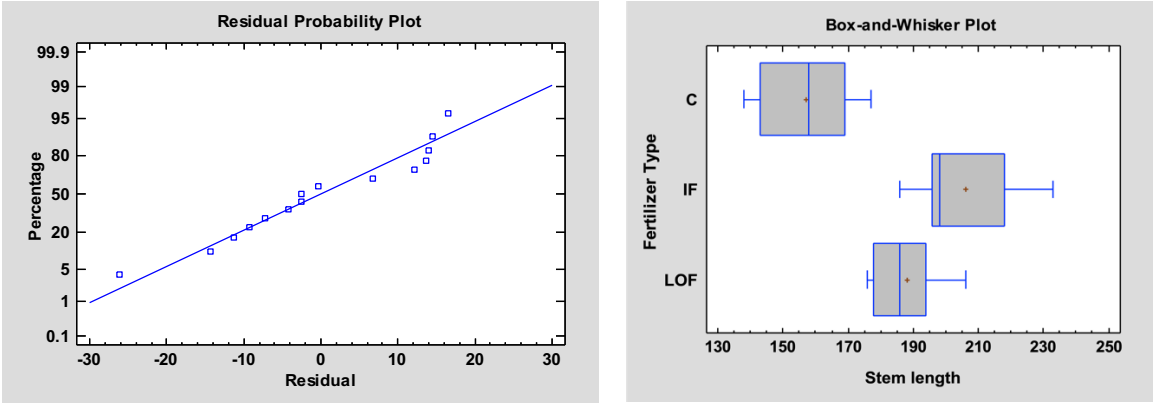
   a) Planteamiento de hipótesis

   H_o: Los promedios verdaderos de la longitud de tallo son iguales al aplicar 3 tipos de fertilización.

   H_a: Al menos uno de los promedios verdaderos de la longitud de tallo es diferente.

   b) Comprobación de supuestos

   Para la variable de longitud de tallo, se cumplen ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad comprobados mediante métodos gráficos (Figura 68).



(a) **(b)**

Figura 68. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto de homocedasticidad) para la variable longitud de tallo.

   c) ANOVA

   En la Tabla 22, se muestra la tabla de ANOVA que descompone la variabilidad de la longitud de tallo debido a 3 tipos de fertilizante usados (efecto A). Se obtuvo un valor-P menor a 0.05, por lo tanto, se rechaza la H_o. El tipo de fertilizante tiene un efecto estadísticamente significativo en la longitud de tallo a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 22. Análisis de Varianza (ANOVA) para la longitud de tallo.

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
MAIN EFFECTS					
A:Fertilizer Type	6188.13	2	3094.07	11.03	0.0050
B:BLOCK	902.267	4	225.567	0.80	0.5557
RESIDUAL	2244.53	8	280.567		
TOTAL (CORRECTED)	9334.93	14			

d) Prueba LSD

Según la prueba de LSD (Figura 69), con un 95% de confianza, el valor promedio de longitud de tallo es significativamente mayor para los tratamientos de FI y FOL en comparación con el Control (C), sin embargo, no es significativamente diferente entre ellos.

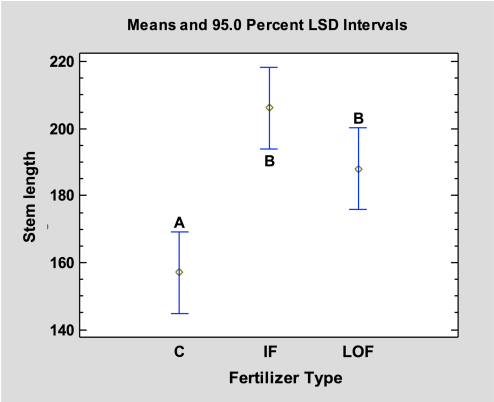


Figura 69. Gráfica de la prueba LSD para la longitud de tallo (Grupo A: C y Grupo B: FI, FOL).

2. Diámetro de tallo (mm)

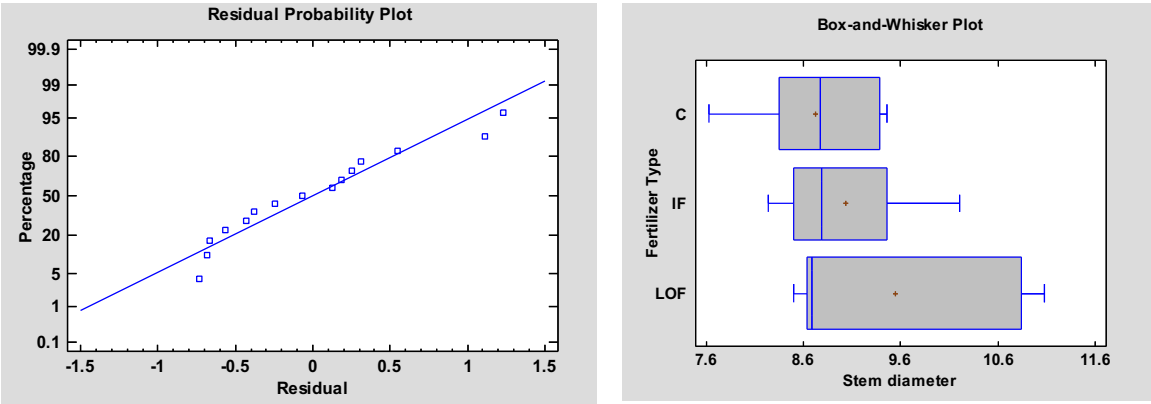
a) Planteamiento de hipótesis

H_o: Los promedios verdaderos del diámetro de tallo son iguales al aplicar 3 tipos de fertilización.

