



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

## **FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Evaluación de bagazo y paja de higuera en co-digestión con  
heces equinas y porcinas para la producción de biogás en un  
biodigestor de flujo semicontinuo”**

**TESIS DE POSGRADO**

**Presenta:**

**M. en C. Diana Laura Quezada Morales**

**290859**

Programa: Doctorado en Ciencias de la Energía

**Dirigida por:**

**Dr. Miguel Angel Ramos López**

Universidad Autónoma de Querétaro

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química**

Doctorado en Ciencias de la Energía

**“Evaluación de bagazo y paja de higuera en co-  
digestión con heces equinas y porcinas para la  
producción de biogás en un biodigestor de flujo  
semicontinuo”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctora  
en Ciencias de la Energía

Presenta:

**Diana Laura Quezada Morales**

Dirigido por:

**Dr. Miguel Angel Ramos López**

Dr. Miguel Angel Ramos López

\_\_\_\_\_  
Presidente Firma

Dr. Juan Campos Guillen

\_\_\_\_\_  
Secretario Firma

Dr. Francisco Javier de Moure Flores

\_\_\_\_\_  
Vocal Firma

Dr. Rufino Nava Mendoza

\_\_\_\_\_  
Vocal Firma

Dr. Antonio Flores Macías

\_\_\_\_\_  
Vocal Firma

\_\_\_\_\_  
Dr. José Santos Cruz  
Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario Querétaro, Qro.  
Noviembre/2025

## **Dedicatorias.**

Dedico esta tesis a mi madre Teresa Morales Rodríguez †, cuyo amor incondicional y apoyo inquebrantable ha sido la luz que me ha guiado en cada paso de mi vida. Fuiste y seguirás siendo la fuerza de nuestra familia. Te amo mami.

## **Agradecimientos**

Le agradezco a mi asesor el Dr. Miguel Angel Ramos López por haber depositado su confianza y dedicación para realizar este trabajo. A mis sinodales, gracias por ser parte de este equipo. Agradezco a mis compañeros de trabajo, por sus consejos, fortaleza y ayuda. También a ti Sergio, por tu paciencia, cariño, dedicación y por ayudarme a pensar en soluciones, gracias por ayudar a realizar todo lo que se me ocurría para que funcionara, fue divertido. Agradezco a mi familia, porque sin ellos no hubiera llegado hasta donde estoy hoy en día, gracias por estar siempre ahí, los amo, son lo más valioso que tengo. Gracias Sergio.

Finalmente agradezco al FOPER y CONACYT por su ayuda financiera.

# Índice

Resumen .....	15
Abstract .....	16
1 Introducción .....	17
2 Fundamentación teórica .....	19
2.1 Energía .....	19
2.1.1 Energía renovable .....	19
2.2 Biocombustibles.....	20
2.2.1 Biocombustibles gaseosos .....	20
2.2.2 Sustratos para la producción de biocombustibles gaseosos .....	21
2.3 Digestión anaerobia .....	23
2.3.1 Factores digestivos durante la producción de biogás.....	24
2.3.2 Co-digestión anaerobia .....	26
2.4 <i>Ricinus communis</i> generalidades .....	26
2.5 Biocombustibles a partir de <i>Ricinus communis</i> .....	27
2.5.1 Biogás a partir de <i>Ricinus communis</i> .....	29
2.6 Biorreactores .....	30
2.7 Purificación de biogás.....	34
3 Hipótesis.....	36
4 Objetivo general .....	37
5 Objetivos específicos .....	37
6 Metodología.....	38
6.1 Recolección de sustratos .....	38
6.2 Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles .....	38
6.3 Determinación de azúcares reductores .....	39

6.4	Análisis de la demanda química de oxígeno.....	39
6.5	Determinación de contenido de carbono y nitrógeno total .....	40
6.6	Proceso de digestión anaerobia .....	41
6.7	Identificación de la composición de la comunidad de Arqueas metanogénicas .....	42
6.7.1	Preparación de las muestras.....	42
6.7.2	Extracción de ADN genómico total.....	43
6.7.3	Amplificación del gen <i>mcrA/mrtA</i> .....	43
6.7.4	Clonación y secuenciación de productos PCR.....	44
6.7.5	Análisis filogenético .....	44
6.7.6	Análisis taxonómico de co-gestiones durante la digestión anaerobia ...	44
6.8	Diseño y desarrollo de un biodigestor de flujo semicontinuo .....	45
6.8.1	Dimensionamiento y cálculo del biodigestor .....	45
6.8.2	Diseño en 3D del biodigestor .....	47
6.9	Modelado en 3D del sistema de purificación .....	48
6.10	Diseño experimental .....	49
7	Resultados y Discusión .....	50
7.1	Análisis Fisicoquímicos.....	50
7.1.1	Determinación de sólidos .....	50
7.1.2	Determinación de carbohidratos, demanda química de oxígeno y relación C/N.....	53
7.2	Identificación de <i>Arqueas</i> Metanogénicas en Heces .....	55
7.2.1	Análisis Filogenético.....	55
7.2.2	Análisis taxonómico de la comunidad microbiana durante la digestión anaerobia .....	61
7.3	Producción de Biogás .....	70

7.3.1 Temperatura ambiente .....	70
7.3.2 Temperatura controlada .....	75
7.3.3. Diferencias en la producción de biogás.....	79
7.4 Diseño 3D, Fabricación y Construcción del Biodigestor con Filtros .....	81
7.4.1 Diseño Tridimensional de Biodigestor .....	81
7.4.2 Diseño tridimensional de filtros para el biodigestor .....	87
7.4.3 Construcción del sistema de biodigestión y filtros .....	92
8 Conclusiones.....	95
9 Bibliografía .....	96

## Índice de Tablas

Tabla 1. Composición del biogás crudo .....	21
Tabla 2. Taxonomía de <i>Ricinus communis</i> .....	27
Tabla 3. Tipos de digestores anaeróbicos .....	30
Tabla 4. Ventajas y desventajas de los digestores anaeróbicos de crecimiento suspendido.....	31
Tabla 5. Sistemas anaeróbicos de lecho fijo .....	32
Tabla 6. Materiales utilizados en la modelación del biodigestor .....	47
Tabla 7. Materiales utilizados en la modelación del sistema de purificación.....	49
Tabla 8 Determinación de análisis físicos en base seca.....	53
Tabla 9 Determinación de análisis químicos.....	55
Tabla 10. Arqueas metanogénicas identificadas en muestras fecales.....	59
Tabla 11. Producción de Biogás acumulado en 87 días con Diferentes Tratamientos a Temperatura Ambiente y Controlada. ....	80

## Índice de Figuras

Figura 1. Procesos y productos de <i>Ricinus communis</i> [47].....	28
Figura 2. Árbol filogenético de heces equinas y porcinas .....	58
<b>Figura 3. Mapa de calor de abundancia familiar con agrupamiento de muestras..</b>	<b>63</b>
Figura 4. Abundancia relativa en el control positivo de heces equinas. ....	65
Figura 5. Abundancia relativa en la co-digestión de partes aéreas y heces equinas .....	66
Figura 6. Abundancia relativa en la co-digestión de bagazo y heces equinas .....	66
Figura 7. Abundancia relativa en el control positivo de heces porcinas. ....	69
Figura 8. Abundancia relativa en la co-digestión de partes aéreas y heces porcinas....	69
Figura 9. Abundancia relativa en la co-digestión de Bagazo y heces porcinas.....	70
Figura 10. Vista isométrica de biodigestor .....	82
Figura 11. Entrada y salida de sustrato.....	83
Figura 12. Vista lateral derecho del biodigestor .....	84

Figura 13. Sensor de pH instalado en el biodigestor.....	85
Figura 14. Sensor de temperatura y sistema de visualización instalados en la parte superior del biodigestor.....	85
Figura 15. Vista frontal del biodigestor.....	86
Figura 16. Vista frontal de los filtros.....	88
Figura 17. Vista de la estructura interna de los filtros. ....	88
Figura 18. Filtros en base fija.....	89
Figura 19. Sistema de Biodigestión con Filtros Integrados .....	89
Figura 20. Implementación del biodigestor y sus filtros.....	92

### Índice de Ecuaciones

Ecuación 1 .....	39
Ecuación 2 .....	39
Ecuación 3 .....	39
Ecuación 4 .....	40
Ecuación 5 .....	41
Ecuación 6 .....	42
Ecuación 8 .....	45
Ecuación 9 .....	46
Ecuación 10 .....	46
Ecuación 11 .....	46
Ecuación 12 .....	46
Ecuación 13 .....	46

#### DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



## Resumen

La escasez de combustibles fósiles ha generado una serie de problemas ambientales, sociales y económicos que han impulsado el interés para la producción de biocombustibles como fuentes alternativas de energía limpia y sostenible. En este sentido, se ha investigado la producción de biogás, compuesto principalmente por metano y dióxido de carbono, a partir de la digestión anaerobia de materia orgánica, donde este proceso involucra la acción de bacterias metanogénicas que transforman los sustratos orgánicos en biogás. Si bien se ha investigado la producción de metano a partir de heces de ganado, uno de los sustratos menos explotados es el residuo de higuera (*Ricinus communis*), una planta lignocelulósica con gran potencial para el metabolismo de los organismos metanogénicos. Por lo que en este trabajo se evaluó la producción de biogás a partir de la co-digestión de residuos de higuera como paja y bagazo, junto con heces equinas y porcinas, manteniendo una relación carbono/nitrógeno de 25:1. Se analizaron dos condiciones térmicas: a temperatura ambiente y a temperatura controlada (37 °C). Los rendimientos de los controles positivos a temperatura controlada fueron de 549.9 y 35.78 mL · gSV<sup>-1</sup> para heces equinas y porcinas, respectivamente; mostrando el mayor rendimiento de biogás con el control positivo de heces equinas, mientras que el volumen acumulado en las mismas condiciones, los controles positivos obtuvieron 1552.4 mL para heces equinas y 193 mL para heces porcinas. Sin embargo, el mayor volumen acumulado fue alcanzado por la co-digestión del bagazo de semilla con heces equinas con un máximo de 2261 mL. Por otro lado, en condiciones a temperatura ambiente, los rendimientos que se obtuvieron fueron de 255.8 y 71.2 mL · gSV<sup>-1</sup> para heces equinas y porcinas, respectivamente; sin embargo, la co-digestión del bagazo con heces equinas produjo el mayor rendimiento con 259.8 mL · gSV<sup>-1</sup>. Para el volumen acumulado a temperatura ambiente, los controles positivos arrojaron valores de 614.8 mL con heces equinas y 426.4 mL con heces porcinas, obteniendo un acumulado máximo de 1536.3 mL con la co-digestión de bagazo con heces equinas. Además, se llevó a cabo la identificación de metanógenos mediante amplificación del ARNr 16S en heces equinas y porcinas y secuenciación metagenómica en las co-digestiones, logrando identificar una diversidad de metanógenos, incluidos las arqueas Halobacteriota, Methanobacteriota, *Methanocorpusculum labreanum* y *Methanoculleus bourgensis*, todas portadoras del gen metilcoenzima M reductasa (*mcrA*). Finalmente, se diseñó un biodigestor de flujo semicontinuo con filtros purificantes, destacando su potencial para reducir la dependencia de combustibles fósiles en la cocción de alimentos y la calefacción de agua. Este biodigestor representa una solución sostenible y económica que contribuye a la disminución de la huella de carbono y a la gestión eficiente de residuos orgánicos.

Palabras clave: Biogás, co-digestión, relación C/N, metanógenos, biodigestor.

## Abstract

The scarcity of fossil fuels has led to a series of environmental, social, and economic challenges, thereby fueling interest in the production of biofuels as alternative sources of clean and sustainable energy. In this context, biogas production, primarily composed of methane and carbon dioxide, has been extensively studied through the anaerobic digestion of organic matter, a process driven by methanogenic bacteria that convert substrates into biogas. Although research has explored methane generation from livestock manure, one of the less exploited substrates is residual castor plant residues (*Ricinus communis*), a lignocellulosic biomass with significant potential to support methanogenic microbial metabolism. This study evaluates biogas production from co-digestion of castor waste specifically straw and bagasse with equine and porcine manure, maintaining a carbon-to-nitrogen (C/N) ratio of 25:1. Two operational temperature regimes were considered: ambient temperature and controlled temperature (at 37 °C). Under controlled conditions, positive controls yielded biogas volumes of 549.9 mL and 35.78 mL per gram of volatile solids (*gVS*) for equine and porcine manure, respectively, with the highest biogas yield observed using equine manure. In the same conditions, cumulative biogas volumes reached 1552.4 mL for equine manure and 193 mL for porcine manure. The maximum cumulative volume, however, was obtained through co-digestion of seed cake with equine manure, reaching 2261 mL. Under ambient temperature conditions, yields were 255.8 and 71.2 mL · *gVS*<sup>-1</sup> for equine and porcine manure, respectively. Co-digestion of seed cake with equine manure produced the highest yield at 259.8 mL · *gVS*<sup>-1</sup>. In terms of total biogas volume at ambient temperature, positive controls yielded 614.8 mL for equine manure and 426.4 mL for porcine manure, with the highest cumulative volume of 1536.3 mL achieved through co-digestion of seed cake with equine manure. Additionally, methanogen diversity was characterized by amplifying the 16S rRNA gene from equine and porcine manure samples, followed by metagenomic sequencing in co-digestion setups. This revealed a diverse community of methanogens, including archaea such as *Halobacteriota*, *Methanobacteriota*, *Methanocorpusculum labreanum*, and *Methanoculleus bourgensis*, all carrying the methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) gene. Finally, a semi-continuous flow biodigester with integrated filtering systems was designed, highlighting its potential to reduce reliance on fossil fuels for cooking and water heating. This biodigester offers a sustainable, cost-effective solution that can contribute to lowering the carbon footprint while promoting efficient organic waste management.

Keywords: Biogas, co-digestion, C/N ratio, methanogens, biodigester.

## 1 Introducción

La crisis energética y el cambio climático son problemas graves que impactan al mundo. La dependencia de combustibles fósiles como el petróleo, gas natural y carbón contribuye al calentamiento global, debido a las crecientes concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) como dióxido de carbono ( $CO_2$ ), metano ( $CH_4$ ), compuestos sulfurados, entre otros. Por ello, es fundamental encontrar alternativas energéticas renovables que ofrezcan soluciones sostenibles y reduzcan las emisiones de GEI, además de una transición de una economía lineal basada en recursos fósiles hacia un concepto de economía circular de base biológica es crucial para abordar los desafíos ambientales actuales [1, 2]. En este contexto, los desechos y subproductos deben regresar al ciclo de producción, y la energía consumida por el ser humano debe provenir de fuentes renovables. Una alternativa prometedora que cumple esta función es la producción de biogás a gran escala; el biometano, derivado de este proceso, se utiliza para la producción combinada de calor y energía. En el mundo, más de 1300 sistemas de digestión anaeróbica operan en el tratamiento de lodos de plantas tratadoras de aguas residuales [3]. Esto representa una oportunidad significativa para la digestión anaeróbica (DA) como un proceso multifuncional que integra la protección ambiental con la producción de energía renovable, nutrientes y el reciclaje de agua [4].

Dentro de los residuos biodegradables, se incluyen aquellos generados por la agricultura, como paja, rastrojos y bagazo, así como por la ganadería, como heces y sueros. La higuera (*Ricinus communis*), un cultivo perenne de la familia Euphorbiaceae originario de África [5], se está reincorporando al agromexicano para la producción de aceite de ricino que contiene múltiples propiedades. Esta planta, también ha sido considerada como energética y con múltiples usos industriales, pero genera residuos que, debido a su alta toxicidad por la presencia de la proteína tóxica llamada ricina y de otros compuestos, por lo que no pueden emplearse como alimento para ganado [6, 7].

Entre 2018 y 2020, México cosechó en promedio 635 *ha* de higuera [8], lo que generó residuos en forma de paja y bagazo, considerada como biomasa lignocelulósica, (es la materia prima más abundante en la Tierra), compuesta por polímeros de carbohidratos y una estructura aromática. Se utiliza en la producción de bioenergéticos [9, 10], siendo la

higuerilla, una excelente alternativa no comestible de biomasa para la producción de biogás mediante DA; proceso genera  $CH_4$  a partir de material orgánico en ausencia de oxígeno. Al combinar materia lignocelulósica con heces, se puede alcanzar una relación carbono/nitrógeno (C/N) ideal de alrededor de 25:1, lo que maximiza la eficiencia del proceso de digestión anaeróbica al proporcionar a las bacterias metanogénicas el equilibrio nutricional necesario para optimizar la producción de biogás [11, 12].

La inclusión de heces en el sustrato no solo mejora la producción de metano, sino que también enriquece el efluente final del proceso, que puede utilizarse como biofertilizante, cerrando así el ciclo de economía circular. Este enfoque multidimensional potencia tanto la producción de energía como la fertilidad del suelo, contribuyendo a una gestión más sostenible de los residuos agropecuarios [13].

Este proyecto propuso un reactor de flujo semicontinuo acoplado con filtro y contenedor para la producción de biogás a partir de residuos de higuerilla en co-digestión con heces de caballo y cerdo para establecer una adecuada relación C/N. Adicionalmente se realizó la identificación de las arqueas metanogénicas involucradas en la DA y producción de metano, antes, y durante el proceso de DA *in vitro*, con el fin de determinar las comunidades bacterianas involucradas en el proceso de producción de biogás para conocer su impacto en la biodegradabilidad del sustrato durante la producción de biogás.

Esta investigación buscó no solo incrementar el conocimiento sobre la producción de biogás mediante la co-digestión de residuos de higuerilla y heces de ganado, sino también proporcionar una alternativa viable para el aprovechamiento de recursos que de otro modo resultarían en desechos, alineándose con las prácticas de economía circular y el uso sostenible de recursos renovables en México.

## 2 Fundamentación teórica

### 2.1 Energía

A lo largo del 2024, pese a la diversidad de fuentes energéticas existentes, el carbón se mantuvo como la principal fuente de generación eléctrica a nivel global, aportando más de un tercio de la electricidad producida, según datos de la International Energy Agency [14]. Este combustible es esencial para industrias como la siderúrgica. El gas natural, por otra parte, ha sido el combustible fósil de mayor crecimiento en los últimos años, alcanzando un récord del 22.7% en la demanda energética mundial y representando casi un tercio del incremento total en el consumo durante la última década. Se proyecta que el uso de petróleo en vehículos de combustión interna llegue a su punto máximo en la década del 2030, con un crecimiento promedio de aproximadamente 0.1 millones de barriles por día al año. En conjunto, el sector energético contribuye en torno al 40% de las emisiones relacionadas con la generación de energía y representa cerca del 25% del total de gases de efecto invernadero emitidos a nivel global, registrando una huella de aproximadamente  $520 \text{ gCO}_2 \text{ kWh}^{-1}$  [15]. Debido a estos efectos ambientales, surge la necesidad de investigar y promover fuentes de energía alternativas, las cuales se describen a continuación.

#### 2.1.1 Energía renovable

El avance en el uso y desarrollo de fuentes de energía renovable (ER) ha llevado a procesos más sostenibles en la generación de electricidad y otros usos energéticos. Diversas investigaciones indican perspectivas alentadoras para la ER, sugiriendo que en el futuro podría cubrir hasta el 90% del consumo energético global [16]. Estas fuentes pueden clasificarse de varias maneras, incluyendo la energía termomarina, energía solar, geotérmica, eólica, mareomotriz, hidroeléctrica, y bioenergía. Esta última en particular, se obtiene a partir de biomasa, que consiste en la materia orgánica de seres vivos, sus excrementos y restos no vivos, con diferentes niveles de procesamiento. También se le denomina biocombustible, y dentro de esta categoría se distinguen los biocombustibles líquidos (BCL), sólidos (BCS), y gaseosos (BCG) [17].

## 2.2 Biocombustibles

Corresponden a la energía generada a partir de la conversión de biomasa, que es la materia orgánica procedente de recursos vivos, así como algunos subproductos refinados derivados de ella, que se queman para producir calor y luz, teniendo un comportamiento comparado con los combustibles fósiles [18].

Más allá de su clasificación según el estado físico, los biocombustibles también se categorizan en diferentes generaciones: primera, segunda, tercera y cuarta. Los de primera generación provienen de recursos biológicos de uso directo, como almidón, azúcar, aceite vegetal, maíz, o grasas animales, utilizando tecnologías convencionales, generalmente a partir de productos alimenticios. Los biocombustibles de segunda generación se producen a partir de biomasa no alimenticia y cultivos que no compiten con los alimentos, tales como residuos forestales, agrícolas, cultivos energéticos no comestibles, aguas residuales y vegetación acuática, empleando diferentes tecnologías de conversión. La tercera generación se basa principalmente en microalgas y otros microorganismos, cuya materia prima es especializada, mientras que en la cuarta generación se utilizan bacterias modificadas genéticamente que emplean  $CO_2$  u otra fuente de carbono para producir biocombustible [19].

### 2.2.1 Biocombustibles gaseosos

Dentro de los BCG están el biogás y el gas de síntesis (Syngas). El biogás es un combustible renovable que puede servir como alternativa al gas natural convencional. Se produce mediante la digestión anaeróbica de residuos orgánicos. La composición del biogás en su forma cruda se detalla en la **Tabla 1**. Tras un proceso de purificación para remover el dióxido de carbono, el ácido sulfhídrico y otras impurezas, y otras sustancias contaminantes, se obtiene biogás de calidad apta para tuberías, también conocido como biometano, que puede emplearse como sustituto del gas natural [18, 20].

**Tabla 1. Composición del biogás crudo**

<b>Productos gaseosos</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>CH<sub>4</sub></i>	<b>60 – 70</b>
<i>CO<sub>2</sub></i>	<b>30 – 40</b>
<i>H<sub>2</sub></i>	<b>1 – 5</b>
<i>H<sub>2</sub>S</i>	<b>3 – 5</b>

[18]

Mientras tanto, el syngas es otro tipo de biocombustible gaseoso que se obtiene a través de procesos de gasificación o pirólisis de materiales vegetales. Químicamente, el gas de síntesis está compuesto aproximadamente por un 0 – 5% de *CH<sub>4</sub>*, 5 – 15% de *CO<sub>2</sub>*, 25 – 30% de hidrógeno (*H<sub>2</sub>*), 30 – 60% de óxido de carbono (*CO*), además de pequeñas cantidades de vapor de agua, *CO*, *H<sub>2</sub>S*, amoníaco (*NH<sub>3</sub>*) y otros compuestos, dependiendo del tipo de materia prima y las condiciones del proceso. Durante la producción, la materia prima se somete a un calentamiento rápido a temperaturas superiores a 700°C en la cámara de un gasificador de alta temperatura, donde se somete a una combustión parcial en presencia de un flujo controlado de aire para generar syngas. En el interior del gasificador, la biomasa atraviesa tres etapas principales de transformación térmica: deshidratación, pirólisis y oxidación parcial. En la fase de deshidratación, la biomasa que ha sido secada al aire pierde rápidamente su humedad antes de alcanzar los 200°C. A medida que la temperatura aumenta, comienza la pirólisis, proceso en el cual el material orgánico se descompone en vapor y carbón [18, 21, 22].

### **2.2.2 Fuentes para la síntesis de biocombustibles gaseosos**

Existen diferentes tipos de BCG, aunque este apartado se centrará en el biohidrógeno, el syngas y el biogás. El hidrógeno puede ser producido a partir de diversas fuentes, como biomasa (residuos agrícolas, municipales, algas, entre otros), mediante electrólisis usando energía renovable como solar, eólica, etc., o a partir de combustibles fósiles haciendo uso de petróleo, carbón, gas natural, incluso energía nuclear [23]. El hidrógeno también puede generarse a partir de residuos orgánicos sólidos, como aquellos ricos en

carbohidratos y proteínas, residuos agroindustriales, lixiviados de aceite de palma, descargas de destilería y residuos papeleros [24].

Para la obtención de syngas, uno de los recursos más abundantes y disponibles en la naturaleza es la madera. Aunque es un material valioso por sus aplicaciones en construcción, los residuos de madera como el aserrín, la corteza y algunas piezas deformes, poseen un bajo valor comercial, por lo que son ideales para procesos de gasificación. Además, otros residuos industriales, tanto agrícolas como forestales, también pueden emplearse como materia prima: cáscaras de arroz, coco, café, bagazo de caña, y hierba. La producción de cultivos energéticos, como el álamo, la caña de azúcar y el sorgo dulce, cultivados específicamente para combustibles, representa otra opción prometedora en la generación de syngas [25].

Por otra parte, el biogás puede obtenerse a partir de una amplia variedad de sustratos, incluyendo residuos agrícolas, desechos alimentarios, residuos industriales, aguas residuales y cultivos. Se han investigado diferentes métodos para producir biogás, como el uso de subproductos de la producción de biodiesel como materia prima en digestores anaeróbicos. Por ejemplo, Kolesárová y colaboradores [26] revisaron que, en la extracción simple de grasa, hasta un 12% (y hasta un 20% en instalaciones pequeñas) puede quedar en el bagazo de semillas. La segunda etapa de prensado, a veces combinada con la extracción de vapor de agua, puede reducir ese contenido cerca del 8%. La extracción con hexano permite obtener harina oleaginosa con solo un 1 – 3% de grasas. Sin embargo, la descomposición de la hemicelulosa y lignina, presentes en los caparazones, resulta más difícil en estos procesos, por lo que se requieren pretratamientos adicionales para mejorar la producción de metano y el rendimiento del biogás.

Entre los parámetros clave para evaluar la materia prima se encuentran el contenido de sólidos volátiles (SV), la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno (DBO), la relación carbono/nitrógeno (C/N), entre otros [27]. Además, los recursos de biomasa aptos para la generación de biogás pueden clasificarse en diferentes categorías según diversos criterios. Desde el punto de vista taxonómico, se

dividen en vegetales y animales; en función del sector productor, incluyen recursos agrícolas, industriales y municipales [28].

### 2.3 Digestión anaerobia

Es una tecnología que ha sido utilizada desde hace mucho tiempo, principalmente en la industria para el tratamiento de lodos, aguas residuales y residuos húmedos [29]. La DA es un proceso que consiste en la fermentación microbiana de materiales orgánicos en ausencia de oxígeno, generalmente en un período de entre 2 y 8 semanas, dependiendo del tipo de sustrato, en reactores diseñados para facilitar la captura y utilización de los gases producidos [30]. Un proceso equivalente se aplica a residuos sólidos municipales, que además de contener celulosa, pueden incluir grasas, proteínas y otras sustancias poliméricas. La DA es el método más utilizado y considerado viable en la conversión bioquímica de biomasa para producir energía. El producto obtenido, conocido como biogás, tiene un valor energético cercano a  $26 \text{ MJ (m}^3\text{)}^{-1}$  [31] y ocurre mediante la descomposición de compuestos biodegradables complejos en varias etapas, las cuales describen Abbasi y colaboradores [32]:

- Las proteínas, grasas y polímeros de carbohidratos (como celulosa y almidón) se descomponen en aminoácidos, ácidos grasos y azúcares por hidrólisis.
- Estos productos pasan a la fase de acidogénesis, donde se fermentan formando ácidos grasos volátiles, como ácido propiónico, láctico, valérico y butírico.
- En la etapa de acetogénesis, bacterias especializadas convierten estos compuestos en dióxido de carbono, ácido acético, e hidrógeno.
- Finalmente, en la fase metanogénica, los microorganismos utilizan acetato,  $H_2$  y parte del  $CO_2$  para producir metano. Estas vías bioquímicas incluyen la vía acetotrófica, hidrogenotrófica y metilotrófica,

Es importante destacar que diversos factores pueden inhibir el proceso de DA. Uno de los más críticos es la relación carbono/nitrógeno (C/N), que debe situarse en un rango óptimo entre 20:1 y 30:1. Si esta relación es demasiado elevada, el nitrógeno se consume rápidamente por los microorganismos metanogénicos y es necesario para sus

demanda protéica, dejando menos disponible para reaccionar con el carbono restante, lo que reduce la producción de biogás. Por otro lado, si la relación es muy baja, se libera mucho nitrógeno en forma de amoníaco, lo que puede elevar el pH por encima de 8.5 y resultar tóxico para las arqueas metanogénicas [31].

La dilución también es un aspecto clave: el agua debe añadirse estratégicamente para lograr una mezcla uniforme, sin que sea excesivamente líquida o demasiado espesa. Una suspensión demasiado densa puede dificultar la agitación y reducir la eficiencia del proceso, mientras que una demasiado diluida puede causar que las partículas sólidas se sedimenten, impidiendo su biodegradación. Sistemas diferentes pueden manejar grados variados de sólidos suspendidos, típicamente entre 10 – 25% [33]. El control del pH también influye significativamente en la producción de biogás: para lograr condiciones óptimas, los valores deben mantenerse entre 7.2 y 8.2. Los microorganismos metanogénicos funcionan en diferentes rangos de temperatura: termófilicos (50 – 65°C), mesofílicos (20 – 50°C) y psicrófilicos, que operan a temperaturas inferiores a 10°C y entre 10 – 20°C (en este caso, son considerados psicrófilicos obligados). Fuera de estos rangos, los consorcios microbianos no sobreviven ni trabajan eficazmente [34].

Otro factor relevante es el tiempo de retención, que se refiere al período durante el cual el sustrato y las bacterias permanecen en el digestor para completar la biodegradación. Reducir este período puede aumentar la eficiencia del proceso, siempre que se consideren aspectos como el tiempo de retención hidráulico (TRH), la toxicidad, la mezcla, las posibles bacterias patógenas y la presencia de residuos sólidos, especialmente aquellos con alto contenido de lignina, los cuales pueden requerir pretratamientos específicos para mejorar su digestión [28].

### **2.3.1 Factores digestivos durante la producción de biogás**

Esta línea tuvo un comienzo temprano al demostrar que el gas producido por los residuos vegetales en descomposición en los sedimentos era combustible; su identidad como metano llegó un siglo después, y los experimentos definitivos con bacterias metanogénicas llegaron con el aislamiento de *Methanobacillus omelianskii* en 1940, ese mismo año, con el cultivo de *M. omelianskii*, se descubrió la transferencia de hidrógeno

entre especies [35]. El organismo metanogénico del cultivo mixto, oxidó hidrógeno y redujo el dióxido de carbono a metano. En 1968, con grandes cantidades de células disponibles, se descubrió la primera coenzima única de metanogénesis y se denominó "coenzima M" [36]. Se determinó su estructura y se sintetizó su forma activa metilada, además, se encontró que la coenzima inusual era una "vitamina" requerida por un metanógeno del rumen de la vaca, *Methanobacterium ruminantium* [37]. Para analizar esta vitamina, este organismo se cultivó mediante un nuevo procedimiento, que implicó el uso de una atmósfera presurizada de hidrógeno y dióxido de carbono [38]. Después de análisis exhaustivos, CoM no se encontró en ningún otro lugar de la naturaleza.

Se han reconocido cinco órdenes diferentes de metanógenos: Metanosarcinales, Metanomicrobiales, Metanococcales, Metanobacteriales y Metanopyrales [39], por lo tanto, pueden dirigirse de manera mucho más eficiente como un gremio fisiológico coherente en análisis ecológicos moleculares mediante el uso de un gen marcador funcional específico. La metilcoenzima M reductasa (*mcr*) es la enzima clave de la metanogénesis, que cataliza el paso final en la metanogénesis, la reducción del grupo metilo unido a la coenzima M a metano [40].

Las comunidades microbianas en los procesos de digestión anaeróbica responden fácilmente a los cambios en la composición del sustrato, anteriormente, solo unos pocos estudios se habían centrado en los efectos de la temperatura en las comunidades de arqueas bacterianas y metanogénicas en biorreactores anaeróbicos. Los reactores de digestión anaeróbica se han operado comúnmente a temperatura mesófila (30 – 40°C) y termófila (50 – 60°C). En general, se encuentran mayor diversidad de bacterias y arqueas a temperaturas mesófilas, donde las comunidades bacterianas parecen ser considerablemente más diversas y dinámicas que las comunidades de arqueas a cualquier temperatura. A pesar de la menor diversidad, la digestión a temperaturas termofílicas resulta en una mayor eficiencia de degradación de la materia orgánica, más biogás total producido e higienización superior del sustrato de alimentación [13, 41, 42].

### 2.3.2 Co-digestión anaerobia

La co-digestión es la conversión simultánea de una mezcla de diferentes materias primas, por ejemplo, estiércol y biomasa vegetal. En el pasado, la DA se refería principalmente a un solo sustrato/proceso de salida única, pero recientemente, la co-digestión se ha convertido en una tecnología estándar en la producción de biogás agrícola en muchos países [27].

La co-digestión a menudo se lleva a cabo en procesos húmedos de un solo paso, en donde los sustratos se diluyen hasta que el contenido de sólidos secos esté entre el 8 y el 15%. Los sistemas húmedos son particularmente útiles cuando se va a aplicar digestato en los campos sin separar la fracción sólida [43]. La digestión de los cultivos a menudo requiere largos TRH que pueden durar hasta meses, y se pueden aplicar temperaturas tanto mesófilas como termófilas. Las ventajas de la co-digestión incluyen un mayor rendimiento de biogás y reducción de gases de efecto invernadero, homogeneización, alta estabilidad del proceso, reducción de olores, alto reciclaje de nutrientes (nitrógeno, fósforo), gran cantidad de sustratos diferentes que se pueden convertir, posibilidad de integración en el tratamiento de aguas residuales en instalaciones de producción ganadera, producción constante de biogás durante toda la temporada, ingresos potenciales mejorados de las tarifas de entrada y tratamiento de desechos, y sin efectos “indirectos” como el cambio de uso de la tierra [44].

### 2.4 *Ricinus communis* generalidades

El ricino, conocido científicamente como *Ricinus communis* L., pertenece a la familia Euphorbiaceae y presenta una gran diversidad de variedades nativas de los trópicos [5]. El nombre *Ricinus* es una palabra latina para garrapata. La planta es llamada así debido a que sus semillas poseen marcas y una protuberancia que recuerdan a este parásito. El término común “aceite de ricino” deriva de su utilización como sustituto de ciertos perfumes basados en glándulas secas de la planta. Según la taxonomía presente en Bolaji y colaboradores [45], la clasificación presente en la **Tabla 2** del ricino es la siguiente:

**Tabla 2. Taxonomía de *Ricinus communis***

<b>CATEGORÍA</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>
<b>Dominio</b>	<b>Eucariota</b>
<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>Superdivisión</b>	<b>Spermatophyta</b>
<b>Division</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Subclase</b>	<b>Rosidae</b>
<b>Orden</b>	<b>Euphorbiales</b>
<b>Familia</b>	<b>Euphorbiaceae</b>
<b>Genero</b>	<b><i>Ricinus</i></b>
<b>Especie</b>	<b><i>R. communis</i></b>

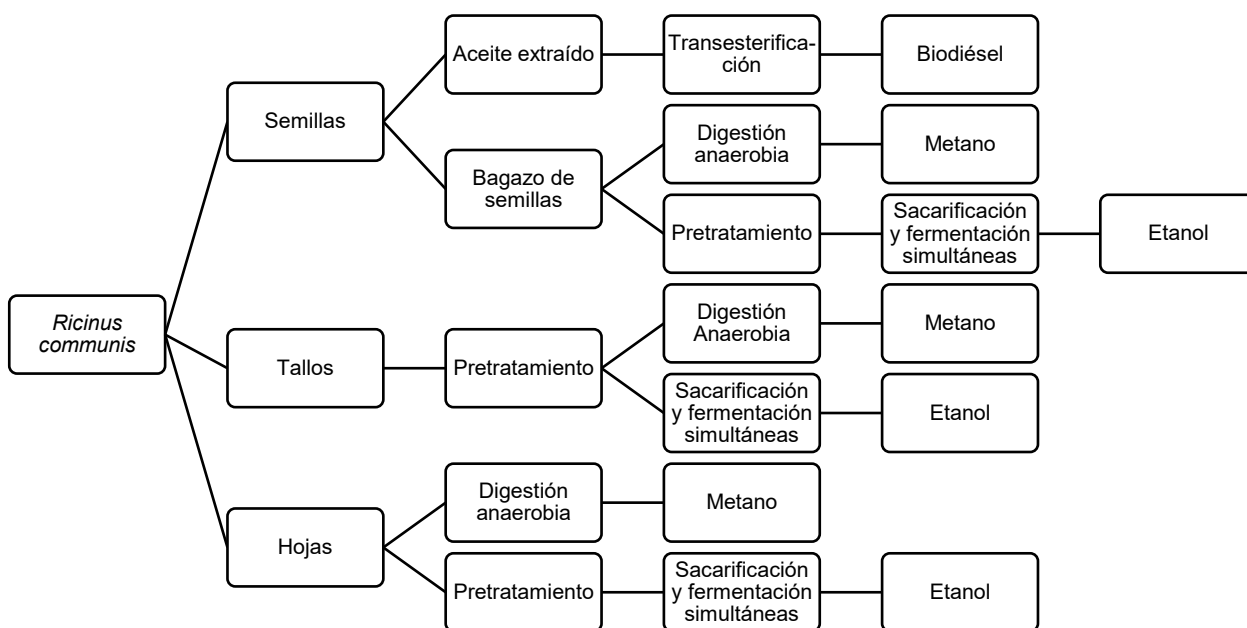
El ricino es un arbusto que puede crecer por encima de los 10 m. Algunas variedades cultivadas crecen entre 60 y 120 cm en solo un año, mientras que en cultivos perennes puede extenderse varios metros. Esta planta prospera en regiones tropicales húmedas y en zonas subtropicales secas, con una precipitación óptima entre 750 y 1000 mm y temperaturas que oscilan entre 15 y 38 °C. La recolección del aceite de ricino es un proceso complejo. Cuando se realiza manualmente, se corta selectivamente el racimo maduro y posteriormente se remueven las cápsulas. Debido a que las semillas maduran en diferentes etapas, puede ser necesario realizar hasta cinco cosechas distintas. En el caso de cosechas mecanizadas, se emplean cosechadoras adaptadas que, en algunos casos, solo separan parcialmente las cápsulas inmaduras. Cuando se utiliza esta técnica, las plantas suelen estar desprovistas de hojas, lo cual puede requerir el uso previo de defoliantes [46].

## **2.5 Biocombustibles derivados de *Ricinus communis***

Toda la planta de ricino puede ser utilizada para la obtención de diversos biocombustibles, ya sea a partir de su aceite o de residuos como el tallo, las hojas y el bagazo. En la **Figura 1**, se ilustran las diferentes categorías que se pueden obtener a partir de distintas partes del arbusto [47]. El biodiésel consiste en una mezcla de ésteres monoalquílicos derivados de aceites vegetales o grasas animales, cuya producción se realiza mediante un proceso de transesterificación [48]. La obtención de biodiésel a partir del aceite extraído de las semillas de ricino se realiza generalmente mediante una

reacción catalítica con alcohol, habitualmente metanol. Para acelerar la reacción y aumentar su rendimiento, se emplean catalizadores, que pueden ser álcalis (como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonatos y sus alcóxidos correspondientes), ácidos (como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido sulfónico) o enzimáticos [49].

Por otro lado, el etanol y el biogás son otros biocombustibles que se producen industrialmente a partir de biomasa fácilmente degradable, como azúcares y materiales con alto contenido de almidón [50].



**Figura 1. Procesos y productos de *Ricinus communis* [47]**

Debido a la limitada disponibilidad de materiales ricos en almidón y azúcar, las sustancias lignocelulósicas, que representan una opción económica y abundante, como *R. communis*, se han considerado como materia prima alternativa para la obtención de alcohol y biogás. Para convertir estos materiales en biocombustibles, generalmente se lleva a cabo una hidrólisis ácida o enzimática, seguida de una fase de fermentación en la

que suele emplearse *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque los compuestos lignocelulósicos contienen una cantidad significativa de carbohidratos susceptibles de convertirse en bioetanol y biogás, su estructura resistente presenta un obstáculo importante para su conversión directa a estos productos [50]. Por ello, es imprescindible realizar un pretratamiento que atenúe la recalcitrancia de los materiales, en concreto, reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la superficie accesible y eliminar la lignina y la hemicelulosa [51, 52]. Tras este proceso, los sustratos pretratados pueden someterse a digestión anaeróbica para producir biogás, o bien ser hidrolizados para transformar los carbohidratos en azúcares fermentables, que posteriormente utilizan los microorganismos para producir etanol. Se han desarrollado diversos métodos de pretratamiento para modificar la estructura de los lignocelulósicos, incluyendo técnicas físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas. Entre ellas, el pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio destaca como uno de los más efectivos, ya que puede potenciar significativamente la eficiencia en la obtención de etanol a partir de estos materiales [53].

### **2.5.1 Generación de biogás a partir de *Ricinus communis***

Aunque la producción de biodiesel a partir del aceite de ricino ha sido ampliamente investigada, son escasos los estudios enfocados en la generación de biogás a partir de los residuos de esta planta. La estructura y la cantidad de desechos generados han motivado investigaciones sobre su potencial como materia prima en procesos de DA. Por ejemplo, en un estudio de Alves y colaboradores [54], se llevaron a cabo diferentes experimentos para aprovechar el bagazo de las semillas, sometiéndolo a DA. En estos ensayos, se compararon distintas condiciones: la adición exclusiva de agua (control negativo), agua con estiércol de vaca y agua con estiércol porcino, en digestores operados por lotes con un TRH de 56 *d*. Los resultados indicaron que la combinación de agua y estiércol vacuno generó la mayor producción de biogás, alcanzando aproximadamente 1 *L*. En otro trabajo, Bateni y colaboradores [47] estudiaron el efecto del tratamiento de residuos de toda la planta, incluyendo tallo, hojas y bagazo de semilla. A estos materiales se les aplicó un pretratamiento alcalino con una solución de *NaOH* al 8% *p/v* a 100°C durante 60 *min* en un período de retención de 45 *d*. Los resultados mostraron un aumento del 44%; en la producción de metano a partir del tallo de ricino,

pero no se observó una mejora significativa en el rendimiento de en la generación de metano a partir del bagazo y las hojas. Además, el bagazo de semilla en su estado no tratado obtuvo el mayor rendimiento de producción de metano, con  $252.1 \text{ mL} \cdot \text{gVS}^{-1}$ .

## 2.6 Biorreactores

La tecnología de biorreactores atrae un gran interés en procesos como el cultivo de biomasa microbiana, la conversión de biocombustibles y los sistemas electroquímicos debido a su simplicidad, reacción moderada, sostenibilidad, bajo consumo de energía y materias primas además de una huella de carbono mínima. Sin lugar a duda, la tecnología de biorreactores es uno de los enfoques más prometedores para el aprovechamiento de biomasa, la conversión de energía, y juega un papel importante en este bioproceso [55]. Existe diversidad de biorreactores y cada configuración afecta el TRS y el TRH. Es preferible un TRH mínimo para reducir el volumen del digestor y los costos de capital, por otro lado, un TRS máximo logra la estabilidad del proceso y una producción mínima de lodos. Algunos tipos de biorreactores se mencionan en la **Tabla 3** y se da a conocer una breve descripción a continuación [56].