H_a: Al menos uno de los promedios verdaderos del diámetro de tallo es diferente.

b) Comprobación de supuestos

Para la variable de diámetro de tallo, se cumplen ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad comprobados mediante métodos gráficos (Figura 70).



(a) **(b)**

Figura 70. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto de homocedasticidad) para la variable diámetro de tallo.

c) ANOVA

En la Tabla 23, se muestra la tabla de ANOVA que descompone la variabilidad de diámetro de tallo debido a 3 tipos de fertilizante usados (efecto A). Se obtuvo un valor-P mayor a

0.05, por lo tanto, no se rechaza la H_o. El tipo de fertilizante no tiene un efecto estadísticamente significativo en el diámetro de tallo a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 23. Análisis de Varianza (ANOVA) para el diámetro de tallo.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Fertilizer Type	1.75108	2	0.87554	1.29	0.3266
B:BLOCK	6.1632	4	1.5408	2.27	0.1502
RESIDUAL	5.42452	8	0.678065		
TOTAL (CORRECTED)	13.3388	14			

3. Longitud de hoja (cm)

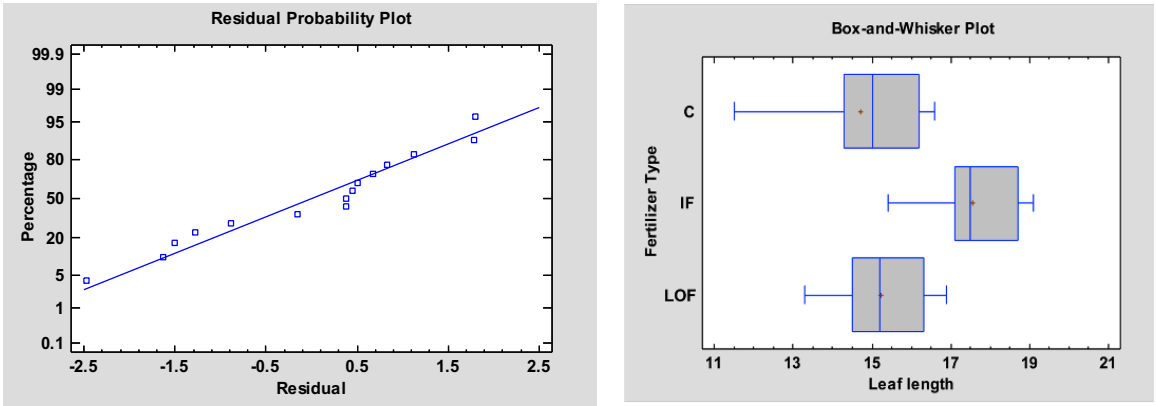
a) Planteamiento de hipótesis

H_o: Los promedios verdaderos de la longitud de hoja son iguales al aplicar 3 tipos de fertilización.

H_a: Al menos uno de los promedios verdaderos de la longitud de hoja es diferente.

b) Comprobación de supuestos

Para la variable de longitud de hoja, se cumplen ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad comprobados mediante métodos gráficos (Figura 71).



(a) **(b)**

Figura 71. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto de homocedasticidad) para la variable longitud de hoja.

c) ANOVA

En la Tabla 24, se muestra la tabla de ANOVA que descompone la variabilidad de longitud de hoja debido a 3 tipos de fertilizante usados (efecto A). Se obtuvo un valor-P mayor a 0.05, por lo tanto, no se rechaza la H_o. El tipo de fertilizante no tiene un efecto estadísticamente significativo en la longitud de hoja a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 24. Análisis de Varianza (ANOVA) para la longitud de hoja

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Fertilizer Type	22.864	2	11.432	3.96	0.0638
B:BLOCK	9.98267	4	2.49567	0.86	0.5248
RESIDUAL	23.1093	8	2.88867		
TOTAL (CORRECTED)	55.956	14			

4. Ancho de hoja (cm)

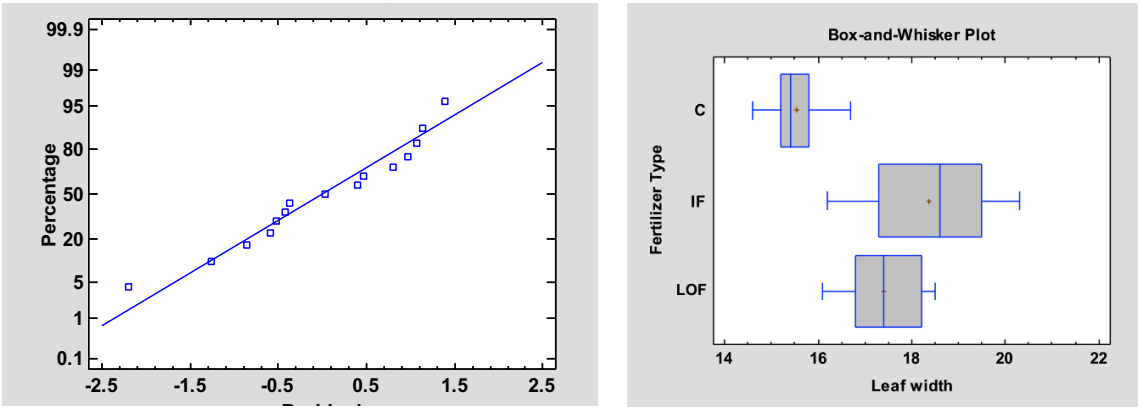
a) Planteamiento de hipótesis

H_o: Los promedios verdaderos del ancho de hoja son iguales al aplicar 3 tipos de fertilización.

H_a: Al menos uno de los promedios verdaderos del ancho de hoja es diferente.

b) Comprobación de supuestos

Para la variable de ancho de hoja, se cumplen ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad comprobados mediante métodos gráficos (Figura 72).