**Tabla 3. Tipos de digestores anaeróbicos**

<b>Características</b>	<b>Aplicación</b>
Sistema de crecimiento bacteriano	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suspendido</li> <li>• Lecho fijo</li> </ul>
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Psicrófila</li> <li>• Mesófila</li> <li>• Termófila</li> </ul>
Configuración	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una etapa</li> <li>• Dos etapas</li> </ul>

### Crecimiento bacteriano: suspendido

En los sistemas de crecimiento suspendido, las bacterias permanecen dispersas en el digestor gracias a una acción de mezcla, ya sea de manera intermitente o continua. La acción de mezcla distribuye las bacterias o biomasa por todo el digestor porque los digestores anaeróbicos completamente mezclados no incorporan un medio para retener

y concentrar la biomasa, el TRS es el mismo que el TRH, por lo tanto, los digestores anaeróbicos completamente mezclados están diseñados para TRH relativamente largos, el lodo de alimentación se puede agregar al digestor de forma continua o intermitente [57]. Las ventajas y desventajas de los digestores de crecimiento suspendidos completamente mezclados se encuentran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Ventajas y desventajas de los digestores anaeróbicos de crecimiento suspendido**

<b>Ventajas</b>	<p><b>Flexibilidad operativa:</b> Permite la granulación de diferentes materiales. Además, distribuye uniforme nutrientes, pH y sustrato.</p> <p><b>Control de temperatura preciso:</b> Facilita la inyección de digestato líquido y la posterior evaporación del agua.</p> <p><b>Resistencia de las partículas:</b> Los gránulos obtenidos son más resistentes al rompimiento, con mejores propiedades de flujo y menor formación de polvo y aglomerados.</p>
<b>Desventajas</b>	<p><b>Mayor rendimiento en escalas de mayor tamaño:</b> Se observa una menor eficiencia en la producción en el laboratorio frente a la escala piloto, y se requiere un gran volumen de digestor para proporcionar el TRS necesario.</p> <p><b>Formación de polvo y arrastre de partículas:</b> La eficacia del tratamiento puede reducirse debido a la pérdida de partículas y coloidales. Residuos y bacterias en el efluente del digestor.</p>

[58]

### **Crecimiento bacteriano de película fija**

Los sistemas anaeróbicos de película fija (mantas de lodo), proporcionan un entorno inactivo para el crecimiento de una masa aglutinada de bacterias debido a que el crecimiento bacteriano requiere periodos de tiempo relativamente largos para desarrollarse, suelen utilizar grava, plástico y roca como medios de apoyo y operan como procesos de flujo continuo, es decir, las aguas residuales pasan por encima y a través de un lecho de película fija de crecimiento de bacterias, los compuestos orgánicos solubles en el agua residual son absorbidos (difundidos) por las bacterias, mientras que los compuestos orgánicos insolubles son adsorbidos (adheridos) a la superficie de las bacterias. El flujo de aguas residuales a través de sistemas de película fija puede ser de

abajo hacia arriba o de arriba hacia abajo. Debido a que las bacterias (sólidos) en los sistemas de película fija permanecen en el digestor durante largos TRS, los sistemas permiten que las bacterias formadoras de metano se aclimaten a sustancias tóxicas como amoníaco, sulfuro y formaldehído, por lo tanto, los sistemas anaeróbicos de película fija con TRS largos y TRH cortos pueden usarse para tratar una variedad de aguas residuales y lodos, proporcionan un buen contacto entre los residuos y las bacterias, y pueden tratar aguas residuales y lodos en un rango relativamente amplio de valores de temperatura de 4 a 55°C, ver **Tabla 5** [57, 59, 60].

**Tabla 5. Sistemas anaeróbicos de lecho fijo**

---

Reactor con deflectores internos
Cama expandida
Cama de microportadores expandida (MCB)
Reactor de lecho fluidizado
Flujo ascendente completamente empaquetado
Flujo híbrido
Modular
Contactador biológico giratorio
Biorreactor de película fina
Manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB)

---

[61]

### **Temperatura psicrófila**

La digestión de lodos psicrófilos y la producción de metano ocurren en un rango de temperatura relativamente bajo (5 – 20°C). Debido a la actividad menos que óptima de las bacterias anaeróbicas en el rango de temperatura psicrófila, la digestión de lodos se limita a operaciones a pequeña escala como tanques Imhoff, tanques sépticos y lagunas de lodos. La temperatura del contenido del digestor es aproximadamente la temperatura de su entorno circundante y varía de una temporada a otra. Debido a que las temperaturas en los digestores psicrófilos son relativamente bajas, los TRS de estos digestores son superiores a 100 d [56, 62].

### **Temperatura mesofílica**

La digestión y la producción de metano se producen en un rango de temperatura moderado (30 – 42°C). La digestión anaeróbica mesófila se usa comúnmente en el proceso de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales y ofrece dos

ventajas prácticas de operación en comparación con la digestión anaeróbica psicrófila y termófila. Primero, hay más mesófilos anaeróbicos en la naturaleza que psicrófilos y termófilos, En segundo lugar, es menos costoso mantener temperaturas mesófilas en los digestores que mantener temperaturas termófilas. La mayoría de los digestores anaeróbicos operan en el rango mesofílico [27, 56].

### **Temperatura termofílica**

Ronda entre 50 – 60°C. La digestión anaeróbica termofílica se usa con más frecuencia en plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, donde el calor o vapor del proceso está disponible para calentar los digestores hasta el rango termofílico. Debido a la alta temperatura de operación de estos digestores, la digestión de lodos y la producción de metano ocurren rápidamente y se logra una destrucción significativa de patógenos. Sin embargo, además de los altos costos de operación, los digestores termofílicos tienen algunas preocupaciones microbiológicas importantes con respecto a su uso en lodos degradados. El número de bacterias formadoras de metano termofílico es muy limitado, el crecimiento bacteriano es lento y la población bacteriana experimenta una alta tasa de muerte endógena, además, las bacterias son muy sensibles a las fluctuaciones en el digestor [56, 63].

### **Configuración: una etapa**

Un digestor típico de una sola etapa consta de un solo tanque o reactor. Las operaciones del digestor consisten en la adición y extracción de lodos, mezcla, calentamiento, recolección de gas y sobrenadante. Estas operaciones son posibles debido a la estratificación del contenido del digestor. La estratificación da como resultado las siguientes capas de arriba a abajo del digestor: gas, escoria, sobrenadante, lodo del digestor activo y lodo y arena digeridos. Los digestores de una etapa se alteran más fácilmente que los digestores de dos etapas. Esto se debe a la presencia de actividades simultáneas de dos grupos de bacterias, las bacterias formadoras de ácido y las bacterias formadoras de metano. Debido a que las bacterias formadoras de ácido crecen más rápidamente que las bacterias formadoras de metano y son más tolerantes a las fluctuaciones en las condiciones operativas, a menudo se produce un desequilibrio entre la tasa de producción de ácido y la tasa de producción de metano. Este desequilibrio

puede causar una disminución en la alcalinidad y el pH que resulta en una falla del digestor [56].

### **Configuración: dos etapas**

Los sistemas de digestión de dos etapas constan de al menos dos tanques o reactores separados. Hay disponible una variedad limitada de sistemas de dos etapas donde se produce una mayor eficiencia y estabilidad sobre un sistema de una sola etapa. Un sistema de dos etapas es capaz de obtener una producción de metano y una reducción de sólidos similares a las de un sistema de una sola etapa con una TRH más pequeña. Además, los tóxicos se eliminan en la primera etapa. En algunos sistemas de dos etapas, la producción de ácido ocurre en la primera etapa o tanque y la producción de metano ocurre en la segunda etapa. En algunos sistemas, la digestión de lodos y la producción de metano ocurren simultánea y continuamente en un tanque y el espesamiento y almacenamiento de lodos ocurren en el otro tanque, en esta configuración, la primera etapa se mezcla y calienta continuamente para la digestión del lodo, mientras que se permite la estratificación en la segunda etapa, donde se produce el espesamiento y almacenamiento del lodo. Otros sistemas consisten en la digestión anaeróbica en fases de temperatura de lodos o aguas residuales, estos sistemas son una combinación de digestión anaeróbica termófila y mesófila, además, proporcionan una mejor capacidad de deshidratación de los lodos y una reducción del número de patógenos [64, 65].

### **2.7 Purificación de biogás**

La mayoría de las aplicaciones de biogás requieren un nivel mínimo de  $CH_4$ , lo que convierte al  $CO_2$  y al  $N_2$  en los principales contaminantes del biogás debido a sus altas concentraciones, además, su presencia también reduce el índice Wobbe de biogás, un parámetro al que se apunta en la mayoría de las regulaciones internacionales sobre biometano [66]. El  $O_2$  también se considera una impureza de biogás por encima de un umbral de concentración crítico en función de su actividad comburente. El  $H_2S$  en combinación con  $O_2$  y agua genera  $H_2SO_4$ , que puede corroer motores, tanques de almacenamiento de gas, tuberías y compresores. La presencia de halocarbonos y  $NH_3$  también puede causar corrosión en tuberías y motores durante la combustión de biogás [67]. Finalmente, la presencia de metilsiloxanos está atrayendo cada vez más atención

debido a la formación no deseada de depósitos de óxido de silica durante la combustión, que pueden causar abrasión, sobrecalentamiento y mal funcionamiento de motores y válvulas [68].

La valorización del biogás ha implicado tradicionalmente la generación de calor y energía a través de la combustión de biogás en turbinas, micro-turbinas o motores de combustión interna. El biogás, tanto en su forma reformada para pilas de combustible (cogeneración) como autogás o sustituto del gas natural (inyección en redes), exige distintos niveles de depuración. En particular, su uso como autogás o sustituto del gas natural requiere una limpieza más estricta que su combustión directa para valorización energética [69].

### **3 Hipótesis**

La relación de carbono/nitrógeno ajustado en una proporción de 25:1, mediante la utilización de paja y bagazo de higuera en co-digestión con heces equinas y porcinas, aumenta la disponibilidad de sustrato soluble, donde la variación de las condiciones operativas y los tipos de sustratos empleados genera cambios en la comunidad bacteriana, lo que conduce a un incremento en la producción de biogás en al menos un 50%.

#### **4 Objetivo general**

Evaluar residuos de higuera co-digeridos con excretas equinas y porcinas para la obtención de biogás en un biodigestor de flujo semicontinuo.

#### **5 Objetivos específicos**

- Caracterizar fisicoquímicamente residuos de higuera y heces porcinas y equinas para ajustar la relación C/N en una proporción 25: 1.
- Analizar el contenido de biogás obtenido a partir de residuos de higuera en co-digestión con excretas porcinas y equinas in vitro.
- Identificar la composición de las comunidades bacterianas durante el proceso de digestión anaerobia in vitro.
- Desarrollar un prototipo de biorreactor de flujo semicontinuo para la producción de biogás.

## 6 Metodología

### 6.1 Recolección de sustratos

Se trabajó con residuos de *Ricinus communis*, así como con heces equinas y porcinas. El material vegetal se recolectó en mayo del 2021 de plantas ubicadas en el municipio de Corregidora, Querétaro, México (20°31'40.1" latitud norte, 100°25'42.7" longitud oeste). Después de una semana de deshidratación natural de los tallos y hojas, el material vegetal fue cortado y triturado en una licuadora doméstica, para posteriormente tamizarse y obtener un tamaño de partícula de hasta 2 mm.

El bagazo de semilla se obtuvo al triturar las semillas de higuera en una prensa extractora de aceite. Mientras que las heces equinas y porcinas se recopilaron de una granja denominada "Granjas Paulina SA de CV", ubicada en el municipio de Santiago de Querétaro, Querétaro, México (20°38'16" latitud norte, 100°17'16" longitud oeste). Las muestras fecales se recolectaron en estado fresco y se colocaron en bolsas de polietileno de color negro con dimensiones de 96.5x130.8 cm. Tras la recolección, las muestras se almacenaron por separado en dos hieleras de poliestireno expandido con capacidad de 21 L a 12°C para su transporte al laboratorio de "Compuestos Naturales Insecticidas" en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicada en el municipio de Santiago de Querétaro, Qro., México (20°35'22" latitud norte, 100°24'39" latitud oeste), donde fueron almacenadas a una temperatura de 4°C hasta su posterior uso.

### 6.2 Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles

Para la determinación de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) en los sustratos recolectados, las muestras se caracterizaron siguiendo la metodología estandarizada de la APHA [70]. Inicialmente, las cápsulas de porcelana, previamente identificadas con una marca indeleble en su base, se llevaron a peso constante para determinar su peso inicial "C". Posteriormente, se pesó una porción de la muestra homogeneizada "X" en cada cápsula y se secó en estufa a 105°C hasta peso constante, registrando el peso final "E". Los sólidos fijos "M" se obtuvieron por calcinación de la muestra seca en mufla a 550°C.

Finalmente, el contenido de sólidos volátiles se calculó por diferencia entre el peso de los sólidos totales y el de los sólidos fijos.

#### **Ecuación 1**

$$ST[\%] = \frac{(E - C) * 100}{X}$$

#### **Ecuación 2**

$$SV[\%] = \frac{(E - M) * 100}{X}$$

#### **Ecuación 3**

$$SF[\%] = \frac{(M - C) * 100}{X}$$

Tras la co-digestión, las muestras semilíquidas resultantes se analizaron pesando el volumen de 15 *mL* de la muestra homogeneizada, designada como "Y".

Los valores de ST, SV y sólidos fijos (SF) se determinaron aplicando la **Ecuación 1**, **Ecuación 2** y **Ecuación 3**, respectivamente, con la modificación de sustituir el peso "X" por el peso "Y". Este procedimiento permitió obtener la concentración de sólidos en gramos por litro de muestra.

### **6.3 Determinación de azúcares reductores**

Esta determinación se realizó mediante el método ácido sulfúrico y fenol [71]. En tubos HACH para DQO, se adicionaron secuencialmente: 1 *mL* de cada dilución patrón o agua desionizada (para el blanco), 1 *mL* de solución de fenol al 5% y 5 *mL* de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ). Tras tapar y homogeneizar los tubos, se dejaron enfriar durante 10 *min* a temperatura ambiente, seguido de 15 *min* en un baño de agua a 4°C. La absorbancia de hexosas se midió espectrofotométricamente a 490 *nm*.

### **6.4 Análisis de la demanda química de oxígeno**

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó mediante el método fotométrico [72], basado en la medición de la cantidad de oxidante consumido. Previo al análisis de las muestras, se prepararon las soluciones de digestión con dicromato de potasio

( $K_2Cr_2O_7$ ),  $H_2SO_4$  y sulfato de mercurio ( $HgSO_4$ ) y la catalizadora con sulfato de plata ( $Ag_2SO_4$ ) y  $H_2SO_4$ .

Para cada muestra, se tomaron 2 mL previamente homogeneizados y se diluyeron si su DQO estimada superaba los  $1000\text{ mg L}^{-1}$ . En un tubo HACH, se adicionaron cuidadosamente 1.2 mL de la solución de digestión y 2.8 mL de la solución catalizadora. Los tubos se incubaron en un digestor precalentado a  $150^\circ\text{C}$  durante 2 h. Tras enfriar a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de cualquier precipitado, se midió la absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro.

### 6.5 Determinación de contenido de carbono y nitrógeno total

El contenido de carbono en las diferentes muestras (residuos de higuera, heces de caballo y cerdo) se determinó mediante el método de Walkley-Black [73]. Para ello se pesaron 0.5 g de muestra y se añadieron 10 mL de  $K_2Cr_2O_7$  1 N y 20 mL de  $H_2SO_4$ , mezclando vigorosamente durante 1 min. Tras una incubación de 30 min, se adicionaron 200 mL de agua destilada, 5 mL de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) y 10 gotas de difenilamina ( $(C_6H_5)_2NH$ ) como indicador. La mezcla se tituló con una solución de sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) 1 N hasta la aparición de un color verde claro, momento en el cual se aplicó la **Ecuación 4** para el cálculo del contenido de carbono.

#### Ecuación 4

$$\%C = \left(\frac{B-T}{g}\right)(N)(mcf)(0.6724)$$

Donde:

B=Volumen de sulfato ferroso para valorar el blanco de reactivo (mL)

T=Volumen de sulfato ferroso para valorar la muestra (mL)

N= Normalidad del sulfato ferroso

g=Peso de la muestra (g)

mcf=factor de corrección de la humedad

La determinación de nitrógeno total se realizó mediante el método Kjeldahl [74]. Inicialmente, se pesaron 0.5 g de muestra y se mezclaron con 1.1 g de catalizador de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y 3 mL de  $H_2SO_4$ . La mezcla se calentó a  $150^\circ\text{C}$  durante 1 h, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente y la adición de 20 mL de agua destilada.

Posteriormente, la muestra digerida se transfirió al equipo de destilación Kjeldahl. Se añadieron 10 mL de hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) 10 N para liberar el amoníaco ( $NH_3$ ), el cual se destiló y se recogió en un matraz receptor conteniendo 10 mL de solución de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) 1% con indicador. La destilación se continuó hasta alcanzar un volumen de 75 mL en el matraz receptor.

Finalmente, la solución del matraz receptor se tituló con  $H_2SO_4$  0.01 N utilizando una microbureta de 10 mL. El punto final de la titulación se identificó por el viraje del color del indicador de verde a rosa, momento en el que se aplicó la **Ecuación 5** para el cálculo del contenido de nitrógeno total.

#### Ecuación 5

$$\%N_{Total} = \frac{14(V_m - V_b)(N)}{10w}$$

Donde:

$V_m$ =Volumen de ácido sulfúrico empleado para titular la muestra (mL)

$V_b$ =Volumen de ácido sulfúrico utilizado para titular el blanco (mL)

$N$ =Normalidad del ácido sulfúrico

$w$ =Peso de muestra (g)

### 6.6 Proceso de digestión anaerobia

Los procesos de digestión se realizaron utilizando un sustrato con un 7% de sólidos totales (ST) y una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 25: 1. A nivel de laboratorio, se dejaron dos lotes de experimentos: uno a temperatura ambiente y otro a temperatura controlada de 37°C, con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura en la producción de biogás. Los experimentos se llevaron a cabo en reactores tipo batch con un volumen total de 120 mL, de los cuales se utilizaron 66.7% de volumen activo. En estos reactores se realizó co-digestión de residuos de higuera junto con excretas equinas y porcinas, manteniendo constante la proporción de C/N. Todos los biorreactores se sellaron herméticamente monitoreando la producción de biogás cada 24 h mediante desplazamiento volumétrico, manteniendo un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 82 d, lo que permitió que los sustratos se degradasen de manera eficiente y que se obtuvieran datos representativos del proceso.

Posteriormente, se realizó el escalamiento a un biodigestor de flujo semicontinuo de 200 L, en el cual se introdujeron los cuatro sustratos, manteniendo las condiciones de laboratorio descritos en la sección 7.6 (a excepción del control de temperatura para uno de los lotes). La alimentación se realizó con un 7% de sólidos totales (ST) y una relación C/N de 25: 1, calculada mediante la **Ecuación 6** [75], llenando el biodigestor hasta el 60% de su capacidad total. Los datos utilizados para estos cálculos se obtuvieron a partir de las propiedades de los sustratos iniciales. Esta configuración tuvo como objetivo promover una reacción estable, facilitar la producción de biogás y garantizar la eficiencia del proceso a mayor escala, para posibles aplicaciones prácticas.

#### **Ecuación 6**

$$\frac{C}{N} = \frac{Q_1 C_1 + Q_2 C_2 \cdots + Q_n C_n}{Q_1 N_1 + Q_2 N_2 \cdots + Q_n N_n}$$

Donde:

$\frac{C}{N}$  = Relación carbono-nitrógeno

$Q$  = Peso del sustrato (g)

$C$  = Contenido de carbono (%)

$N$  = Contenido de nitrógeno (%)

## **6.7 Identificación de la composición de la comunidad de Arqueas metanogénicas**

### **6.7.1 Preparación de las muestras**

La identificación de las arqueas metanogénicas presentes en las muestras, se realizó a partir de las heces fecales de cerdo y caballo. Tomando 200  $\mu g$  de cada una, y posteriormente se extrajo una alícuota de 2 mL de cada vial que contenían las co-digestiones, con el fin de preservar la integridad de los microorganismos. Cada muestra se homogeneizó cuidadosamente mediante mezcla vigorosa para garantizar una distribución uniforme de los componentes tanto en las heces, como en el proceso de digestión anaerobia (DA) para la posterior extracción de ADN.