(a) **(b)**

Figura 72. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto de homocedasticidad) para la variable ancho de hoja.

c) ANOVA

En la Tabla 25, se muestra la tabla de ANOVA que descompone la variabilidad del ancho de hoja debido a 3 tipos de fertilizante usados (efecto A). Se obtuvo un valor-P menor a 0.05, por lo tanto, se rechaza la H_o. El tipo de fertilizante tiene un efecto estadísticamente significativo en el ancho de hoja a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 25. Análisis de Varianza (ANOVA) para ancho de hoja.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Fertilizer Type	20.8093	2	10.4047	5.74	0.0284
B:BLOCK	2.74267	4	0.685667	0.38	0.8182
RESIDUAL	14.4973	8	1.81217		
TOTAL (CORRECTED)	38.0493	14			

d) Prueba LSD

Según la prueba de LSD (Figura 73), con un 95% de confianza, el valor promedio del ancho de hoja es significativamente mayor para el tratamiento FI en comparación con el C, pero no es significativamente diferente que el FOL. Mientras que el FOL no es significativamente diferente del C.

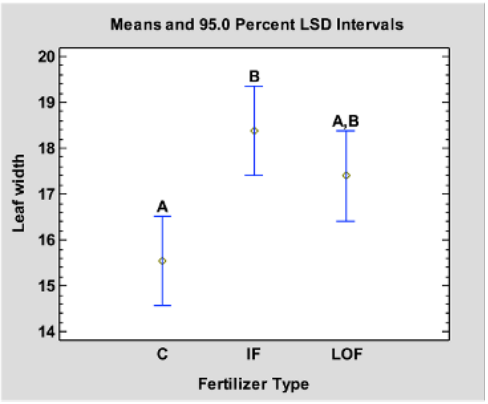


Figura 73. Gráfica de la prueba LSD para el ancho de hoja (Grupo A: C, FOL y Grupo B: FI, FOL).

5. Rendimiento del cultivo (No. de flores)

La gráfica de caja y bigote del número de flores promedio aplicando los 3 tipos de fertilización diferentes (Figura 74), muestra que el valor del tratamiento C es mucho menor que el de los tratamientos FOL y FI. La variabilidad de estos valores hace que los supuestos de ANOVA no se cumplan cuando se comparan los 3 tratamiento. Por lo tanto, realizó el análisis de varianza (ANOVA) para el FOL y el FI.

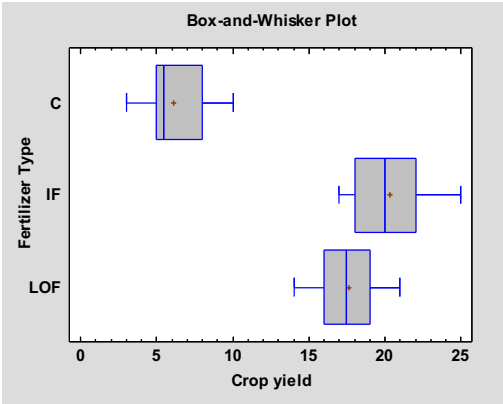


Figura 74. Gráfica de caja y bigote para el número de flores aplicando 3 tipos de fertilización diferentes.

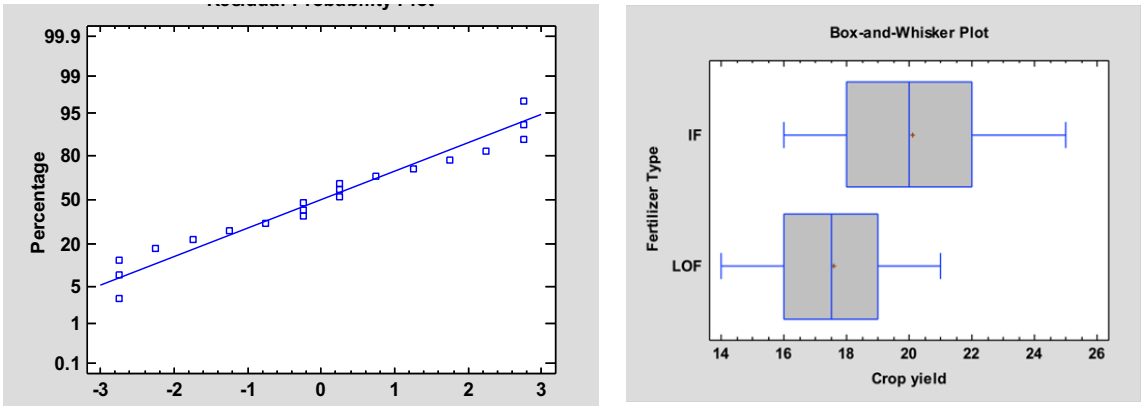
a) Planteamiento de hipótesis

H_o: Los promedios verdaderos del número de flores son iguales al aplicar 2 tipos de fertilización.

H_a: Al menos uno de los promedios verdaderos del número de flores es diferente.

b) Comprobación de supuestos

Para la variable del número de flores, se cumplen ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad comprobados mediante métodos gráficos (Figura 75).



(a) **(b)**

Figura 75. (a) Grafica de residuos (supuesto de normalidad) y (b) gráfica de caja y bigotes (supuesto de homocedasticidad) para la variable número de flores.

c) ANOVA

En la Tabla 26, se muestra la tabla de ANOVA que descompone la variabilidad del número de flores debido a 2 tipos de fertilizante usados (efecto A). Se obtuvo un valor-P mayor a 0.05, por lo tanto, no se rechaza la H_o. El tipo de fertilizante no tiene un efecto estadísticamente significativo en el número de hojas a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 26. Análisis de Varianza (ANOVA) para la longitud de hoja

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
MAIN EFFECTS					
A:Fertilizer Type	22.864	2	11.432	3.96	0.0638
B:BLOCK	9.98267	4	2.49567	0.86	0.5248
RESIDUAL	23.1093	8	2.88867		
TOTAL (CORRECTED)	55.956	14			

De acuerdo con los resultados obtenidos del DOE, se puede observar que:

- El tratamiento utilizado (C, FOL, FI), no influye estadísticamente en el diámetro de tallo y la longitud de hoja.

CONCLUSIONES

Las especies de interés para las formulaciones del FOL, según el Inventario de Frutas y Verduras realizado en el Mercado Municipal Emiliano Zapata son jitomate, naranja y lechuga.

La fracción soluble del sustrato (fracción líquida del jitomate) se degrada con mayor velocidad y contribuye en mayor medida a la producción de biogás en comparación con la fracción sólida. Las bacterias degradan primero y a mayor velocidad la fracción soluble del sustrato al estar compuesta de sustratos disueltos más biodisponibles. Una vez que se degradó la fracción soluble del sustrato, las bacterias degradan la fracción sólida a menor velocidad y durante más tiempo al estar compuesta de sustratos más complejos con menor biodisponibilidad.

El potencial de producción de metano para la fracción líquida de residuos de frutas y verduras es de 2.3 a 2.7 veces mayor que el potencial para el residuo completo, según las pruebas realizadas con jitomate. Mientras que, la fracción líquida de jitomate, lechuga y naranja, mostró una degradabilidad similar al agregar cierta concentración definida de sustrato al reactor anaerobio de biopelícula.

Se obtuvo a partir de la hidrólisis anaerobia de la fracción líquida de residuos de frutas y verduras (jitomate, lechuga y naranja) y de cascara de camarón un FOL (1-0.1-0.1) para la fertilización base de cultivos. La composición del FOL corresponde a las concentraciones de macronutrientes de 9.58 g N/L (0.96%), 1.25 g P/L (0.13%), y 1.13 g K/L (0.11%).

EL FOL aplicado en el cultivo de flor de calabaza (*Cucurbita pepo)* probó ser una alternativa de fertilización adecuada en comparación con la aplicación fertilizante inorgánico (FI, urea y fosfato diamónico), al no mostrar diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento (longitud de tallo, diámetro de tallo, longitud de hoja, ancho de hoja) y rendimiento del cultivo (número de flores producidas).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abendroth, C., Vilanova, C., Günther, T., Luschnig, O., y Porcar, M. (2015). Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany. Biotechnology for biofuels, 8(1), 1-10.

Adekunle, K.F. y Okolie, J.A. (2015). A review of biochemical process of anaerobic digestion. Advances in Bioscience and Biotechnology, 6(3), 205-212.

Aguilar-Bultet, L., y Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. Revista de salud animal, 37(2), 125-132.

Ahring, B. K., Angelidaki, I., de Macario, C. C., Gavala, H. N., Hofman-Bang, J., Elfering, S. O., y Zheng, D. (2003). Biomethanation I (Vol. 81). Springer.

Ahuja, I., Dauksas, E., Remme, J. F., Richardsen, R., & Løes, A. K. (2020). Fish and fish waste-based fertilizers in organic farming–with status in Norway: A review. Waste Management, 115, 95-112.

Akindele, A. A., y Sartaj, M. (2018). The toxicity effects of ammonia on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. Waste management, 71, 757-766.

Alvarado-Lassman, A., Méndez-Contreras, J. M., Martínez-Sibaja, A., Rosas-Mendoza, E. S., y Vallejo-Cantú, N. A. (2017). Biogas production from the mechanically pretreated, liquid fraction of sorted organic municipal solid wastes. Environmental technology, 38(11), 1342-1350.

American Public Health Association. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 6). American Public Health Association..

An, Y., Yang, F., Chua, H. C., Wong, F. S., y Wu, B. (2008). The integration of methanogenesis with shortcut nitrification and denitrification in a combined UASB with MBR. Bioresource technology, 99(9), 3714-3720.

Angelidaki, I., y Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Re/Views in Environmental Science y Bio/Technology, 3(2), 117-129.

Anwar, Z., Gulfraz, M., y Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. Journal of radiation research and applied sciences, 7(2), 163-173.

Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., y Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Progress in energy and combustion science, 34(6), 755-781.

Arduino. (2021). Arduino Nano. Obtenido de Arduino: https://www.arduino.cc/en/pmwiki.php?n=Main/ArduinoBoardNano

Argudo, M., Gich, F., Bonet, B., Espinosa, C., Gutiérrez, M., & Guasch, H. (2020). Responses of resident (DNA) and active (RNA) microbial communities in fluvial biofilms under different polluted scenarios. Chemosphere, 242, 125108.

Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R., Rojo-Liera, N. M., González-Álvarez, V., y Méndez-Acosta, H. O. (2018). Effect of the organic loading rate on the performance and microbial populations during the anaerobic treatment of tequila vinasses in a pilot-scale packed bed reactor. Journal of Chemical Technology y Biotechnology, 93(2), 591-599.

Arthurson, V. (2009). Closing the global energy and nutrient cycles through application of biogas residue to agricultural land–potential benefits and drawback. Energies, 2(2), 226-242.

Baker, B., Downar, J., Ashfield, C., Robie, T., Wilkerson, L., LeSueur, L., & Lugo, J. (2013). U.S. Patent Application No. 13/749,528.

Bartlett, J. M., y Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. In PCR protocols (pp. 3-6). Humana Press.

Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., ... y Vavilin, V. A. (2002). The IWA anaerobic digestion model no 1 (ADM1). Water Science and technology, 45(10), 65-73.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., y Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable and sustainable energy reviews, 36, 91-106.