### 6.7.2 Extracción de ADN genómico total

Para la extracción de ADN se empleó el kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research). Inicialmente, se realizó la lisis mecánica de las células. Para ello, se añadió la muestra a un tubo ZR BashingBead™ Lysis Tube, seguido de la adición de 750 µL de BashingBead™ Buffer. A continuación, la mezcla se agitó en un vórtex durante 40 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10000 *rpm* durante 2 *min*. Se transfirieron cuidadosamente 400 µL del sobrenadante al filtro Zymo-Spin™ III-F, colocado en un Collection Tube, y se centrifugó a 8000 *rpm* durante 1 *min*. Al filtrado obtenido se añadieron 1200 µL de Genomic Lysis Buffer, resuspendiendo la mezcla cuidadosamente. A continuación, se transfirieron 800 µL de esta mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICR, colocada en un Collection Tube, y se centrifugó a 10000 *rpm* por 1 *min*. Tras descartar el flujo, se repitió este paso para procesar el resto de la mezcla inicial. Después, se añadieron 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ IICR, ahora en un nuevo Collection Tube, y se centrifugó nuevamente a 10000 *rpm* durante 1 *min*. Se añadieron 500 µL de g-DNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ IICR, y se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. Para la elución del ADN, la columna Zymo-Spin™ IICR se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL. Se añadieron 100 µL de DNA Elution Buffer directamente sobre la matriz de la columna, y se centrifugó a 10000 *rpm* durante 30 *seg*. Para la remoción de polifenoles, se colocó la columna Zymo-Spin™ III-HRC en un tubo de recolección limpio y se agregaron 600 µL de solución de preparación al filtro, centrifugando a 8000 *rpm* por 3 *min*. Finalmente, el ADN eluido se transfirió sobre el filtro Zymo-Spin™ III-HRC, colocado en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL, y se centrifugó a 16000 *rpm* durante 3 *min*.

La calidad y tamaño del ADN extraído se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio, visualizando los fragmentos bajo luz UV.

### 6.7.3 Amplificación del gen *mcrA/mrtA*

Los fragmentos del gen *mcrA/mrtA*, relacionados con organismos metanogénicos, fueron amplificados mediante PCR usando los cebadores degenerados basados en la alineación

de 5 secuencias del gen *mcrA* ya establecidas [76] y la identificación de dos regiones con alto grado de homología flanqueando una región más variable. Los dos cebadores de oligonucleótidos fueron un cebador directo: (*mcrA*-F) 5'-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC-3' y un cebador inverso: 5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT-3'. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial a 98°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 98°C durante 90 s, 50°C durante 30 s, y 72°C durante 20 s. La reacción total (50 µL) contenía: 1 µL de cada cebador, 1.25 U de ADN polimerasa, y 1 µL del extracto de ADN extraída anteriormente (7.8.2).

Las reacciones se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. La validación del tamaño de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV (100 – 400 nm).

#### **6.7.4 Clonación y secuenciación de productos PCR**

Los fragmentos amplificados se insertaron en vectores plasmídicos y se transformaron en cepas de *Escherichia coli* [77]. Se realizó el cribado de clonas positivas, que fueron secuenciados en la plataforma de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se analizaron y editaron utilizando el software MEGA, y se compararon con las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el algoritmo BLAST.

#### **6.7.5 Análisis filogenético**

Para construir el árbol filogenético, se seleccionaron las secuencias con mayor similitud a las de los amplicones. La relación evolutiva se infirió mediante el método Neighbor-Joining [78] en el software MEGA.

#### **6.7.6 Análisis taxonómico de co-gestiones durante la digestión anaerobia**

Se generó un análisis de agrupamiento jerárquico tanto a las familias encontradas, como a las muestras en un mapa de calor, donde se observó la composición microbiana a nivel de familia en el conjunto de muestras de los controles positivos de las heces, y de las co-

digestiones en el día 60 de la DA. Cada celda en el mapa de calor mostró la abundancia relativa de una familia específica en una muestra en particular, con la intensidad del color indicando la abundancia (rojo indica alta abundancia, azul representa baja abundancia). El agrupamiento de las familias se basó en la similitud de sus patrones de abundancia a través de las muestras, lo que permitió identificar grupos de familias que tienden a coocurrir.

## 6.8 Diseño y desarrollo de un biodigestor de flujo semicontinuo

El proceso de diseño se llevó a cabo siguiendo una serie de pasos específicos, estableciendo la funcionalidad y la seguridad del equipo, considerando las características del sustrato, los requisitos operativos y las condiciones del proceso. A continuación, se detallan las etapas que conformaron el desarrollo del biodigestor, desde la selección de materiales y componentes, hasta la integración de sistemas de control y monitoreo necesarios para su correcto funcionamiento.

### 6.8.1 Dimensionamiento y cálculo del biodigestor

El principal criterio para determinar el tamaño de un reactor anaeróbico es la vida útil de los microorganismos involucrados en el proceso. Por tanto, el volumen operativo del biorreactor está definido por el tiempo de retención de la biomasa y la cantidad de materia tratada por unidad de tiempo. La estimación del volumen de trabajo del biorreactor se realiza mediante la **Ecuación 7** [79].

#### Ecuación 7

$$V_d = 0.1 \frac{M_{SM}}{B_T} T_{i\bar{s}}$$

Donde:

$V_d$  = volumen de trabajo del biorreactor [ $m^3$ ]

$M_{SM}$  = masa del material seco [kg]

$B_T$  = densidad de masa [ $\text{kg } (m^3)^{-1}$ ]

$T_{i\tilde{s}} = \text{TRH } [d]$

Entonces, el volumen total del reactor es igual a la **Ecuación 8**:

**Ecuación 8**

$$V = 125 \cdot V_d$$

Donde:

$V$  = volumen total del reactor [ $m^3$ ]

El volumen de fermentación del reactor es equivalente a la **Ecuación 9**:

**Ecuación 9**

$$V_f = 0.3142 \cdot D^3$$

Donde:

$V_f$  = volumen de fermentación del reactor [ $m^3$ ]

$D$  = diámetro del biorreactor [ $m$ ].

La altura de la parte cilíndrica del reactor viene dada por la **Ecuación 10**:

**Ecuación 10**

$$H = \frac{4 \cdot V_f}{3.14 \cdot D^2}$$

En la Ecuación 11 se determina el volumen de acumulación (almacenamiento) en  $m^3$  de biogás:

**Ecuación 11**

$$V_{ds} = 0.0527 \cdot D^3$$

El volumen de recolección de gas recomendado es  $\leq 5\%$  del volumen total del reactor por lo que se usa la **Ecuación 12**:

**Ecuación 12**

$$V_s = 0.05 \cdot V$$

### 6.8.2 Diseño en 3D del biodigestor

Con los datos recopilados en la sección 7.9.1, se llevó a cabo el diseño del biodigestor en el software de modelado en 3D SolidWorks23. Este proceso incluyó la elaboración del modelo digital que permitió visualizar detalladamente la estructura del biodigestor, considerando aspectos relevantes como la geometría, la distribución interna, las dimensiones específicas y los materiales propuestos, con la finalidad de garantizar su funcionalidad y eficiencia en condiciones de operación reales. Asimismo, se diseñó una base que permitió la colocación del biodigestor en posición horizontal, facilitando su agitación manual, así como el llenado y vaciado del equipo. Para monitorear las condiciones de operación, se integraron sensores de pH y temperatura en el diseño. En la Tabla 6. Materiales utilizados en la modelación del biodigestor **Tabla 6** se detallan los materiales utilizados en la modelación.

**Tabla 6. Materiales utilizados en la modelación del biodigestor**

<b>MATERIALES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Perfil cuadrado 1.5X1.5" rojo	6 m
Placa de acero A36 de ¼" de espesor	50x50 cm
Barra de acero A36 cuadrada de 1"	6 m
Chumacera De Piso ¾"	1
Rueda de base fija uso rudo 2"	2
Mango giratorio M6	1
Contenedor cilíndrico 200 L	1
Acoplador de latón macho NPT hembra ¼" y ½"	2
Tubo latón Barstock Street Tee T de 3 vías NPT ¼" hembra x ¼" hembra x ¼" macho adaptador	1
Cople de latón, cuerda ¼" NPT, hembra	1
Conector de latón en T hembra de 3 vías NPT de ¼ x ¼"	1
Cople de latón, tipo FF, cuerda ¼" NPT	2
Niple macho-macho de latón, cuerda ¼" NPT	2
Adaptador de tubería de latón, macho ¼", hembra ¼".	2
Niple terminal espiga ¼"	1
Conector de tubería de latón, 5/8-18 UNF	1
Tornillo M6X20 Acero inox	10
Arandela plana agujero M6	10
Tuerca M6 acero inox	20

Tornillo M6X16 acero inox cabeza plana	10
Conector pasamuros PVC 4"	2
Manómetro de Glicerina 0-50 psi Conexión inferior ¼"	1
Conector TF hembra NPT ¼"	1
Válvula de bola ¼" NPT	2
Válvula antirretorno unidireccional de acero inoxidable, ¼" NPT hembra a macho de rosca	2
Monitor De Ph Y Temperatura	1

### 6.9 Modelado en 3D del sistema de purificación

El sistema de purificación de biogás fue conceptualizado y diseñado mediante un enfoque de modelación en el que se consideraron cuatro etapas dispuestas en columnas interconectadas que operan en paralelo, cada una con una función específica. En la primera etapa, se modeló una columna rellena de una solución con  $NaOH$  al 3M permitiendo la disolución de partículas y siloxanos, además de la absorción de  $CO_2$ , estas impurezas pueden causar daños en motores de combustión, turbinas y calderas, afectando la conversión del biogás en calor y electricidad [80, 81].

En la segunda etapa, se diseñó una columna equipada con carbón activado, seleccionado por su alta superficie específica, comportamiento lineal en la isoterma de adsorción, seguridad, disponibilidad y estabilidad a largo plazo, para retirar selectivamente el mayor porcentaje posible de  $CO_2$  [69].

La tercera etapa contempló un filtro con óxido de zinc ( $ZnO$ ), destinado a facilitar la retención del  $H_2S$  durante el recorrido del biogás a través del sistema [68].

La cuarta etapa se integró un módulo con gel de sílice, diseñado específicamente para eliminar el vapor de agua presente en el biogás [20].

Los componentes utilizados para la modelación de los filtros se encuentran enlistados en la **Tabla 7**

**Tabla 7. Materiales utilizados en la modelación del sistema de purificación**

<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>
Tubería flexible de cobre ¼"	10 m
Conector TF hembra NPT ¼"	2
Manguera macho-macho ¼" NPT	1
Niple campana de latón de 5/8" macho x ½" hembra	1
Tubo PVC de 6" de diámetro, 1.5 m	1
Tapón PVC 6"	8
Válvula antirretorno unidireccional de acero inoxidable, ¼" NPT hembra a macho de rosca	4
Acoplador de latón macho NPT hembra ¼" y ½"	8
Tubo de compresión de latón, conector de unión de compresión ¼"	8

### **6.10 Diseño experimental**

Se evaluaron los efectos de las variables experimentales sobre las respuestas utilizando un diseño completamente aleatorizado por triplicado. En este estudio, se investigó el impacto de la variable principal: la materia prima compuesta. La respuesta analizada fue la cantidad de biogás producida diariamente y la determinación de sólidos en base seca de los sustratos. La relación entre estas variables y la respuesta se modeló mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), utilizando el software Minitab (versión 9.0). Los coeficientes del modelo se estimaron con el método de mínimos cuadrados parciales. A los datos de producción de biogás se les evaluó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Después, se procedió con el análisis estadístico mediante ANDEVA de un factor y una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

## 7 Resultados y Discusión

### 7.1 Análisis Fisicoquímicos

#### 7.1.1 Determinación de sólidos

Los análisis físicos para los diferentes residuos (**Tabla 8**) se realizaron para cada sustrato utilizado en base seca antes de la co-digestión.

Los resultados relacionados con la planta de higuierilla arrojaron que el bagazo presentó el mayor contenido de ST, con un porcentaje de 97%. En comparación, las partes aéreas mostraron una disminución del 4.3%. En cuanto a los SV, las partes aéreas alcanzaron el mayor porcentaje con un 69.5%, lo que representó una reducción de 6.5% en relación con el bagazo. Para los SF, el bagazo destacó con un contenido de 31.9%, superando a las partes aéreas en un 27.6%. Adicionalmente, se observó que el bagazo tenía un contenido de humedad del 3.1%, lo que es un 57.5% menos que el registrado para las partes aéreas.

Con relación a los residuos animales, mostrados en la **Tabla 8**, las heces porcinas presentan un aumento del 23.4% ST en comparación con las heces equinas, en términos de SV, las heces porcinas muestran un incremento del 19.8% respecto a las heces equinas. Por otro lado, para los SF, las heces porcinas tienen un 47.6% más contenido que las heces equinas, indicando una mayor proporción de material no volátil, mientras que, en el contenido de humedad, las heces equinas tienen un 9.4% más de agua que las heces porcinas, lo que sugiere características físicas distintas que podrían influir en su comportamiento durante el proceso de co-digestión. Estos contrastes destacan las variaciones en la composición de las heces equinas y porcinas, con implicaciones potenciales para su uso como sustrato en procesos biológicos.

Por su parte Kaur y colaboradores [82] reportaron 88.9 y 74.3% de ST y SV, para los residuos (hojas y tallos) de *R. communis* previamente deshidratados, los cuales fueron similares a los obtenidos en esta investigación, donde se observa que las partes aéreas de la higuierilla presentan un contenido de ST superior en un 4.1%, aunque los valores de SV son un 6.4% más bajos. Además, el contenido de humedad en esta investigación disminuyó en un 3.8%, lo que sugiere variaciones en las características compositivas de

las partes aéreas de estas plantas, posiblemente debido a factores como el estado de deshidratación y las condiciones de crecimiento [83, 84] .

Estos resultados sugieren que, aunque las partes aéreas de la higuera tienen un alto contenido de ST, su menor contenido de SV en comparación con otros residuos de *R. communis* puede influir en la eficiencia de su utilización en procesos de conversión energética. Esto resalta la importancia de considerar la naturaleza específica y la composición de cada tipo de residuo al evaluar su potencial como sustrato en bioenergía [85, 86].

En cuanto al bagazo de semilla, Hilioti y colaboradores [87] observaron 5.6% de SF y 7.2% de humedad, el primer valor está por debajo de esta investigación por 26.3%, mientras que el segundo solo tiene una diferencia del 4.1%. Alves y colaboradores [54] reportaron 9.97% de humedad, este contenido está 6.87% arriba del obtenido en esta investigación. Estas discrepancias pueden atribuirse a varios factores, es posible que existan diferencias en las variedades de las plantas analizadas, lo que influiría en la composición del bagazo. Además, la etapa de madurez de las plantas en el momento de la cosecha puede afectar la composición química del bagazo, que varía a medida que la planta se desarrolla. Factores como el tipo de suelo y el clima en el que crecen las plantas también pueden incidir en la composición del bagazo [88, 89]. Sin embargo, las investigaciones previas no realizaron análisis de ST y SV para el bagazo de higuera, por ello se seleccionaron bagazos de semillas de plantas oleaginosas que pertenecen a la misma familia que la higuera como el bagazo de semilla de *Jatropha*, donde Chandra y colaboradores [90] encontraron contenidos de ST, SV, SF y humedad de 92.5, 86.4, 7 y 7.5% respectivamente, de acuerdo con la **Tabla 8**, el valor de ST es similar al obtenido para el bagazo de higuera ya que solo difiere en un aumento de 4.4%, mientras que para los SV y contenido de humedad disminuye en 21.4% y 4.4% respectivamente, estas diferencias pueden deberse, además de ser diferentes especies de plantas, los autores realizaron extracción por Soxhlet. Esto puede explicar el mayor contenido de SF encontrado. Además, las condiciones en las que se almacena el bagazo antes del análisis podrían influir en el contenido de humedad y otros componentes [89].

Para las heces equinas Böske y colaboradores [91] y Kalia y colaboradores, encontraron contenidos de ST de 19.87% y 22.6% respectivamente, valores que se alinean más con lo reportado en la **Tabla 8**, ya que solo tiene un aumento de 3.8% y 1%. Sin embargo, el porcentaje reportado por Wartell y colaboradores [92], que fue del 37%, se aparta notablemente de los datos de la tabla, sugiriendo que las condiciones de recolección, alimentación y manejo del ganado pueden influir en la composición del estiércol.

Por otro lado, Chong y colaboradores [93], reportaron un alto contenido de SV de 70.4% para el mismo estiércol de caballo, otros como Kalia y colaboradores [94] y Böske y colaboradores [91] también indican porcentajes más elevados, de 87.65% y 17.54% respectivamente. Además, Chong y colaboradores [93] y Lee y colaboradores [95] mostraron números considerablemente bajos, de 10.5% y 15.7%, que contrastan con los resultados más altos observados en otros estudios. Esto destaca la variabilidad en los métodos de análisis y las condiciones bajo las cuales se obtienen las muestras.

Finalmente, el contenido de humedad en las heces equinas de la **Tabla 8** se encuentra en un 76.3%, que es coherente con los hallazgos de Caro y colaboradores [96] que reportaron un contenido similar de 68%. Sin embargo, los otros estudios de Chong y Lee mostraron cifras muy bajas, de 8.2% y 0.7% respectivamente, lo que sugiere que el método de almacenamiento y el tiempo desde la recolección hasta el análisis pueden afectar drásticamente las mediciones de humedad.

Los ST para las heces porcinas reportados por Wang y colaboradores [97], Riya y colaboradores [98] y Zhang y colaboradores [97], [98], [99], fueron de 22.9%, 25.5% y 28.8% respectivamente, que comparados con los ST de la **Tabla 8** para heces porcinas, es superior a los valores solo con diferencia del 8, 5.4 y 2.1% respectivamente. En cuanto a los SV, se alinea más estrechamente con el valor registrado por Zhang y colaboradores [97], [98], [99] de 24.9%, solo con 0.9% de diferencia. Sin embargo, es superior con 6.1% y 8% a los valores de 17.93% y 16% reportados por Wang y colaboradores [97] y Riya y colaboradores [98]. Esta variación podría atribuirse a diferencias en las dietas de los cerdos, las condiciones de muestreo, o los métodos de tratamiento de las heces antes del análisis, también podría estar relacionada con diferencias en el contenido orgánico de las muestras, que puede ser afectado por factores dietéticos y ambientales [100]. El

contenido de humedad obtenido en esta investigación fue 8% menor que los 77.1% reportados por Wang y colaboradores [97] y 1.4% por debajo del 70.5% documentado por otro trabajo de este autor Wang y colaboradores [101]. Esta disminución en el contenido de humedad podría ser resultado de varias variables, incluyendo el tiempo de almacenamiento y condiciones de secado antes del análisis.

**Tabla 8 Determinación de análisis físicos en base seca.**

<b>Muestra</b>	<b>ST [%]</b>	<b>SV [%]</b>	<b>SF [%]</b>	<b>Humedad [%]</b>
<b>Partes aéreas</b>	92.7 ± 0.6 <sup>A</sup>	69.5 ± 2.8 <sup>A</sup>	23.1 ± 3 <sup>B</sup>	7.3 ± 0.6 <sup>C</sup>
<b>Bagazo</b>	96.9±0.7 <sup>A</sup>	65 ± 3.8 <sup>A</sup>	31.9 ± 2 <sup>A</sup>	3.1 ± 0.7 <sup>C</sup>
<b>Heces equinas</b>	23.65 ± 3.3 <sup>C</sup>	19.23 ± 3.9 <sup>B</sup>	4.4 ± 0.6 <sup>C</sup>	76.3 ± 3.3 <sup>A</sup>
<b>Heces porcinas</b>	30.9 ± 3.2 <sup>B</sup>	24 ± 1.7 <sup>B</sup>	8.4 ± 0.9 <sup>C</sup>	69.1 ± 3.2 <sup>B</sup>
Los resultados obtenidos son el resultado del promedio de tres muestras.				
ST= sólidos totales SV= sólidos volátiles SF= sólidos fijos				

### **7.1.2 Determinación de carbohidratos, demanda química de oxígeno y relación C/N.**

En esta sección se analizan las concentraciones de carbohidratos, DQO y la relación C/N en los diferentes sustratos evaluados. La **Tabla 9** muestra que las heces porcinas presentan el mayor contenido de carbohidratos, seguidas por las partes aéreas, las heces equinas y el bagazo, disminuyendo en un 59.2%, 72.8% y 81.1%, respectivamente, en comparación con las heces porcinas. Esta variabilidad sugiere que la fuente y tipo del sustrato influyen en la disponibilidad de carbohidratos, lo que a su vez indica un mayor potencial nutritivo en el manejo de residuos, especialmente para aplicaciones en alimentación animal o procesos de bioconversión [102, 103].

La concentración de DQO es mayor en las heces equinas, seguidas por las heces porcinas, el bagazo y las partes aéreas, mostrando una disminución del 5.8%, 15% y 30.6%, respectivamente en comparación con las heces equinas, estos resultados reflejan las diferencias en la biodegradabilidad de los sustratos y su potencial para la producción

de biogás. Esto es relevante al considerar la gestión de residuos, ya que las heces son una alternativa viable para el tratamiento anaeróbico [104, 105].

La relación C/N también presenta variaciones, siendo más alta en las heces equinas, seguido de las heces porcinas, partes aéreas y el bagazo con disminuciones del 88.7%, 436.7% y 747.6% respectivamente. Esto sugiere que las heces tanto equinas como porcinas son más ricas en carbono, lo que puede favorecer la mineralización del nitrógeno durante su uso como enmienda orgánica. Las partes aéreas y el bagazo tienen una relación C/N más baja, lo que podría facilitar la disponibilidad de nitrógeno en su uso como complemento de las heces para potenciar la digestión anaerobia [106, 107, 108].

Los resultados obtenidos para los residuos de higuera no pueden ser comparados con investigaciones previas debido a la falta de análisis específicos de carbohidratos y DQO para estos sustratos. Sin embargo, Kaur y colaboradores [82] reportaron una relación C/N de 9.3:1 para las partes aéreas de la higuera y Hilioti y colaboradores [87] encontraron 27.5:1 para los tallos, lo que sugiere que los resultados de esta investigación se alinean con los reportes previos.