Biotools (2014). Lambda DNA/HindIII Marker. Biotools B&M Labs S.A.

Bloem, E., Albihn, A., Elving, J., Hermann, L., Lehmann, L., Sarvi, M., ... y Ylivainio, K. (2017). Contamination of organic nutrient sources with potentially toxic elements, antibiotics and pathogen microorganisms in relation to P fertilizer potential and treatment options for the production of sustainable fertilizers: a review. Science of the Total Environment, 607, 225-242.

Bujoczek, G., Oleszkiewicz, J., Sparling, R., y Cenkowski, S. (2000). High solid anaerobic digestion of chicken manure. Journal of Agricultural Engineering Research, 76(1), 51-60.

Calabro, P. S., Greco, R., Evangelou, A., & Komilis, D. (2015). Anaerobic digestion of tomato processing waste: Effect of alkaline pretreatment. *Journal of Environmental Management*, *163*, 49-52.

Cao, Z., Jung, D., Olszewski, M. P., Arauzo, P. J., y Kruse, A. (2019). Hydrothermal carbonization of biogas digestate: Effect of digestate origin and process conditions. Waste Management, 100, 138-150.

Cen, Y., Guo, L., Liu, M., Gu, X., Li, C., & Jiang, G. (2020). Using organic fertilizers to increase crop yield, economic growth, and soil quality in a temperate farmland. PeerJ, 8, e9668.

Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., & Menardo, S. (2010). Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource technology*, *101*(10), 3780-3783.

Dittmar, H., Drach, M., Vosskamp, R., Trenkel, M. E., Gutser, R., & Steffens, G. (2000). Fertilizers, 2. types. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.

DOF. (2003) Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos. México.

Drennan, M. F., y DiStefano, T. D. (2010). Characterization of the curing process from high-solids anaerobic digestion. Bioresource technology, 101(2), 537-544.

Edwiges, T., Frare, L., Mayer, B., Lins, L., Triolo, J. M., Flotats, X., y de Mendonça Costa, M. S. S. (2018). Influence of chemical composition on biochemical methane potential of fruit and vegetable waste. Waste management, 71, 618-625.

Elbeshbishy, E., Nakhla, G., y Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. Bioresource technology, 110, 18-25.

Escamilla García, P. E. (2015). Evaluation and proposed development of the municipal solid waste management system in Mexico City. Tesis de doctorado. University of Manchester Faculty of Engineering and Physical Sciences. Inglaterra.

Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms. Plant nutrient management in Hawaii's soils, 31-55.

Evans, J. M. (2017). U.S. Patent Application No. 15/098,040.

Fangueiro, D., Ribeiro, H., Vasconcelos, E., Coutinho, J., & Cabral, F. (2009). Treatment by acidification followed by solid–liquid separation affects slurry and slurry fractions composition and their potential of N mineralization. Bioresource technology, 100(20), 4914-4917.

FAO. (2009). Specifications for Commonly Used Fertilizers. USA: FAO.

Frerichs, C., Daum, D., & Pacholski, A. S. (2020). Ammonia and Ammonium Exposure of Basil (Ocimum basilicum L.) Growing in an Organically Fertilized Peat Substrate and Strategies to Mitigate Related Harmful Impacts on Plant Growth. Frontiers in Plant Science, 1696.

Garcia-Peña, E. I., Parameswaran, P., Kang, D. W., Canul-Chan, M., y Krajmalnik-Brown, R. (2011). Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit

residues: process and microbial ecology. Bioresource Technology, 102(20), 9447-9455.

Garibyan, L., y Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). The Journal of investigative dermatology, 133(3), e6.

Gell, K., van Groenigen, J., y Cayuela, M. L. (2011). Residues of bioenergy production chains as soil amendments: immediate and temporal phytotoxicity. Journal of hazardous materials, 186(2-3), 2017-2025.

Gerardi, M. H. (2003). microbiology of anaerobic digester. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Experimental hematology, 30(6), 503-512.

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Applied and environmental microbiology, 63(7), 2802-2813.

González-González, A., & Cuadros, F. (2013). Continuous biomethanization of agrifood industry waste: A case study in Spain. *Process Biochemistry*, *48*(5-6), 920-925.

Gross, A., Guy, O., Posmanik, R., Fine, P., & Nejidat, A. (2012). A novel method for combined biowaste stabilization and production of nitrate-rich liquid fertilizer for use in organic horticulture. Water, Air, & Soil Pollution, 223(3), 1205-1214.

Gunaseelan, V. N. (2004). Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and bioenergy*, *26*(4), 389-399.

Guo, L., Wu, G., Li, Y., Li, C., Liu, W., Meng, J., ... & Jiang, G. (2016). Effects of cattle manure compost combined with chemical fertilizer on topsoil organic matter, bulk density and earthworm activity in a wheat–maize rotation system in Eastern China. Soil and Tillage Research, 156, 140-147.

Hai, D. M., Qiu, X., Xu, H., Honda, M., Yabe, M., Kadokami, K., ... & Oshima, Y. (2017). Contaminants in liquid organic fertilizers used for agriculture in Japan. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 99(1), 131-137.

Hartz, T. K., Smith, R., y Gaskell, M. (2010). Nitrogen availability from liquid organic fertilizers. HortTechnology, 20(1), 169-172.

Hassan, A. N., y Nelson, B. K. (2012). Invited review: anaerobic fermentation of dairy food wastewater. Journal of dairy science, 95(11), 6188-6203.

Hendriks, A., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 100, 10–18.

Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., ... y Ebertseder, F. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. Water Science and Technology, 74(11), 2515-2522.

Holm-Nielsen, J.B., Al seadi, T., y Oleskowicz-Popiel, P. (2009). The future of anaerobic digestion and biogas utilization. Bioresource Technology, 100(22), 5478-5484

Hutchison III, C. A. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Nucleic acids research, 35(18), 6227-6237.

IFOAM. (2018). New plant breeding techniques Position paper. Brussels: IFOAM EU.

INEGI. (2017). Censo Nacional de Gobiernos Municipales y Delegacionales 2017. Ciudad de México: INEGI.

Jenkins, S. R., Morgan, J. M., & Zhang, X. (1991). Measuring the usable carbonate alkalinity of operating anaerobic digesters. Research Journal of the Water Pollution Control Federation, 28-34.

Jiang, Y., McAdam, E., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., y Longhurst, P. (2019). Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review. Journal of Water Process Engineering, 32, 100899.

Jiraprasertwong, A., Maitriwong, K., y Chavadej, S. (2019). Production of biogas from cassava wastewater using a three-stage upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. Renewable Energy, 130, 191-205.

Juárez-García, A. P. (2016). Diseño, construcción, arranque y estabilización de un Reactor Anaerobio Multitubular (RAM). Tesis de Maestría. Orizaba, Veracruz: Instituto Tecnológico de Orizaba.

Kalia, V. C. (2008). Microbial treatment of domestic and industrial wastes for bioenergy production.

Kaya, A. R., & Coşkun, N. (2020). Effect of organic fertilizer forms and doses on the seed germination and seedling development of rapeseed (Brassica napus L.). *Applied ecology and environmental research*, 18(5), 6813-6828.

Khalid , A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., y Dawson, L. (2011). Review The anaerobic digestion of solid organic waste. Waste Management, 31, 1737-1744.

Khan, M. U. y Ahring, B. K. (2019). Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications-A review. Biomass and Bioenergy, 128, 105325.

Khanal S K. (2008). Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications, Wiley.

Khare, P., Raj, V., Chandra, S., & Agarwal, S. (2014). Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. Journal of forensic dental sciences, 6(2), 81.

Kirchmann, H., y Bernal, M. P. (1997). Organic waste treatment and C stabilization efficiency. Soil Biology and Biochemistry, 29(11-12), 1747-1753.

Koneman, E. W., y Allen, S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. médica panamericana.

Koupaie, E. H., Dahadha, S., Lakeh, A. B., Azizi, A., y Elbeshbishy, E. (2019). Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. Journal of environmental management, 233, 774-784.

Kyakuwaire, M., Olupot, G., Amoding, A., Nkedi-Kizza, P., y Ateenyi Basamba, T. (2019). How Safe is Chicken Litter for Land Application as an Organic Fertilizer?: A Review. International journal of environmental research and public health, 16(19), 3521.

Lim, J. W., y Wang, J. Y. (2013). Enhanced hydrolysis and methane yield by applying microaeration pretreatment to the anaerobic co-digestion of brown water and food waste. Waste Management, 33(4), 813-819.

Liu, E., Yan, C., Mei, X., He, W., Bing, S. H., Ding, L., ... & Fan, T. (2010). Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China. Geoderma, 158(3-4), 173-180.

Liu, H., Meng, J., Bo, W., Cheng, D., Li, Y., Guo, L., ... & Wu, G. (2016). Biodiversity management of organic farming enhances agricultural sustainability. Scientific reports, 6(1), 1-8.

Liu, T., Zhou, X., Li, Z., Wang, X., y Sun, J. (2019). Effects of liquid digestate pretreatment on biogas production for anaerobic digestion of wheat straw. Bioresource technology, 280, 345-351.

Love, B., Crabtree, D., & Martin, J. (2020). U.S. Patent Application No. 16/731,538.

Ma, H., Ye, L., Hu, H., Zhang, L., Ding, L., y Ren, H. (2017). Determination and variation of core bacterial community in a two-stage full-scale anaerobic reactor treating high-strength pharmaceutical wastewater. Journal of microbiology and biotechnology, 27(10), 1808-1819.

Ma, K., Wang, W., Liu, Y., Bao, L., Cui, Y., Kang, W., ... & Xin, X. (2021). Insight into the performance and microbial community profiles of magnetite-amended anaerobic digestion: Varying promotion effects at increased loads. *Bioresource Technology*, *329*, 124928.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., y Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renewable and sustainable energy reviews, 45, 540-555.

Martínez-Alcántara, B., Martínez-Cuenca, M. R., Bermejo, A., Legaz, F., y Quinones, A. (2016a). Liquid organic fertilizers for sustainable agriculture: Nutrient uptake of organic versus mineral fertilizers in citrus trees. PloS one, 11(10), e0161619.

Martínez-Alcántara, B., Martínez-Cuenca, M. R., Fernández, C., Legaz, F., y Quiñones, A. (2016b). Production of 15N-Labelled liquid organic fertilizers based on manure and crop residue for use in fertigation studies. PloS one, 11(3), e0150851.

Mata-Alvarez, J., Mace, S., y Llabres, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. Bioresource technology, 74(1), 3-16.

Meemken, E. M., & Qaim, M. (2018). Organic agriculture, food security, and the environment. Annual Review of Resource Economics, 10, 39-63.

Meza-Palacios, R., Aguilar-Lasserre, A. A., Morales-Mendoza, L. F., Rico-Contreras, J. O., Sánchez-Medel, L. H., & Fernández-Lambert, G. (2020). Decision support system for NPK fertilization: a solution method for minimizing the impact on human health, climate change, ecosystem quality and resources. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 1-16.

Moglia, E.S., 2008. Enzymatic Pre-treatment of Cellulose Rich Biomasses for Use in the Biogas Process.

Mostafazadeh-Fard, S., Samani, Z., & Bandini, P. (2019). Production of Liquid Organic Fertilizer Through Anaerobic Digestion of Grass Clippings. Waste and Biomass Valorization, 10(4), 771-781.