En el caso del bagazo, la relación C/N se encuentra entre los valores reportados por Alves y colaboradores [54] y Hilioti y colaboradores [87], que fueron de 7.4:1 y 15.7:1, respectivamente. Esto resalta la importancia de seleccionar cuidadosamente los materiales orgánicos utilizados en la alimentación animal o la producción de biocombustibles, de acuerdo con su contenido en nutrientes.

Para las heces equinas, Williams y colaboradores [109] reportaron una concentración de carbohidratos de  $90.6 \text{ mg L}^{-1}$ , lo que representa un 277.6% menos que el valor obtenido en este estudio. Por otro lado, Shubaashini y colaboradores [110] informaron  $3005 \text{ mg L}^{-1}$  de DQO, 178.2% más que lo encontrado en esta investigación, lo que sugiere que factores estacionales o de manejo pueden estar influyendo en la variabilidad de los resultados.

En cuanto a las heces porcinas, Bona y colaboradores [111] lograron concentraciones de carbohidratos de  $1891.2 \text{ mg L}^{-1}$ , 50.1% superior al registrado en este estudio. Además, la concentración de DQO reportada por Carrère y colaboradores [112] fue más alta,

alcanzando  $33240 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , lo que representa más del 100% que los resultados obtenidos aquí. Esto puede indicar que las heces porcinas en esta investigación pueden requerir un manejo diferente para maximizar su potencial como recurso nutritivo o como materia prima en procesos biológicos, como la producción de biogás. La alta variabilidad en los resultados entre diferentes estudios puede deberse a múltiples factores, como el tipo de alimentación del ganado, el manejo de los residuos y las condiciones ambientales. En consecuencia, es fundamental realizar un análisis exhaustivo y contextualizado para optimizar el uso de cada sustrato, asegurando así un aprovechamiento eficiente de los recursos para la generación de energía [113].

**Tabla 9 Determinación de análisis químicos.**

<b>Muestra</b>	<b>Carbohidratos [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>DQO [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>C/N</b>
<b>Partes aéreas</b>	514.4	749.4	19.9: 1
<b>Bagazo</b>	238.2	918.6	12.6: 1
<b>Heces equinas</b>	342.1	1080.1	106.8: 1
<b>Heces porcinas</b>	1259.7	1017.1	56.6: 1
DQO= Demanda química de oxígeno			
C/N= Relación carbono/nitrógeno			

## **7.2 Identificación de *Arqueas* Metanogénicas en Heces**

### **7.2.1 Análisis Filogenético**

Los principales hallazgos derivados del análisis filogenético llevado a cabo con las secuencias del gen *mcrA/mrtA* obtenidas de las muestras de heces de caballo y cerdo, denotadas como FE y FP antes de la digestión anaerobia. Se determinaron las relaciones evolutivas entre los microorganismos metanogénicos presentes en las distintas muestras, con el fin de comprender mejor su diversidad y patrón de parentesco. Este análisis permitió detectar agrupaciones, conocidas como clados, que muestran relaciones cercanas en su historia evolutiva. Los grupos relevantes presentaron valores de bootstrap cercanos a 100, lo que indica un alto nivel de soporte estadístico, por lo tanto, una alta confianza en relaciones filogenéticas [114].

El árbol filogenético (**Figura 2**) mostró una tendencia a la formación de clados separados según el origen de la muestra, aunque algunos grupos incluyen muestras de ambos orígenes. Los que tienen mayor soporte sugieren una relación evolutiva robusta entre los microorganismos que los componen.

El primer clado relevante incluye secuencias FE5 y FE8, junto a la cepa de referencia *Methanosarcina barkeri* CM1. Esta agrupación sugirió que los microorganismos metanogénicos presentes en las muestras de heces de caballo están estrechamente relacionados con *M. barkeri*, especie conocida por su capacidad de producir metano. Otro clado agrupó las especies *Methanobrevibacter smithii* y *Methanobrevibacter millerae* para las muestras FP18 y FP9. La presencia de estos metanógenos en las muestras porcinas indica una comunidad microbiana diversificada, que emplean principalmente hidrógeno y dióxido de carbono, característicos de los entornos intestinales, y que probablemente desempeñan un papel importante en el equilibrio metabólico de las heces porcinas. El clado compuesto por *Methanoculleus* y *Methanosaeta* agrupados en ramas diferentes, indica que estas especies contribuyen a la diversidad de metanógenos en las muestras tanto equinas como porcinas identificados en FE12, FP12, FP14 y FP17. Finalmente, los grupos que incluyen *Candidatus methanogranum*, *Methanosarcina* y otros, ubicados en ramas independientes del árbol, corresponden a las muestras FE15, FP17 y FP16, reflejan una mayor diversidad de metanógenos, algunos de ellos aún no completamente taxonomizados como "Candidatus".

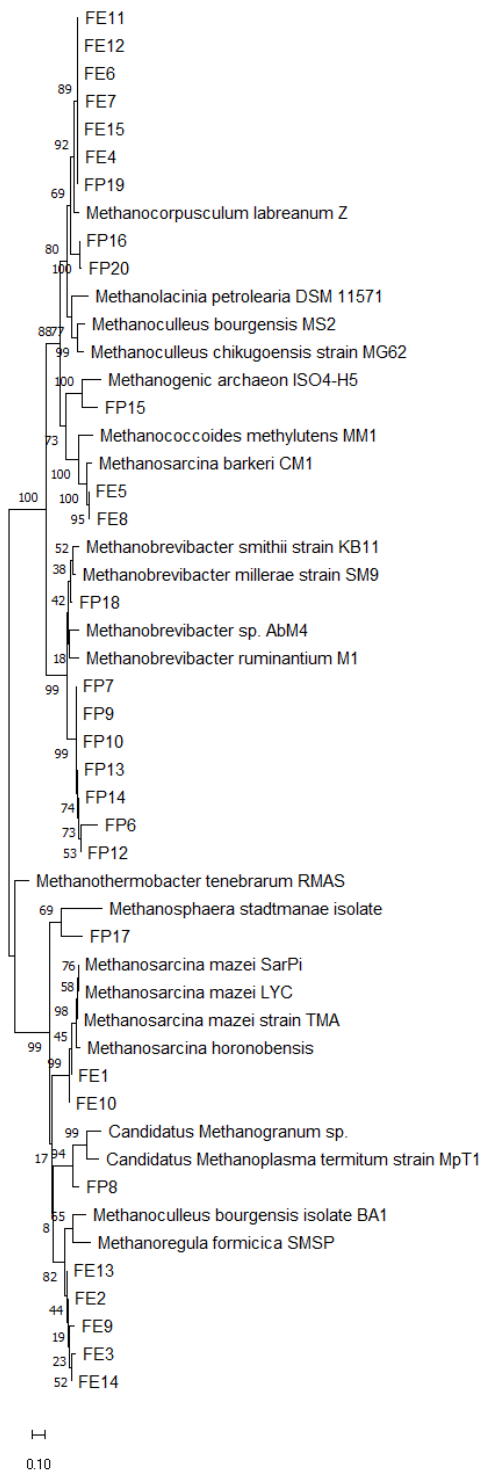
Dado que este estudio se enfocó en la amplificación y secuenciación del gen *mcrA/mrtA*, los resultados reflejaron principalmente la diversidad de microorganismos metanogénicos, que son los responsables de la etapa final de producción de metano en el proceso de digestión anaerobia, estas especies encontradas en heces tanto equinas como porcinas, se encuentran en la **Tabla 10**.

En contraste con Zhu y colaboradores [115] quienes reportaron una predominancia del 57% de Methanobacteriales (familia Methanobacteriaceae) en un biodigestor alimentado exclusivamente con heces de cerdo, nuestro análisis reveló una composición en las heces porcinas, donde especies como *Methanogenic archaeon ISO4-H5*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter sp. AbM4*, *Methanobrevibacter ruminantium M1* y *Methanosphaera stadtmanae* (todos

pertenecientes a la misma familia) fueron más abundantes. Además ellos encontraron 34,2% de Methanomicrobiales (familia Methanomicrobiaceae), mientras que en nuestro estudio solo identificamos a *Methanolacinia petrolearia* de esta familia en las heces porcinas. A diferencia de Zhu, no detectamos especies pertenecientes a la familia Methanosarcinaceae en las heces porcinas, lo que podría atribuirse a la mayor susceptibilidad de las *Methanosarcina* a condiciones ambientales y medios de cultivo específicos [116]. Por lo tanto, es posible que las condiciones específicas de la DA, como la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de productos metabólicos en comparación con el ambiente natural de las heces, favorecieron el crecimiento natural de este grupo.

Por otro lado, en un estudio realizado por Murru et al. [117] sobre la diversidad de metanógenos en heces de caballo, se identificó a los metanobacteriales (familia Methanobacteriaceae) como el grupo dominante, con una abundancia relativa superior al 12%. En contraste, en nuestras muestras fecales equinas, no se detectaron especies pertenecientes a esta familia. Sin embargo, en ese mismo estudio reportaron una baja abundancia de metanomicrobiales (familia Methanomicrobiaceae), inferior al 5%, mientras que de acuerdo con la **Tabla 10**, se identificó la arquea *Methanoculleus bourgensis*, perteneciente a esta misma familia. Asimismo, encontraron una baja representación (menor al 3%) de metanomassiliococcales (familia Methanocaldococcaceae,), grupo que no fue detectado en nuestro estudio. A diferencia de la baja representación de metanosarcinales (menor del 2%) en el estudio de Murru, en nuestro análisis se encontraron varias especies pertenecientes a la familia Methanosarcinaceae, incluyendo *Methanococcoides methylutens*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* SarPi, *Methanosarcina mazei* LYC, *Methanosarcina mazei strain* y *Methanosarcina horonobensis*; Esta discrepancia en la abundancia relativa de Methanobacteriaceae, Methanosarcinales y en la ausencia de Methanomassiliococcales y la presencia de Methanosarcinaceae, podría reflejar diferencias metodológicas entre ambos estudios, ya que ellos utilizaron el gen 16S rRNA, un marcador comúnmente empleado para estudios de diversidad microbiana, mientras que nosotros utilizamos el gen *mcrA*, que codifica una enzima clave en la metanogénesis y que, al ser más específico para arqueas metanogénicas, podría ofrecer una visión

diferente de la comunidad metanogénica. Además, esta discrepancia podría ser reflejo de las características del tracto intestinal de cada espécimen.



**Figura 2. Árbol filogenético de heces equinas y porcinas**

**Tabla 10. Arqueas metanogénicas identificadas en muestras fecales**

Arquea metanogénica	Porcina	Equina	Metabolismo	Hábitat	Importancia	Fuente
<i>Methanococcoides methylutens</i>	No	Sí	Utiliza metilaminas como fuente de energía.	Sedimentos marinos, ambientes anóxicos.	Degrada metilaminas, contribuyendo a la cadena trófica.	[118]
<i>Methanosarcina barkeri</i>	No	Sí	Versátil; utiliza acetato, metanol y metilaminas.	Sedimentos marinos, aguas negras	Desempeña un papel clave en la degradación de materia orgánica compleja en ambientes anaeróbicos.	[119]
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Sí	No	Utiliza $H_2$ y $CO_2$ para producir $CH_4$ (arquea hidrogenotrófica).	Intestino humano, rumen de animales.	Facilita la digestión de carbohidratos y absorción de nutrientes.	[120]
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	Sí	Sí	Utiliza $H_2$ y formiato para la metanogénesis. Algunas cepas pueden reducir alcoholes.	Sedimentos de lagos, reactores anaeróbicos	Contribuye a la descomposición de materia orgánica en ambientes anaeróbicos.	[121]
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	Sí	Sí	Hidrogenotrófico	Sedimentos de agua dulce	Degrada materia orgánica en ambientes acuáticos y produce metano en estos sistemas.	[122]

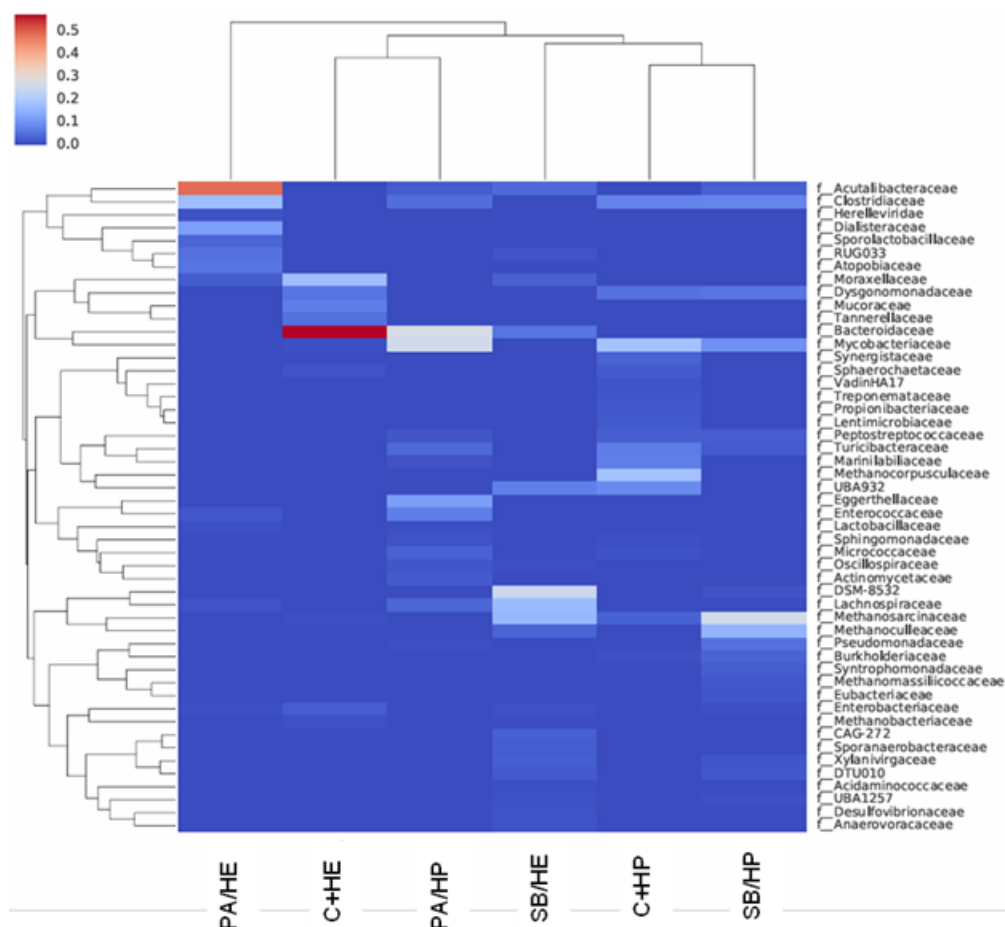
<i>Methanosarcina mazei</i>	No	Sí	Puede utilizar acetato, metanol y metilaminas	Reactores anaeróbicos	Crece en condiciones limitantes, contribuyendo a la producción de biogás.	[123]
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	Sí	No	Degradación de compuestos metilados	Pozos petroleros anaeróbicos	Participa en la biodegradación de compuestos orgánicos en ambientes petroleros	[124]
<i>Methanosarcina horonobensis</i>	No	Sí	Similar a <i>Methanosarcina</i> . utiliza variedad de sustratos	Acuíferos profundos	Es capaz de producir metano en condiciones extremas, como altas presiones y bajas temperaturas, es relevante en ambientes subterráneos.	[125]
<i>Methanogenic archaeon</i>	Sí	No	Reduce metilados y requiere CoM	Rumen ovino.	_____	[126]
<i>Methanoregula formicica</i>	No	Sí	Utiliza formiato para la metanogénesis	Suelos inundados, sedimentos anaeróbicos	Contribuye a la producción de metano en ambientes con alta disponibilidad de formiato, como los arrozales.	[127]

<i>Candidatus methanogranum</i>	Sí	No	similar a <i>Methanoplasma</i> (metilotrófica)	Intestino de insectos, reactores anaeróbicos	Degradación de metilados	[128]
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	Sí	No	Utiliza metanol y $H_2$ para la metanogénesis	Intestino humano y animal	Consumir metanol y reducir la concentración de $H_2$	[129]
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	Sí	No	Utiliza $H_2$ y $CO_2$ para la metanogénesis (hidrogenotrófico)	Rumen	Reduce la presión parcial de $H_2$ en el rumen, favoreciendo la fermentación de la fibra.	[130]

### 7.2.2 Análisis taxonómico de la comunidad microbiana durante la digestión anaerobia

En el mapa de calor mostrado en la **Figura 3**, se puede observar que para el C+HE tuvo una alta abundancia de la familia Bacteroidaceae, la cual está compuesta por bacterias Gram-negativas, anaerobias, que se encuentran comúnmente en la microbiota del intestino, esto sugiere que esta familia puede ser un componente importante de la microbiota natural de las heces equinas, o al menos favorecida en las condiciones de digestión de este control, ya que en la co-digestión de estas heces con partes aéreas de *R. communis*, la familia de bacterias que más abundó fue la Acutalibacteraceae, esta en específico, está directamente involucrada en el proceso de la DA, ya que participa en el proceso de acidogénesis, son bacterias fermentadoras anaerobias que metabolizan compuestos orgánicos, como los carbohidratos, y producen compuestos orgánicos volátiles como el acetato y el butirato, que podrían servir como alimento para los microorganismos que sí producen biogás [131, 132], mientras que para la combinación de SB/HE, lo que más abundó fue el DSM-8532, perteneciente al orden Clostridiales, que

crecen en ausencia de oxígeno, con un crecimiento óptimo a altas temperaturas ( $60^{\circ}\text{C}$ ), además, son capaces de degradar eficientemente polisacáridos de la biomasa vegetal, como la celulosa y la hemicelulosa, produce una serie de enzimas termoestables (xilanasas, exoglucanasas y endoglucanasas) que le permiten descomponer los componentes de la pared celular de las plantas para producir acetato, etanol,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , y pequeñas cantidades de lactato y L-alanina, debido a ello, puede presentarse en la fase de hidrólisis y acidogénesis de la DA [133], sin embargo, cabe destacar que su abundancia aunque fue la más alta, es escasa para esta co-digestión. Por otra parte, para el C+HP, no hay una abundancia bien marcada, la que más se encontró en esta muestra, pero con una baja abundancia fue la familia Methanocorpusculaceae, compuesta de arqueas metanógenas, lo que significa que su rol en la DA es producir biogás. Pertenecen al dominio arquea y son responsables de la etapa final del proceso de DA, la metanogénesis [134, 135, 136], en contraste, en esta misma muestra, con una abundancia similar, se encontró la familia Mycobacteriaceae, esta familia requiere oxígeno para su crecimiento y supervivencia lo que las excluye de los procesos de DA [137], esta misma familia también forma parte de la baja abundancia de la co-digestión de PA/HP, junto con la familia Bacteroidaceae, esta familia sí se ha encontrado que participa en la hidrólisis y la acidogénesis, ya que catabolizan y fermentan una amplia variedad de compuestos orgánicos complejos, especialmente los polisacáridos vegetales que son difíciles de digerir [138]. Finalmente, para la co-digestión de SB/HP se encontró una familia con una abundancia menor, la Methanosarcinaceae, es un grupo de arqueas metanógenas que desempeñan su papel en la etapa final la DA. A diferencia de muchos otros metanógenos, los miembros de esta familia son especialmente versátiles, ya que pueden producir metano a partir de una amplia gama de sustratos, debido a ello, pueden utilizar las tres principales vías metabólicas para producir metano (Acetotrófica, hidrogenotrófica y metilotrófica) [139, 140].



**Figura 3. Mapa de calor de abundancia familiar con agrupamiento de muestras.**

El color azul representa baja abundancia, el color rojo indica alta abundancia. PA/HE= co-digestión de partes aéreas de higuera con heces equinas; PA/HP= partes aéreas con heces porcinas; SB/HE= co-digestión de semilla de bagazo con heces equinas; SB/HP= semilla de bagazo con heces porcinas; C+HE= control positivo de heces equinas; C+HP= control positivo de heces porcinas.

Además, el análisis de la composición microbiana del C+HE presentado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** reveló una comunidad dominada por la especie *Bacteroides graminisolvens*, la cual representó el 47.3% de la abundancia relativa total. Esta especie es anaerobia estricta que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de animales, degrada diversos polisacáridos complejos presentes en la biomasa vegetal, fermentando los azúcares liberados, produciendo principalmente acetato, propionato, succinato y  $CO_2$ , por lo que juega un papel en la DA en las etapas de hidrólisis y acidogénesis, y la producción de sustratos para arqueas metanógenas. Por lo tanto, esta bacteria puede contribuir a la estabilidad de la gestión anaerobia [141].

Le siguen en abundancia la especie *Acinetobacter* sp. con un 17.3%, este tipo de bacterias son Gram-negativas, no fermentadoras y aerobias estrictas, por ello, no forman parte del proceso de DA [142]. Sin embargo, Pulami y colaboradores [143] han detectado que esta puede ayudar en las etapas iniciales de la DA o en zonas marginales del reactor con micro-oxigenación, consumiendo trazas de oxígeno, creando un ambiente más favorable para las bacterias anaeróbicas, las demás especies identificadas en esta muestra no presentan una alta abundancia. En la DA de la co-digestión de partes aéreas con heces equinas se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde se aprecia una abundancia de 43.7% para *Ruminococcaceae bacterium*, las Ruminococcaceae son una familia de bacterias anaerobias que poseen sistemas enzimáticos especializados para degradar polisacáridos complejos, como celulosa, hemicelulosa y almidón resistente, participan en la producción de ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato, por lo que son importantes en las etapas de hidrólisis y acidogénesis [144], el segundo más abundante, es *Clostridiaceae bacterium*, son esenciales para la digestión anaerobia debido a su capacidad de degradar materia orgánica compleja bajo condiciones anaerobias estrictas. Su acción en las primeras etapas (hidrólisis y acidogénesis) proporciona los sustratos necesarios para las siguientes etapas [145], en esta muestra, también se encuentra la presencia de *Dialister* spp., este género es conocido por ser bacteria fermentadora capaz de utilizar tanto azúcares como aminoácidos. Puede producir ácidos grasos volátiles que participan en la producción de biogás, logrando la estabilización del proceso y mejorando de la eficiencia en la descomposición de materia orgánica [146].