Nagarajan, D., Lee, D. J., y Chang, J. S. (2019). Integration of anaerobic digestion and microalgal cultivation for digestate bioremediation and biogas upgrading. Bioresource technology, 290, 121804.

Nguyen, M. L. T., Lin, C. Y., y Lay, C. H. (2019). Microalgae cultivation using biogas and digestate carbon sources. Biomass and Bioenergy, 122, 426-432.

Nkoa, R. (2014). Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. Agronomy for Sustainable Development, 34(2), 473-492.

OMRI. (2020). OMRI Products List. Estados Unidos: OMRI.

Pagliaccia, P., Gallipoli, A., Gianico, A., Gironi, F., Montecchio, D., Pastore, C., ... y Braguglia, C. M. (2019). Variability of food waste chemical composition: Impact of thermal pre-treatment on lignocellulosic matrix and anaerobic biodegradability. Journal of environmental management, 236, 100-107.

Parawira, W., Murto, M., Read, J. S., y Mattiasson, B. (2004). Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of solid potato waste. Journal of Chemical Technology y Biotechnology: International Research in Process, Environmental y Clean Technology, 79(7), 673-677.

Parra Huerta, R. A., y Campos Montiel, R. G. (2014). Evaluating the behavior of a UASB reactor with different organic loads from whey. Producción+ Limpia, 9(1), 23-30.

Pasalari, H., Gholami, M., Rezaee, A., Esrafili, A., & Farzadkia, M. (2021). Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: a systematic review. *Chemosphere*, *270*, 128618.

Pavlostathis, S. G. and Giraldo-Gómez, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. Water Science and Technology. 24:35-59.

Peng, W., Lü, F., Hao, L., Zhang, H., Shao, L., y He, P. (2020). Digestate management for high-solid anaerobic digestion of organic wastes: A review. Bioresource Technology, 297, 122485.

Płuciennik-Koropczuk, E., y Myszograj, S. (2019). New approach in COD fractionation methods. Water, 11(7), 1484.

Poirrier-González , P. (2015). Hidrólisis y acidificación psicrófila de moléculas complejas en sistemas anaerobios. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.

Ponisio, L. C., M'Gonigle, L. K., Mace, K. C., Palomino, J., De Valpine, P., & Kremen, C. (2015). Diversification practices reduce organic to conventional yield gap. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 282(1799), 20141396.

Pramanik, S. K., Suja, F. B., Zain, S. M., y Pramanik, B. K. (2019). The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. Bioresource Technology Reports, 8, 100310.

Pujara, Y., Pathak, P., Sharma, A., & Govani, J. (2019). Review on Indian Municipal Solid Waste Management practices for reduction of environmental impacts to achieve sustainable development goals. Journal of environmental management, 248, 109238.

Raden, I., Fathillah, S. S., Fadli, M., & SUYADI, S. (2017). Nutrient content of Liquid Organic Fertilizer (LOF) by various bioactivator and soaking time. Nusantara Bioscience, 9(2), 209-213.

Rajalakshmi, S. (2017). DIFFERENT TYPES OF PCR TECHNIQUES AND ITS APPLICATIONS. International Journal of Pharmaceutical, Chemical y Biological Sciences, 7(3).

Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., y Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience letters, 339(1), 62-66.

Ramírez-Pacheco, A., Moreno-Guerrero, S. y Medina-Sansona, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. Gaceta Mexicana de Oncología, (12), 162-173.

Rebrikov, D. V., y Trofimov, D. Y. (2006). Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. Applied biochemistry and microbiology, 42(5), 455-463.

Ren, Y., Yu, M., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Huang, Q., y Liu, Y. (2018). A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. Bioresource Technology, 247, 1069-1076.

Roba, T. B. (2018). Review on: the effect of mixing organic and inorganic fertilizer on productivity and soil fertility. Open Access Library Journal, 5(06), 1.

Ronga, D., Setti, L., Salvarani, C., De Leo, R., Bedin, E., Pulvirenti, A., ... y Francia, E. (2019). Effects of solid and liquid digestate for hydroponic baby leaf lettuce (Lactuca sativa L.) cultivation. Scientia horticulturae, 244, 172-181.

Rozzi A y Remigi E Anaerobic biodegradability. In: 9th World Congress, Anaerobic digestion 2001. Belgium, Workshop 3 Harmonisation of anaerobic activity and biodegradation assays. 9-2-2001. Coference Proceeding

Samani, Z. A. (2010). U.S. Patent No. 7,771,504. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Sandoval, L., Marín-Muñiz, J. L., Zamora-Castro, S. A., Sandoval-Salas, F., y Alvarado-Lassman, A. (2019). Evaluation of wastewater treatment by microcosms of vertical subsurface wetlands in partially saturated conditions planted with ornamental plants and filled with mineral and plastic substrates. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(2), 167.

Savoy, H. (1999). Fertilizers and their use. PB-1637, agricultural extension service, The University of Tennessee, Knoxville.

Secretaría de Comercio. (1985). Norma Mexicana NMX-AA-61-1985 Protección al ambiente - contaminación del suelo - residuos sólidos municipales - determinación de la generación. *Diario Oficial de la Federación.*

Sedesol. (2013). Secretaria de Desarrollo Social. Comunicado de Prensa Núm. 524/141113. Ciudad de México: Sedesol.

Seidl, P. R., y Goulart, A. K. (2016). Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2, 48-53.

SEMARNAT. (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003. Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarías de un sitio de

disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación.

SEMARNAT. (2016). Informe de la situación del medio ambiente en México. Conpendio de estadísticas ambientales, indicadores clave, desempeño ambiental y de crecimiento verde. Ciudad de México: SEMARNAT.