El análisis de la composición microbiana se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, la cual reveló que la familia Clostridiaceae es dominante en la muestra, representando un 40.2% del total. Dada la naturaleza fermentadora de muchas especies dentro de esta familia, y su capacidad para producir ácidos grasos volátiles,  $H_2$  y  $CO_2$  (todos intermediarios clave en la producción de metano), su alta proporción sugirió actividad fermentativa durante el proceso de digestión [145]. Adicionalmente, esta co-digestión en comparación con las muestras de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se encuentra en mayor abundancia con 15.8%, la especie *Methanosarcina thermophila*, como su nombre

lo indica, es una arquea termofílica portadora del gen *mcrA* y crucial para la metanogénesis ya que puede utilizar tanto la vía acetotrófica, que divide el acetato directamente en  $CH_4$  y  $CO_2$ , como las vías metilotróficas e hidrogenotróficas, indicando una capacidad importante para la conversión de intermediarios en biogás [116, 139, 147]. Finalmente, el orden *Bacteroidales*, con un 6.9%, incluye especies que degradan una variedad de polisacáridos complejos presentes en el bagazo y las heces, liberando azúcares y otros compuestos que sirven como sustratos para la fermentación por otras bacterias

[138,

141]

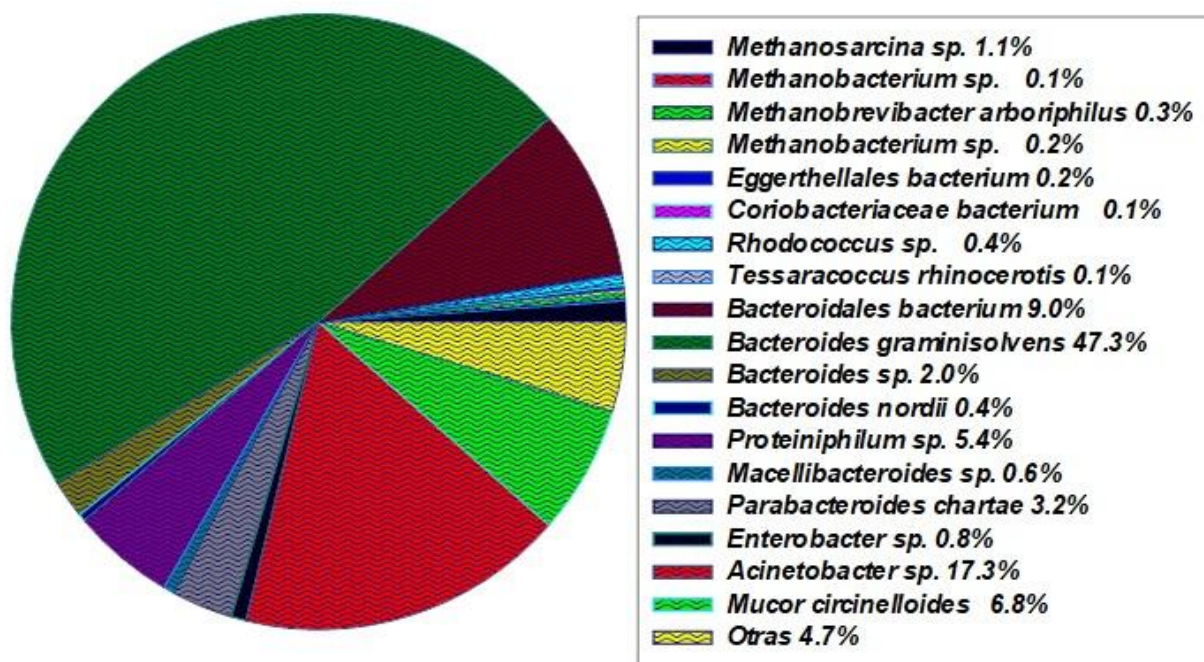


Figura 4. Abundancia relativa en el control positivo de heces equinas.

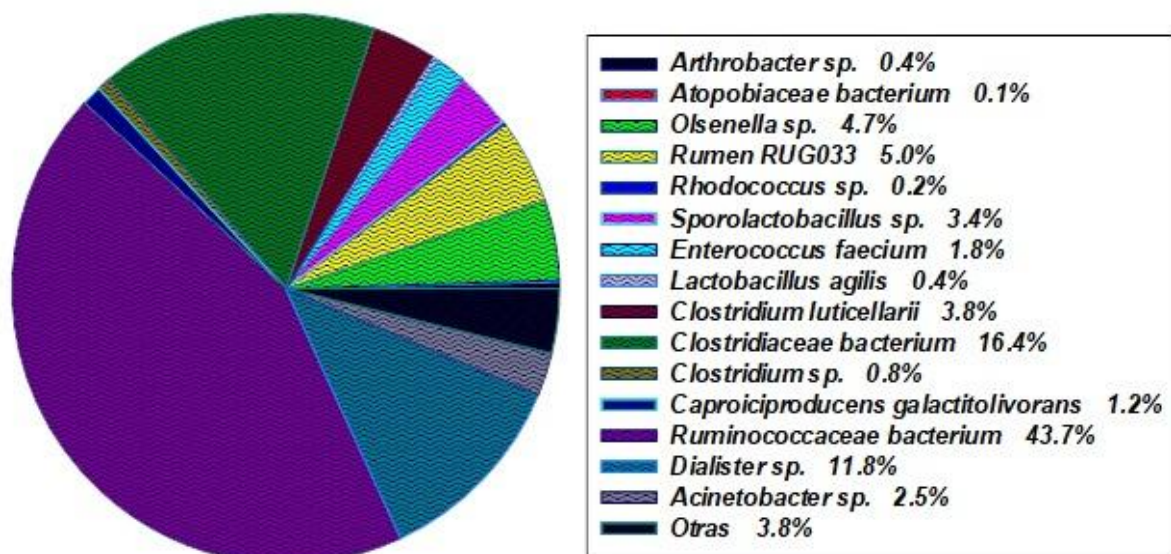


Figura 5. Abundancia relativa en la co-digestión de partes aéreas y heces equinas

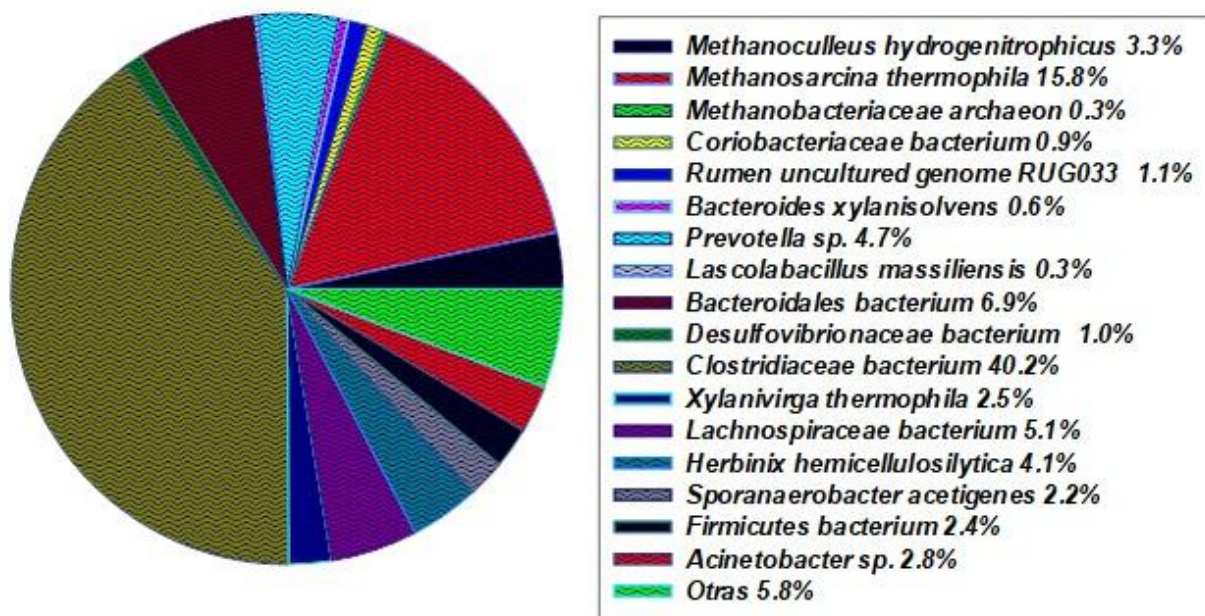


Figura 6. Abundancia relativa en la co-digestión de bagazo y heces equinas

Las comunidades microbianas presentes en las muestras de heces porcinas, específicamente en el control positivo mostrado en la [Error! No se encuentra el origen de la referencia.], revelaron una abundancia de *Bacteroidales bacterium*, representando el 20.4%. Este grupo de bacterias no produce metano directamente, pero participa en las etapas de acidogénesis y acidificación de la digestión anaerobia, facilitando la disponibilidad de sustratos para los microorganismos de las fases posteriores [138, 141]. La especie que sigue en predominancia es *Methanocorpusculum parvum*, esta arquea metanogénica puede adaptarse tanto a condiciones mesofílicas como termofílicas y porta el gen *mcrA*, lo que indica su participación en la fase final de la DA, donde produce metano a partir de  $H_2$  y  $CO_2$ , sustratos generados por bacterias fermentadoras como *Bacteroidales* [134, 136]. El tercer grupo de bacterias más abundante con 8.9% en esta muestra es el *Clostridium* sp., como se mencionó anteriormente, este grupo es capaz de fermentar una variedad de sustratos, produciendo ácido láctico, butírico, acetato,  $H_2$  y  $CO_2$ , participando en la segunda y tercer etapas de la DA [133, 145]. La presencia de estos microorganismos indicó que la muestra se encontraba en una fase entre la acetogénica y la metanogénica, caracterizando un estado de transición en la digestión anaerobia. Por otra parte, para la co-digestión de partes aéreas y heces porcinas mostrada en la [Error! No se encuentra el origen de la referencia.], la comunidad microbiana que predominó fueron *Bacteroides* sp., con 28.5%, siendo el más abundante en la muestra. Este grupo ya anteriormente mencionado en el control positivo puede participar en la degradación de carbohidratos complejos y proteínas, produciendo ácidos orgánicos,  $H_2$  y  $CO_2$ , esta comunidad se puede encontrar por lo tanto en la etapa de fermentación y acidogénesis [138, 141]. Le sigue en abundancia *Rhodococcus coprophilus* con un 21.8%, esta especie no participa directamente en la producción de metano, pero puede llegar a colaborar en la biodegradación de residuos orgánicos en ambientes anaeróbicos [148]. Otras bacterias incluyeron *Arthrobacter* sp. (2.9%) y *Gordonibacter massiliensis* (2.6%), las cuales también contribuyen en la degradación de sustratos mediante procesos de fermentación y descomposición de compuestos complejos [149, 150]. Por otra parte, la presencia de *Methanosarcina thermophila*, una arquea metanogénica con presencia mínima del 0.1%, indicó potencial para la fase de

metanogénesis, esta co-digestión podría encontrarse en fases iniciales o intermedias de la DA, donde la producción de metano aún no estaba plenamente establecida.

En la muestra de co-digestión de semilla de bagazo con heces porcinas de la [Error! No se encuentra el origen de la referencia.], se observó una comunidad microbiana diversa, con una mayor abundancia de *Methanosarcina flavescens* con un 25.4%. Es una arquea metanogénica portadora del gen *mcrA* lo que la posiciona en la participación de la producción de metano a partir de distintos sustratos, incluyendo  $H_2$ ,  $CO_2$  y acetato [139, 151]. Su alta presencia indica que la digestión de esta muestra progresa hacia la etapa de metanogénesis. Las bacterias del género *Clostridium* sp., con una participación del 20.7%, también son abundantes y juegan un papel fundamental en la fermentación primaria, degradando celulosa, hemicelulosa y otros polímeros complejos, produciendo ácidos orgánicos,  $H_2$  y  $CO_2$ , que alimentan las etapas secundarias de la digestión anaerobia [133, 145]. Otra arquea metanogénica portadora del gen *mcrA*, encontrada es *Methanoculleus* sp., que representa aproximadamente el 16% del total. Participa en la fase de metanogénesis hidrogenotrófica, utilizando  $H_2$  y  $CO_2$ , productos de la fermentación de los sustratos orgánicos por bacterias fermentadoras, en etapas finales del proceso de DA [152]. La presencia de diversos géneros en menores proporciones sustenta que el sistema se encuentra en una fase de transición entre la acidogénesis y la metanogénesis.

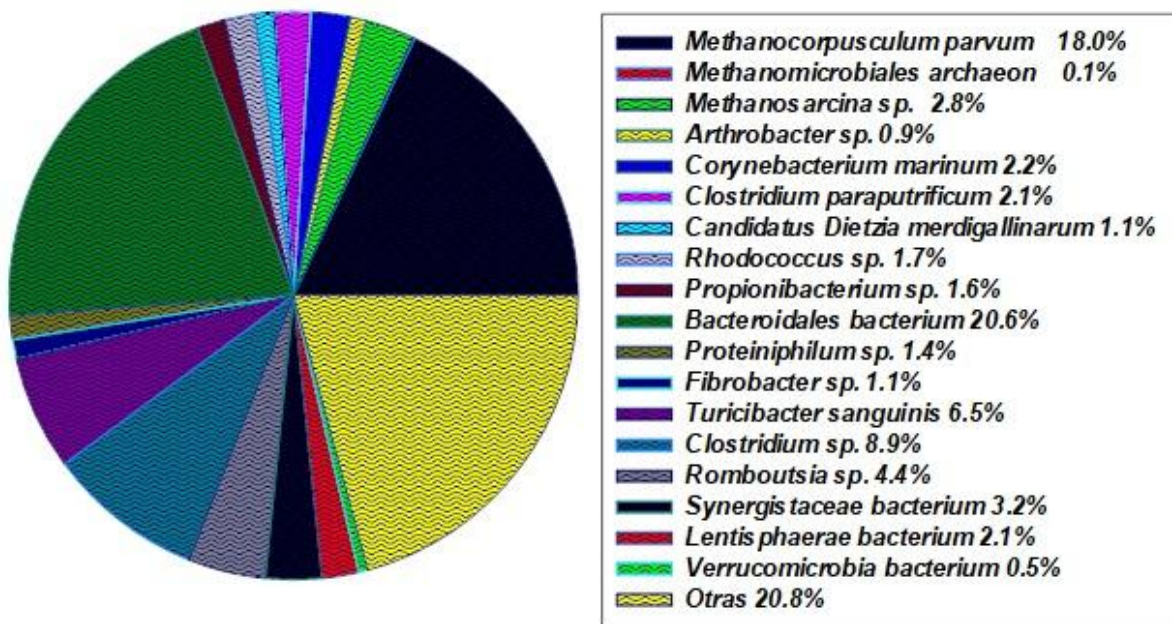


Figura 7. Abundancia relativa en el control positivo de heces porcinas.

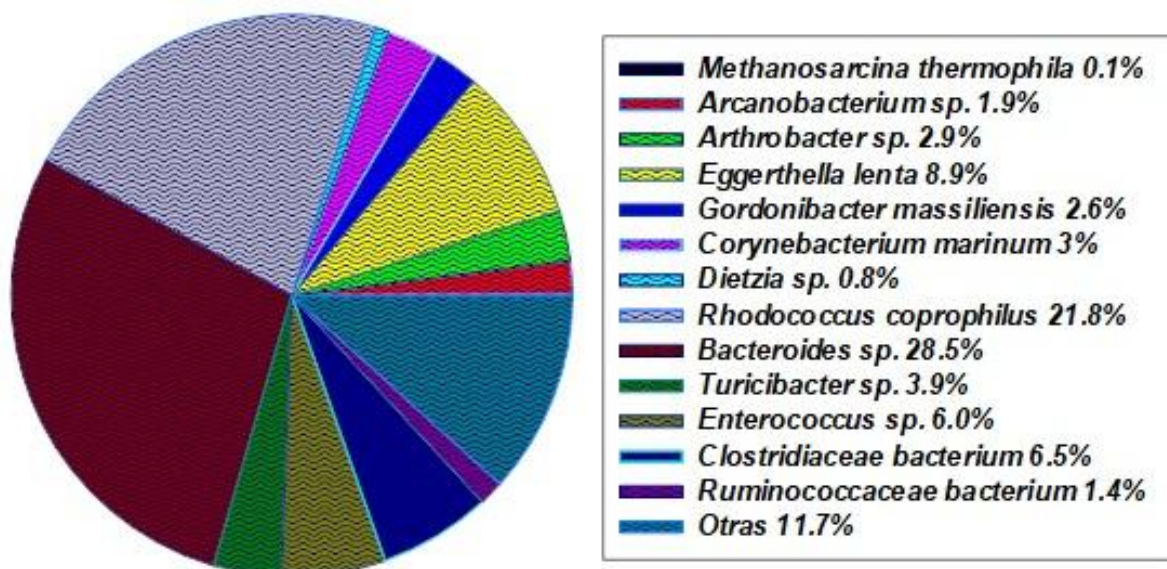
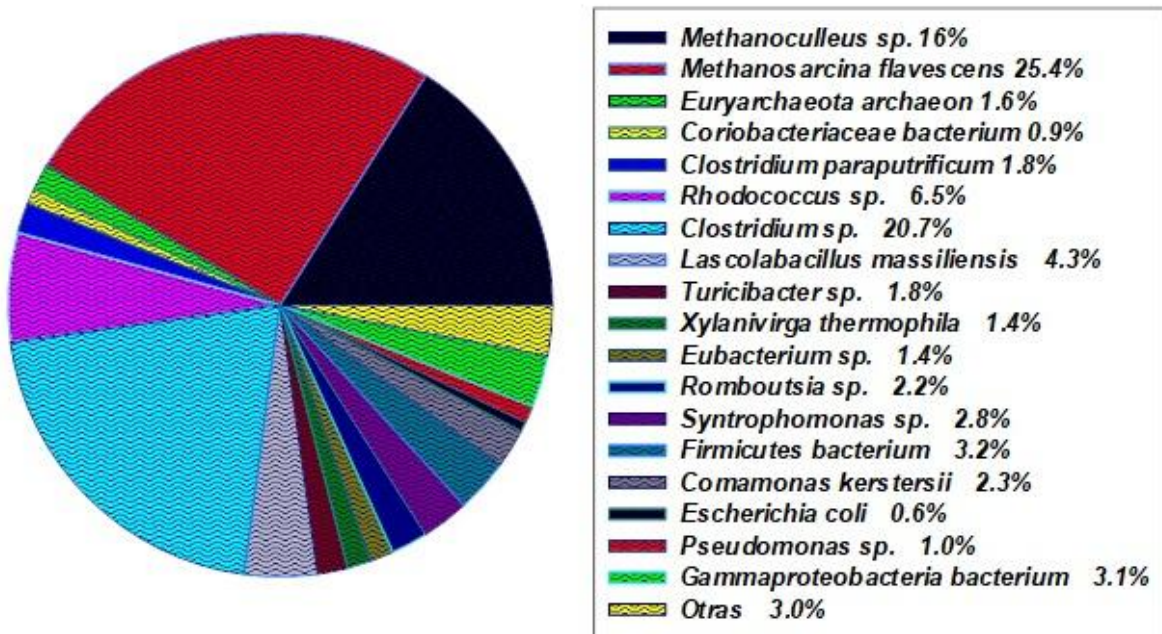


Figura 8. Abundancia relativa en la co-digestión de partes aéreas y heces porcinas



**Figura 9. Abundancia relativa en la co-digestión de Bagazo y heces porcinas**

### 7.3 Producción de Biogás

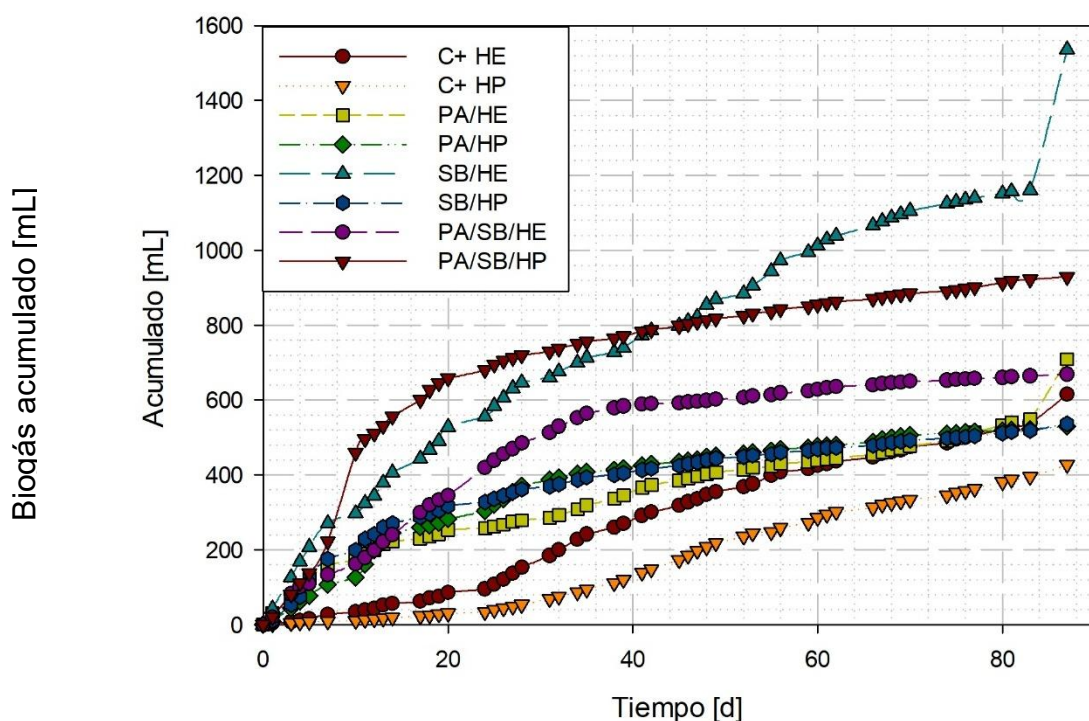
#### 7.3.1 Temperatura ambiente

El análisis de la producción de biogás a partir de las diferentes co-digestiones de residuos de higuera con heces animales a temperatura ambiente se presenta a continuación. La **Gráfica 1** muestra el acumulado de biogás producido, mientras que la **Gráfica 2** presenta el rendimiento de biogás normalizado por la cantidad de sustrato añadido, ambos evaluados con un TRH de 87 d.

En la **Gráfica 1** se observó que las co-digestiones fueron exitosas, ya que en ambos casos de los controles positivos se obtuvo una mayor producción acumulada con co-digestiones en comparación con los tratamientos sin ellas. El control positivo de heces equinas (C+HE) tuvo una producción acumulada de 614.85 mL. La co-digestión de partes aéreas, semilla de bagazo y heces equinas (PA/SB/HE) aumentó la producción en un 8.7%, alcanzando los 668.2 mL. Por su parte, las partes aéreas con heces equinas (PA/HE) lograron un incremento del 15.3%, con una producción acumulada de 708.8 mL. La mayor producción, sin embargo, se registró en la co-digestión de bagazo de semilla

con heces equinas (BS/HE), con un aumento del 150% respecto al control, alcanzando los 1536.345 *mL*. Aunque las partes aéreas de las plantas son más recalcitrantes, la presencia de heces equinas puede aportar microbiota y sustratos más fáciles de digerir, mejorando ligeramente la producción [153].

Por su parte, en esa misma gráfica, el control positivo de heces porcinas (C+HP) alcanzó una producción de biogás de 426.42 *mL*. Las co-digestiones mostraron incrementos en comparación con el control: las partes aéreas con heces porcinas (PA/HP) aumentaron más del 24%, alcanzando un total de 530 *mL*; el bagazo de semilla con heces porcinas (BS/HP) aumentó en más del 25% con un acumulado de 536.2 *mL*. Sin embargo, la co-digestión de partes aéreas, semilla de bagazo y heces porcinas (PA/SB/HP) registró un crecimiento de más del 117%, con un acumulado total de 929.03 *mL*. La diferencia en la producción de biogás entre las co-digestiones de heces equinas y porcinas puede deberse a que tanto las heces porcinas como sus digestatos contienen una cantidad significativa de material lignocelulósico y compuestos recalcitrantes. Esta composición puede limitar la rápida liberación del sustrato disponible, lo que a su vez reduce la eficiencia en la producción de biogás [134].



**Gráfica 1. Biogás acumulado a temperatura ambiente;** C+ HE= control positivo de heces equinas; C+ HP= control positivo de heces porcinas; PA/HE= co-digestión de

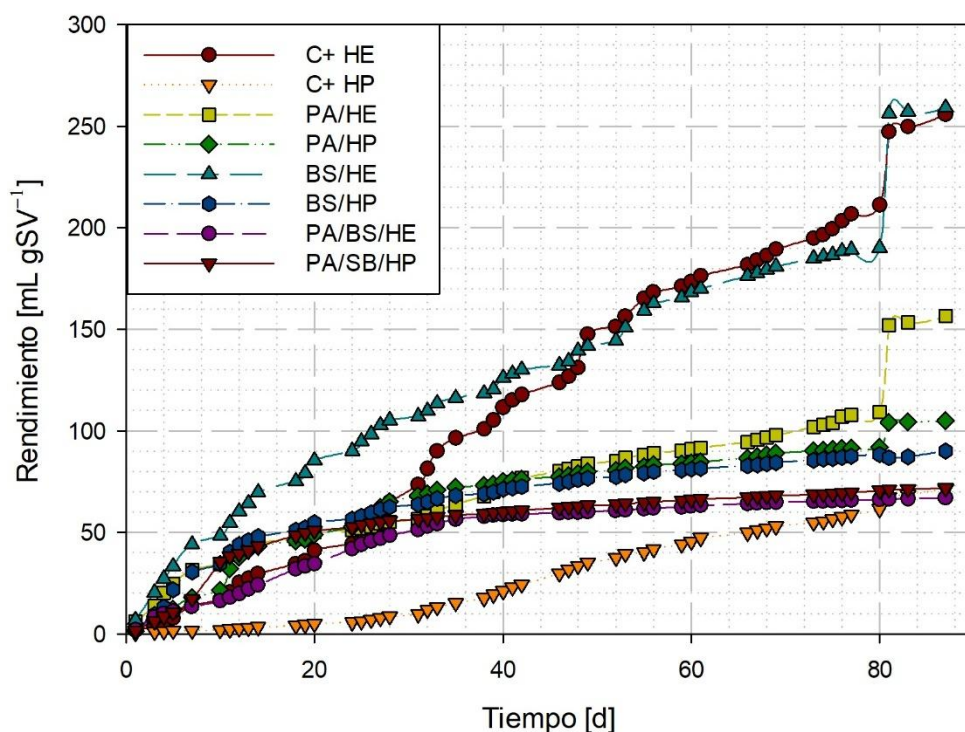
partes aéreas y heces equinas; PA/HP= co-digestión de partes aéreas y heces porcinas; SB/HE= co-digestión de bagazo de semilla con heces equinas; SB/HP=co-digestión de bagazo de semilla con heces porcinas; PA/SB/HE= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces equinas; PA/SB/HP= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces porcinas.

Con relación a los rendimientos mostrados en la **Gráfica 2**, el C+HE presentó un valor de  $255 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . La co-digestión de PA/HE mostró una disminución de 38.8%, con rendimiento de  $156 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . Por su parte, la co-digestión de PA/SB/HE registró una reducción del 73.7%, con solo  $67 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$  producidos. La única co-digestión que experimentó un incremento en el rendimiento fue la de BS/HE con un aumento de 1.6%, alcanzando los  $259.1 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . Este comportamiento podría estar relacionado con una inhibición, posiblemente causada por componentes no fácilmente biodegradables como el contenido de lignina presente en los sustratos [154, 155].

En cuanto al rendimiento del C+HP, fue de  $71.2 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , Las co-digestiones mostraron aumentos en comparación: las PA/BS/HP incrementaron en un 0.77% alcanzando  $71.75 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ ; el BS/HP aumentó en un 26.4%, con un rendimiento de  $90 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . Sin embargo, la mayor mejora se observó en las PA/HP que aumentó en un 47.54% alcanzando un rendimiento de  $105.05 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ .

En ambas gráficas se puede observar que la co-digestión de SB/HE destacó como el tratamiento más eficiente, alcanzando el mayor valor tanto en producción acumulada como en rendimiento, esto puede atribuirse a la sinergia entre heces equinas y semilla de bagazo maximizando la eficiencia microbiana [156].

Por el contrario, el C+HP se caracterizó por los valores más bajos tanto en producción acumulada como en rendimiento, lo que sugiere que sin una co-digestión, el sustrato podría tener una posible acumulación de compuestos inhibidores, tales como amoníaco o sulfuros, que afectan la actividad microbiana [157].



**Gráfica 2. Rendimiento de biogás a temperatura ambiente;** C+ HE= control positivo de heces equinas; C+ HP= control positivo de heces porcinas; PA/HE= co-digestión de partes aéreas y heces equinas; PA/HP= co-digestión de partes aéreas y heces porcinas; BS/HE= co-digestión de bagazo de semilla con heces equinas; BS/HP=co-digestión de bagazo de semilla con heces porcinas; PA/SB/HE= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces equinas; PA/SB/HP= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces porcinas.

En concordancia con los hallazgos de Alves y colaboradores [54], este estudio demuestra que la co-digestión de bagazo de higuera con heces animales a temperatura ambiente puede mejorar la producción de biogás. Observaron una adaptación más rápida de los metanógenos en la co-digestión con heces equinas en comparación con heces bovinas, lo que podría deberse a que las heces equinas podrían contener una microbiota más adecuada para la digestión anaeróbica del bagazo. Nuestros resultados apoyan esta idea, ya que la co-digestión de bagazo de semilla con heces equinas resultó en un aumento del 150% en la producción de biogás en comparación con el control positivo de heces equinas. Este aumento, sugiere que la combinación de bagazo de semilla y heces equinas crea un sustrato sinérgico que favorece la producción de biogás. Sin embargo, es importante señalar que nuestro TRH de 87 d es significativamente mayor que el TRH de 40 d utilizado por Alves y colaboradores [54], lo que dificulta la comparación directa

de los resultados. Para mayor referencia, deberían explorar diferentes TRH para visualizar la tendencia de la producción de biogás a partir de bagazo de semilla y heces equinas.

Por otro lado, Yusuf y colaboradores [158] emplearon heces equinas y bovinas que fueron secadas al sol antes de su uso. El secado al sol puede concentrar los nutrientes, pero también podría alterar la composición del microbiota y provocar la pérdida de compuestos volátiles beneficiosos [159, 160]. En contraste, el uso de heces equinas frescas en nuestro estudio podría haber favorecido un microbiota más activo y diverso, lo que potencialmente mejoró la DA. Otro aspecto clave que diferencia nuestro estudio del de Yusuf y colaboradores [158] es el control de la relación C/N; en el presente trabajo, fijamos la relación C/N en 25: 1, lo que nos permitió eliminar esta variable como un factor determinante, mientras que ellos reportaron las siguientes relaciones C/N para sus tratamientos a temperatura ambiente: 30.2: 1 (100% heces equinas), 23.8: 1 (75% heces equinas y 25% heces bovinas), 17.65: 1 (50% heces equinas y 50% heces bovinas) y 11.4: 1 (25% heces equinas y 75% heces bovinas), con estas relaciones, encontraron que la mayor producción de biogás con la relación C/N de 23.8: 1, lo que corrobora la relación óptima para metanógenos entre 20: 1 – 30: 1.

Los hallazgos de Kalia y Singh [94] investigaron la co-digestión de heces equinas y bovinas, encontrando una disminución en la producción de biogás en comparación con heces bovinas puras. Mientras que nosotros investigamos la co-digestión de heces equinas con residuos de higuera (bagazo de semilla y partes aéreas), resultando en una mayor producción de biogás. En nuestro estudio, la co-digestión de bagazo de semilla con heces equinas resultó en una producción acumulada de 1536.3 *mL*, lo que representa un aumento del 150% en comparación con el control positivo de heces equinas (614.85 *mL*). Kalia y Singh [94] observaron una tendencia a la separación sólido-líquido en los digestores con altas concentraciones de heces equinas, lo que podría haber limitado la actividad microbiana. En nuestro estudio, no se observó este fenómeno, lo que podría haber contribuido a la mayor producción de biogás. Si bien ambos estudios se realizaron a temperatura ambiente (mesofílica baja), es importante considerar la composición de los sustratos. Ellos midieron las relaciones C/N de las heces equinas

(32.1: 1) y bovinas (38.1: 1) frescas y no realizaron ajustes para optimizar este parámetro. En contraste, en el presente estudio, fijamos la relación C/N en 25: 1, lo que podría haber creado condiciones más favorables para la DA.

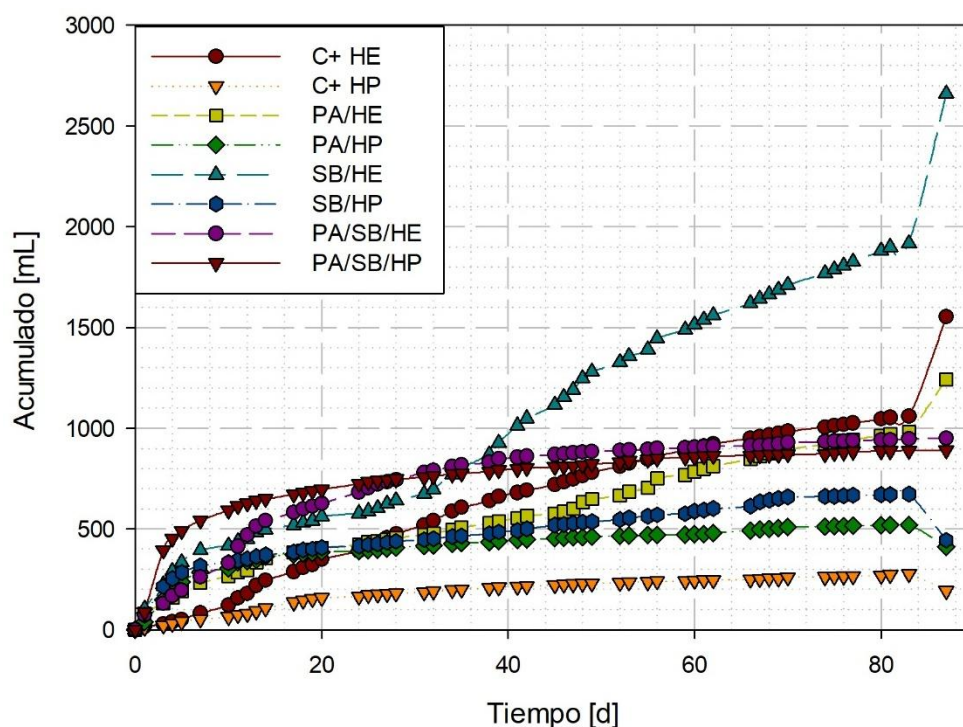
### 7.3.2 Temperatura controlada

En esta sección se analizaron los datos obtenidos tanto de producción de biogás acumulado, como el rendimiento a temperatura controlada de 37°C, bajo el mismo TRH del experimento a temperatura ambiente mencionado anteriormente.

En la **Gráfica 3**, el C+HE alcanzó una producción acumulada de 1552.4 *mL*. En comparación, la co-digestión de PA/SB/HE mostró una disminución del 38.8%, con un acumulado de 950 *mL*. Por otro lado, las PA/HE registraron una disminución de casi el 20%, alcanzando los 1242.5 *mL*. La única co-digestión que presentó un aumento fue la de SB/HE, que creció en un 71.41%, logrando una producción de biogás de 2661.1 *mL*. La producción de biogás que contienen partes aéreas, se vieron afectadas posiblemente por el alto contenido de lignina y componentes recalcitrantes en las partes aéreas, que dificultan la biodegradabilidad y limitan la disponibilidad de sustrato para los microorganismos; la presencia de inhibidores, como compuestos fenólicos o sulfuros, que afectan la actividad microbiana; un exceso de grasas sin un pretratamiento adecuado, que puede causar inhibición por acumulación de ácidos grasos de cadena larga; y la estructura física fibrosa y resistente de estas partes, que retrasa su degradación [155], [157]. Por otro lado, la presencia de trazas de aceite en el bagazo de semilla tras extracción mecánica puede contribuir a incrementar la producción de biogás debido a su alto contenido energético y a la eficiente conversión de lípidos en metano durante la digestión anaeróbica [161, 162]

En cuanto a las muestras con heces porcinas, el control positivo obtuvo una producción acumulada de 193 *mL*, lo que representó la menor producción, ya que con la co-digestión de PA/HP, aumentó 113.5%, para la SB/HP, el aumento fue de 130% y para la co-digestión de PA/SB/HP fue de 361% más que el control positivo. Esto indicó que, para

las heces porcinas, es necesario la adición de un co-sustrato para mejorar la producción de biogás.

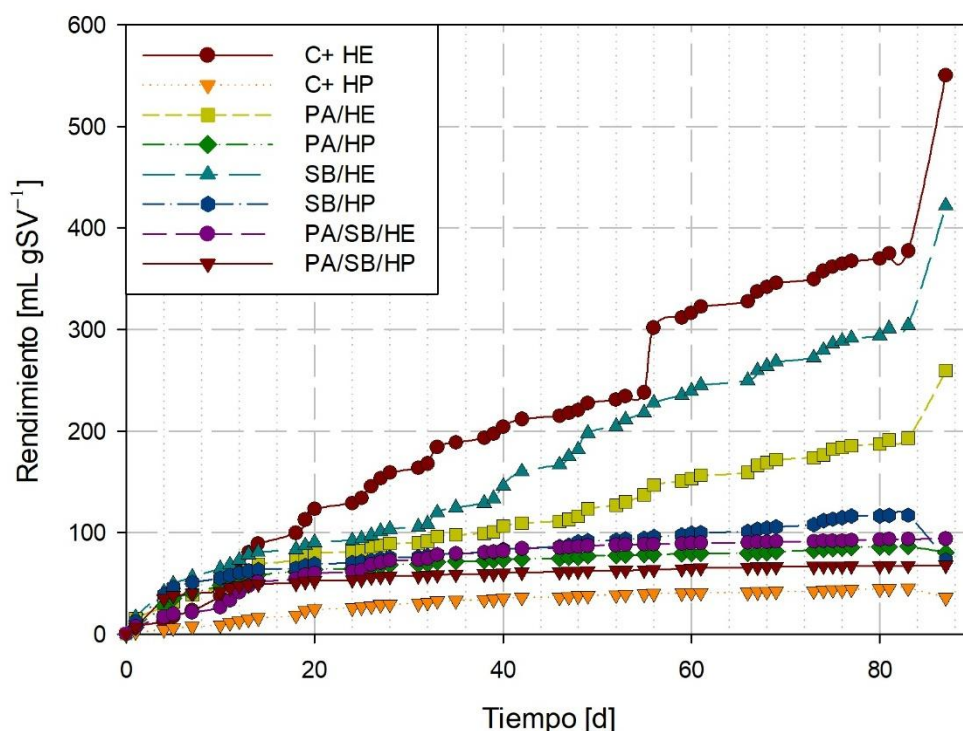


**Gráfica 3. Biogás acumulado a 37°C.** C+ HE= control positivo de heces equinas; C+ HP= control positivo de heces porcinas; PA/HE= co-digestión de partes aéreas y heces equinas; PA/HP= co-digestión de partes aéreas y heces porcinas; SB/HE= co-digestión de bagazo de semilla con heces equinas; SB/HP=co-digestión de bagazo de semilla con heces porcinas; PA/SB/HE= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces equinas; PA/SB/HP= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces porcinas.

El análisis de los rendimientos de biogás mostrados en la **Gráfica 4** reveló un patrón contrastante entre las heces equinas y porcinas. El control positivo con heces equinas (C+HE) exhibió el rendimiento más alto, alcanzando  $549.9 \text{ mL } gSV^{-1}$ . Sin embargo, la co-digestión con heces equinas resultó en una disminución notable en los rendimientos. La co-digestión de PA/SB/HE produjo solo  $93.69 \text{ mL } \cdot gSV^{-1}$ , lo que representa una reducción del 82.9%. La codigestión de PA/HE alcanzó  $259.34 \text{ mL } \cdot gSV^{-1}$ , un 52.8% menos que el control. La SB/HE llegó a  $422.1 \text{ mL } \cdot gSV^{-1}$ , disminuyendo un 23.3%. como se mencionó anteriormente, estas disminuciones podrían atribuirse a la inhibición por compuestos liberados durante la digestión de las partes aéreas y la semilla de bagazo de higuera, como ácidos grasos de cadena larga o fenoles, y a la dificultad en la

degradación de la lignina presente en estos materiales, limitando la disponibilidad de sustratos más fácilmente convertibles en biogás [155, 161].

En contraste, el C+HP exhibió el rendimiento más bajo del experimento, con solo  $35.78 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . Sin embargo, las diferentes co-digestión con heces porcinas consistentemente aumentaron los rendimientos en comparación con este control: la co-digestión PA/SB/HP logró  $67.7 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , un aumento del 89.4%; la SB/HP alcanzó  $73.1 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , un aumento del 104.25%; y la codigestión PA/HP produjo  $80 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , lo que representa el aumento de 123.6%. Este incremento sugirió que las heces porcinas, inherentemente menos eficientes, se benefician de la adición de residuos de higuera, posiblemente debido a la provisión de nutrientes esenciales o a la mitigación de compuestos inhibidores presentes en ellas [163].



**Gráfica 4. Rendimiento de biogás a 37°C.** C+ HE= control positivo de heces equinas; C+ HP= control positivo de heces porcinas; PA/HE= co-digestión de partes aéreas y heces equinas; PA/HP= co-digestión de partes aéreas y heces porcinas; SB/HE= co-digestión de bagazo de semilla con heces equinas; SB/HP=co-digestión de bagazo de semilla con heces porcinas; PA/SB/HE= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces equinas; PA/SB/HP= co-digestión de partes aéreas, bagazo de semilla y heces porcinas.