Seufert, V., Ramankutty, N., & Foley, J. A. (2012). Comparing the yields of organic and conventional agriculture. Nature, 485(7397), 229-232.

Shendure, J., y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. Nature biotechnology, 26(10), 1135-1145.

SIAP. (2018). Expectativas Agroalimentarias 2019. Ciudad de México: SIAP.

Sivamani, S., Chandrasekaran, A. P., Balajii, M., Shanmugaprakash, M., Hosseini-Bandegharaei, A., y Baskar, R. (2018). Evaluation of the potential of cassava-based residues for biofuels production. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 17(3), 553-570.

Sivamani, S., Prasad, B. N., Al-Sharji, Z. A. K., Al-Rawas, K. A. M., Al-Blowshi, A. S. D., Al-Yafii, A. S. B., ... y Al-Mamari, H. S. H. (2020). Stoichiometric Analysis of Biogas Production from Industrial Residues. In Biofuel Production Technologies: Critical Analysis for Sustainability (pp. 141-153). Springer, Singapore.

Smith, C. J., y Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. FEMS microbiology ecology, 67(1), 6-20.

Snell-Castro, R., Méndez-Acosta, H. O., Arreola-Vargas, J., González-Álvarez, V., Pintado-González, M., González-Morales, M. T., & Godon, J. J. (2019). Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana var. azul bagasse. Journal of applied microbiology, 126(5), 1618-1630.

Standard Methods Committee of the American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. *Lipps WC, Baxter TE, Braun-Howland E, editors.* Washington DC: APHA Press.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad, 2(2), 70-78.

Tambone, F., Scaglia, B., D'Imporzano, G., Schievano, A., Orzi, V., Salati, S., y Adani, F. (2010). Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion through a comparative study with digested sludge and compost. Chemosphere, 81(5), 577-583.

Tejada, M., & Benítez, C. (2020). Effects of different organic wastes on soil biochemical properties and yield in an olive grove. Applied Soil Ecology, 146, 103371.

Treadwell, D. D., Hochmuth, G. J., Hochmuth, R. C., Simonne, E. H., Davis, L. L., Laughlin, W. L., ... y Osborne, L. S. (2007). Nutrient management in organic greenhouse herb production: where are we now?. HortTechnology, 17(4), 461-466.

Tukanghan, W., Hupfauf, S., Gómez-Brandón, M., Insam, H., Salvenmoser, W., Prasertsan, P., ... & Sompong, O. (2021). Symbiotic Bacteroides and Clostridium-rich methanogenic consortium enhanced biogas production of high-solid anaerobic digestion systems. *Bioresource Technology Reports*, *14*, 100685.

Van Loosdrecht, H. H. (2008). Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling, and Design, edited by Henze Mogensvan Loosdrecht Mark CM.

Varnero-Moreno, M. T. The (2011). Manual de Biogás. Santiago de Chile: FAO.

Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J., y Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. Waste management, 28(6), 939-951.

Wang, X., Yang, G., Feng, Y., Ren, G., y Han, X. (2012). Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. Bioresource technology, 120, 78-83.

Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., & Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource technology*, *99*(17), 7928-7940.

Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. Applied microbiology and biotechnology, 85(4), 849-860.

Yaman, C. (2020). Investigation of greenhouse gas emissions and energy recovery potential from municipal solid waste management practices. Environmental Development, 33, 100484.

Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., y Tan, T. (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 38, 383-392.

Zhang, J., Loh, K. C., Li, W., Lim, J. W., Dai, Y., y Tong, Y. W. (2017). Three-stage anaerobic digester for food waste. Applied Energy, 194, 287-295.

Zhang, Q., Song, Y., Wu, Z., Yan, X., Gunina, A., Kuzyakov, Y., & Xiong, Z. (2020). Effects of six-year biochar amendment on soil aggregation, crop growth, and nitrogen and phosphorus use efficiencies in a rice-wheat rotation. Journal of Cleaner Production, 242, 118435.

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., y Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. Progress in energy and combustion science, 42, 35-53.

Ziemiński, K., y Frąc, M. (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. African Journal of Biotechnology, 11(18), 4127-4139.

PRODUCTOS ACADÉMICOS

ARTÍCULOS JCR:

Alvarado-Vallejo, A., Marín-Peña, O., Rosas-Mendoza, E. S., Méndez-Contreras, J. M., & Alvarado-Lassman, A. (2024). The Valorization of Fruit and Vegetable Wastes Using an Anaerobic Fixed Biofilm Reactor: A Case of Discarded Tomatoes from a Traditional Market. *Processes*, *12*(9), 1923.

Artículo en revisión: Potential enhancement of syntrophic metabolism with two carrier materials for biofilm formation during anaerobic digestion of tomato liquid fraction. (Applied Microbiology and Biotechnology, Springer, Impact Factor: 5.56)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Valorización de residuos sólidos de frutas y verduras para la producción de un fertilizante orgánico líquido por medio de hidrólisis anaerobia (CP 0111 1258/2023). SEGUNDA CONVOCATORIA DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE DESARROLLO TECNOLÓGICO (COVEICYDET). Aprobado: Julio 2023

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS:

Alvarado-Vallejo, A., Juárez-Barojas, I., Martínez-Sibaja, A., Rosas-Mendoza, E. S., Juárez-Martínez, U., Aguilar-Lasserre, A., y Alvarado-Lassman, A. (2021). Diseño e implementación de un sistema de monitoreo de pH automatizado para un reactor anaerobio de biopelícula. CIDSER 2021. Orizaba, Veracruz: ALDESER.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN:

Identificación de Comunidades Microbianas. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), Universidad de Guadalajara (UdG) (3 estancias).