Lianhua y colaboradores [164], realizaron co-digestión con pasto y heces porcinas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , observaron un mayor rendimiento de  $553.24 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$  con una relación C/N de 36.8: 1. Por otro lado, el rendimiento solo se redujo en un 3.6% al utilizar una relación C/N de 23.1: 1, cabe destacar que estos autores reportaron un mayor porcentaje de metano con esta última relación C/N. Esto sugiere que, en su estudio, la relación C/N tuvo un impacto mayor en la composición del biogás que en el rendimiento total. Quienes también realizaron co-digestión con heces equinas fueron Ye y colaboradores [165], ellos investigaron la co-digestión de este sustrato con paja de arroz y residuos de cocina a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Encontraron una mayor producción con los residuos de cocina, alcanzando  $674.4 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$  con una relación C/N de 21.2: 1, superando incluso su control positivo, que obtuvo  $604.2 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . La co-digestión con paja de arroz resultó en la menor producción, con  $191.05 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . Aunque estos autores obtuvieron mayor rendimiento que nuestro estudio con la co-digestión de PA/HP presentando una reducción del 58.1%, en comparación con el control de Ye et al. [143], nuestro estudio sí logró aumentar el rendimiento en comparación con el C+HP, lo que podría destacar el potencial de la adición de partes aéreas de higuera para mejorar la DA de heces porcinas.

Por otro lado, Bateni y colaboradores [166] utilizaron semilla de bagazo de *Eureka sativa* que pertenece a la familia Brassicaceae para la producción de biogás a  $37^\circ\text{C}$  y un TRH de 60 d, logrando un rendimiento de  $212.4 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ . En contraste a estos autores, a la misma temperatura, nuestras co-digestiones con bagazo de semilla de higuera mostraron un aumento del 98.7% con heces equinas, pero una disminución del 65.6% con heces porcinas. Esta divergencia subraya la influencia del tipo de biomasa y del proceso de co-digestión en la producción de biogás.

En cuestión de las heces equinas, Nitsche y colaboradores [167], las mezclaron con paja de cebada y virutas de madera blanda, además de su control positivo con solo heces equinas, dejando también el proceso a  $37^\circ\text{C}$ , sus resultados reportaron que encontraron un mayor rendimiento de biogás cuando la mezclaron con paja de  $233 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , seguido del control con  $222.3 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , y por último la mezcla con virutas de  $97.1 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ , se pudo observar en su reporte, que no aumentó significativamente su rendimiento con las mezclas, pero podría deberse a que no ajustaron una relación C/N

adecuada para el proceso de DA, ya que para la mezcla de la paja con heces equinas, tuvieron una relación C/N de 41.5:1, sin embargo para la mezcla con virutas, fue de 67.4:1. Lo que en contraste con nuestra investigación, resalta la importancia de la utilización de este parámetro para potenciar la producción de biogás.

Adicionalmente, los datos obtenidos sobre las arqueas metanogénicas en las heces equinas y porcinas (anteriormente mencionados) indican que en las heces equinas predominan arqueas del género *Methanosarcina*, las cuales son conocidas por su alta eficiencia en la producción de metano en condiciones anaerobias. Estas arqueas se desarrollan mejor en ambientes con un pH cercano a 7, temperaturas mesofílicas (alrededor de 35°C), y en presencia de sustratos con una buena disponibilidad de acetato y  $H_2$ , condiciones que fueron favorecidas en el sistema experimental. estas comunidades microbianas potencialmente explican la mayor producción de biogás en los tratamientos que involucran heces equinas, especialmente en la co-digestión con SB/HE [147, 168, 169].

Por otro lado, en las heces porcinas se detectaron predominancia de arqueas del género *Methanobacterium*. Aunque también son metanogénicas, *Methanobacterium* puede presentar menor eficiencia con relación a la conversión de sustratos en comparación con *Methanosarcina*. Además, puede experimentar inhibición ante concentraciones elevadas de compuestos recalcitrantes, como el amoníaco y los sulfuros, que pudieron estar presentes en las heces porcinas. Estas condiciones pueden haberse presentado durante el proceso, limitando la actividad microbiana y, por ende, reduciendo la producción de biogás en estos tratamientos [168, 170].

### 7.3.3. Diferencias en la producción de biogás

La **Tabla 11** muestra el efecto de diferentes tratamientos (C+HE, C+HP, PA/HE, PA/HP, SB/HE, SB/HP, PA/SB/HE y PA/SB/HP) evaluados mediante mediciones de producción de biogás desde el día 0 hasta el día 87. A temperatura ambiente, los resultados demostraron que las co-digestiones con heces porcinas no tuvieron diferencia

significativa en comparación con C+HE, sin embargo, PA/SB/HP fue significativamente diferente a PA/HP y SB/HP, aunque no difirió del control C+HP, sin embargo, PA/SB/HP mostró la mayor producción de biogás logrando un aumento del 20% en comparación con el control C+HP con un promedio de 16 mL, seguido del C+HE con 10.2 mL y en tercer lugar, PA/SB/HE con 11.5 mL, estos tres tratamientos no tienen diferencia significativa entre ellos. En resumen, el análisis indica que las mezclas que incluyen heces porcinas alcanzaron la mayor producción de biogás a temperatura ambiente. Mientras que, a temperatura controlada, C+HP no tuvo diferencias significativas con PA/HP y SB/HP, pero sí con PA/SB/HP, ya que este último obtuvo 300% más producción de biogás en comparación con el control. Para los tratamientos con heces equinas, PA/HE y PA/SB/HE no mostraron diferencia significativa, pero sí con el tratamiento SB/HE, aunque este último no tuvo diferencia significativa con C+HE, sí mostró la mayor producción de biogás aumentando 22.5% en comparación con el control. Este análisis, mostró que las heces equinas presentaron una mayor producción de biogás a temperatura controlada.

**Tabla 11. Producción de biogás acumulado en 87 días con diferentes tratamientos a temperatura ambiente y controlada.**

Tratamiento	Promedio de biogás a temperatura ambiente	Promedio de biogás a temperatura controlada
<b>PA/HE</b>	$8.0 \pm 0.78^B$	$9.6 \pm 2.12^{BCD}$
<b>SB/HE</b>	$8.5 \pm 1.08^B$	$44.0 \pm 2.95^A$
<b>PA/SB/HE</b>	$11.5 \pm 1.37^{AB}$	$16.4 \pm 1.78^B$
<b>PA/HP</b>	$9.0 \pm 1.08^B$	$7.3 \pm 1.30^{CD}$
<b>SB/HP</b>	$8.8 \pm 0.82^B$	$8.4 \pm 1.47^{BCD}$
<b>PA/SB/HP</b>	$16.0 \pm 2.43^A$	$15.3 \pm 3.17^{BC}$
<b>C+HE</b>	$10.2 \pm 0.79^B$	$35.9 \pm 2.12^A$
<b>C+HP</b>	$13.3 \pm 1.15^{AB}$	$3.8 \pm 0.35^D$

Los resultados son la media de 174 mediciones  $\pm$  error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas.

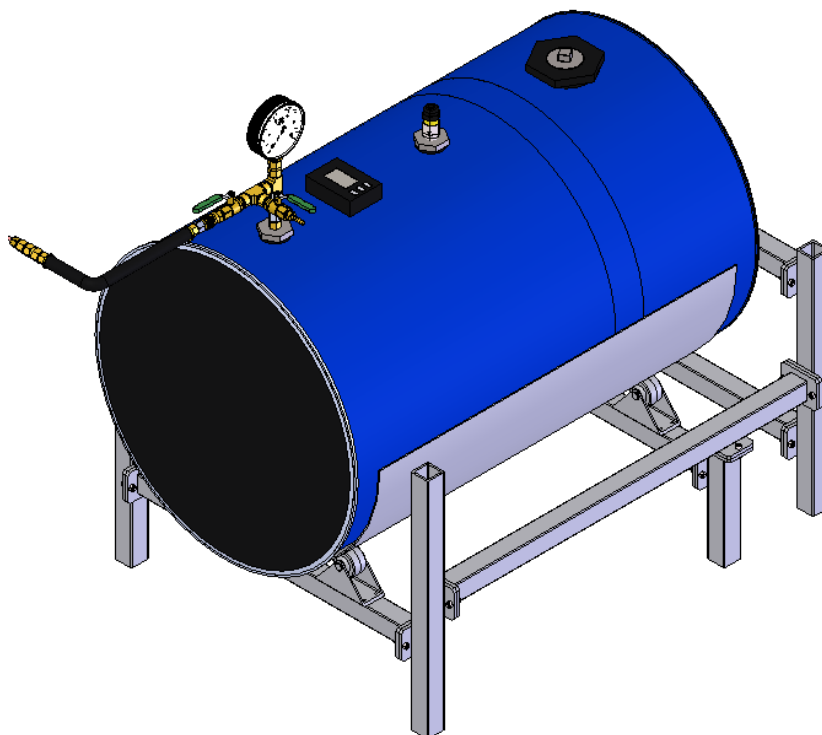
C+HE= control positivo de heces equinas; C+HP= control positivo de heces porcinas; PA/HE= partes aéreas y heces equinas; PA/HP= partes aéreas y heces porcinas; SB/HE= semilla de bagazo y heces equinas; SB/HP= semilla de bagazo y heces porcinas; PA/SB/HE= partes aéreas, bagazo de semilla y heces equinas; PA/SB/HP= partes aéreas, bagazo de semilla y heces porcinas.

## **7.4 Diseño 3D, Fabricación y Construcción del Biodigestor con Filtros**

### **7.4.1 Diseño Tridimensional de Biodigestor**

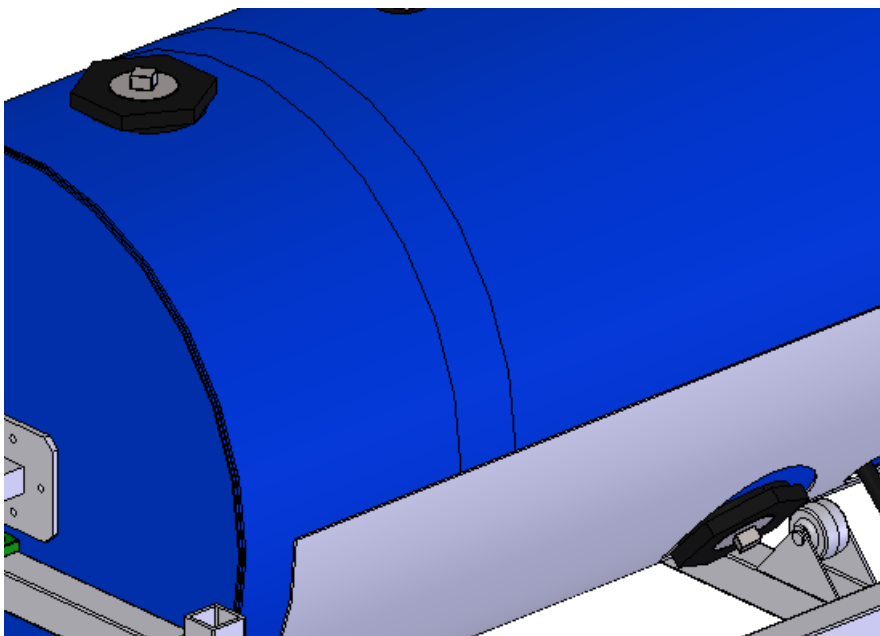
La principal finalidad del diseño 3D fue realizar una revisión exhaustiva de cada componente del biodigestor, con el objetivo de cuantificar con precisión los materiales necesarios para su construcción. El modelo permitió determinar las cantidades exactas de cada elemento, desde los componentes principales, hasta los elementos más pequeños. El diseño 3D proporcionó una visualización detallada de la estructura del biodigestor, lo que facilitó la identificación de todos los componentes necesarios, la determinación de las dimensiones exactas de cada componente, el cálculo preciso de la cantidad de material requerido para cada componente, la optimización del uso de los materiales para minimizar el desperdicio y reducir los costos de construcción, la predicción de posibles errores en el diseño y su corrección antes de la construcción física.

El componente central del sistema es el biodigestor de 200 L, cuyo diseño fue creado para fomentar la DA en un entorno controlado y de fácil manejo. La **Figura 10** muestra una vista isométrica general del biodigestor montado horizontalmente sobre una estructura de soporte que garantiza la estabilidad y la durabilidad del equipo, facilitando su instalación y acceso para tareas de mantenimiento y monitoreo.



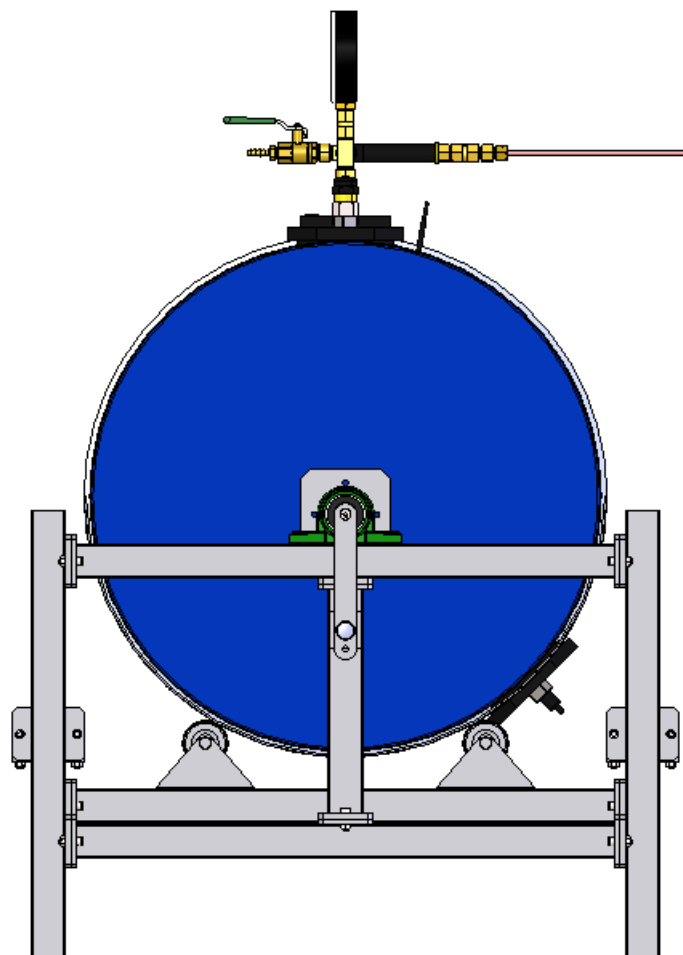
**Figura 10. Vista isométrica de biodigestor**

El biodigestor cuenta con un conducto de entrada en la parte superior para la alimentación, y una salida lateral que facilita la descarga controlada del sustrato digerido como se muestra en la **Figura 11** Estos ductos, cuentan con un sellado hermético para asegurar condiciones estrictamente anaeróbicas al impedir la entrada de oxígeno.



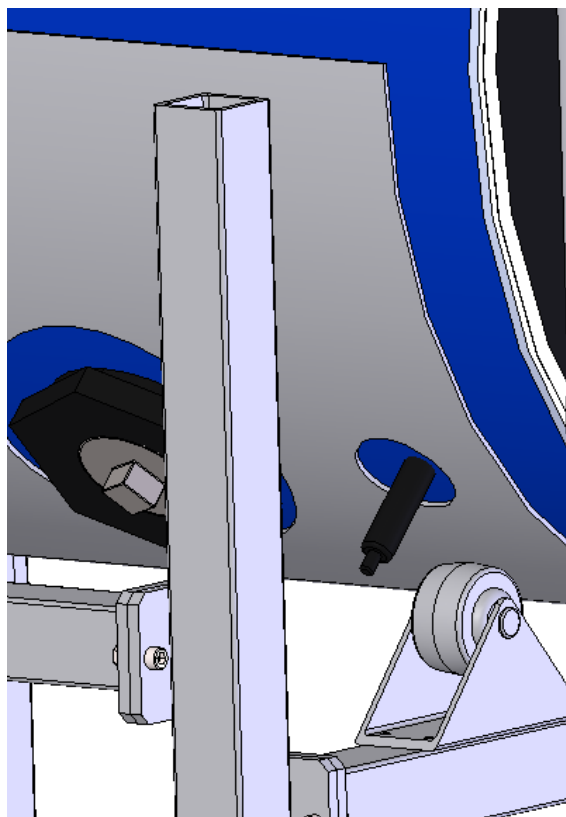
**Figura 11. Entrada y salida de sustrato**

Para garantizar una distribución homogénea del sustrato y promover la actividad metanogénica, el diseño incorporó un sistema de agitación manual, con una chumacera ubicada en la parte posterior unida a una guía hacia el biodigestor, mientras que en la parte frontal, dos llantas proporcionan apoyo y facilitan el movimiento rotatorio del biodigestor en su totalidad, facilitando la agitación del contenido interno mediante su deslizamiento, estos complementos pueden observarse en la **Figura 12**.

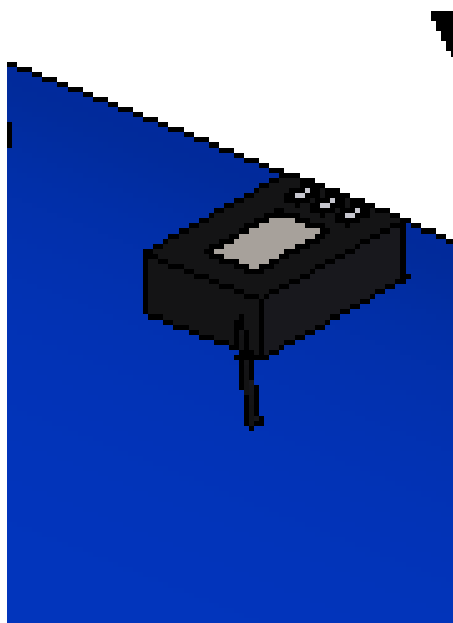


**Figura 12. Vista lateral derecho del biodigestor**

El sistema de control incorpora un sensor de pH, como se muestra en la **Figura 13**. Este sensor ha sido colocado estratégicamente en una ubicación que no dificulta las labores de agitación manual ni afecta la estructura del biodigestor. Además, se ha instalado en una posición que garantiza contacto constante con el sustrato dentro del biodigestor, permitiendo mediciones precisas y representativas en todo momento. Asimismo, el sistema incorpora un sensor de temperatura para el monitoreo continuo de las condiciones internas. Este sensor se encuentra ubicado en la parte superior del biodigestor, en contacto directo con el biogás producido, lo que permite obtener mediciones precisas de la temperatura en tiempo real. Los datos de temperatura y pH se visualizan en una pantalla digital instalada en la parte superior del biodigestor, como se muestra en la **Figura 14**.

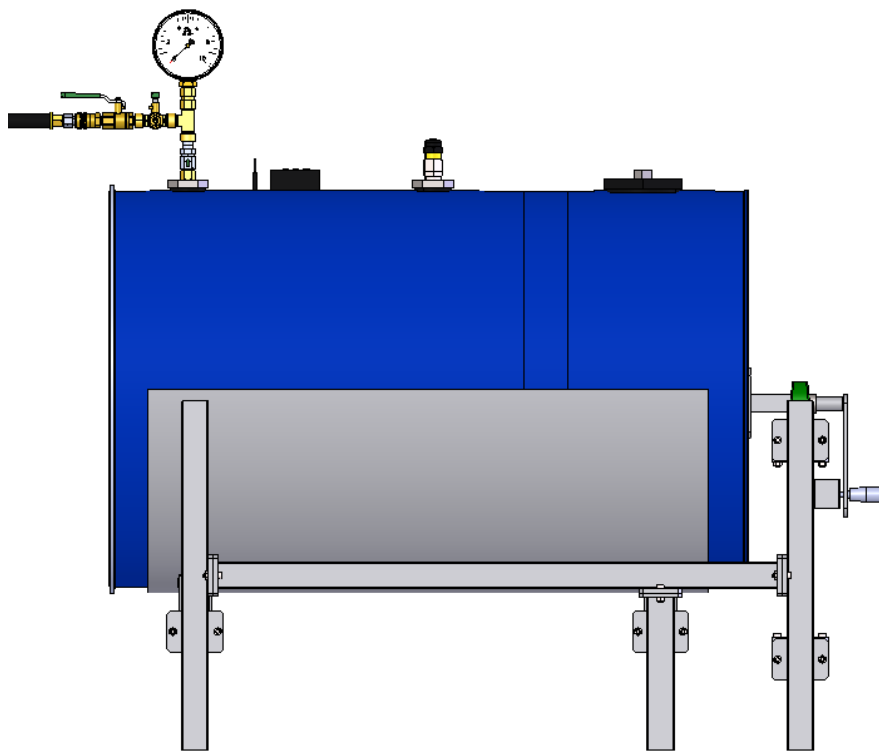


**Figura 13. Sensor de pH instalado en el biodigestor**



**Figura 14. Sensor de temperatura y sistema de visualización instalados en la parte superior del biodigestor**

Para garantizar la seguridad, se implementaron medidas de protección. Una válvula de alivio estabilizada a 3 *PSI* (la presión máxima soportada por el biodigestor es de 5 *PSI*) libera el exceso de presión, previniendo posibles accidentes relacionados con la inflamabilidad del biogás. La integridad del sistema fue verificada mediante pruebas de inyección de aire a 4 *PSI* durante 5 *min*, descartando fugas. Adicionalmente, una válvula antirretorno asegura un flujo unidireccional del biogás, evitando el retroceso de la llama en caso de combustión. El espacio de cabeza del biodigestor incluye un manómetro para el monitoreo de la presión y válvulas globo para controlar la programación de los desfuegos del biogás. Estas válvulas están ubicadas a la salida del biogás, una permite la toma de muestra para análisis y la otra tiene su salida hacia una conexión rápida del sistema de filtrado mediante un conector, simplificando la desconexión sin necesidad de herramientas, estos accesorios pueden visualizarse en la **Figura 15**.

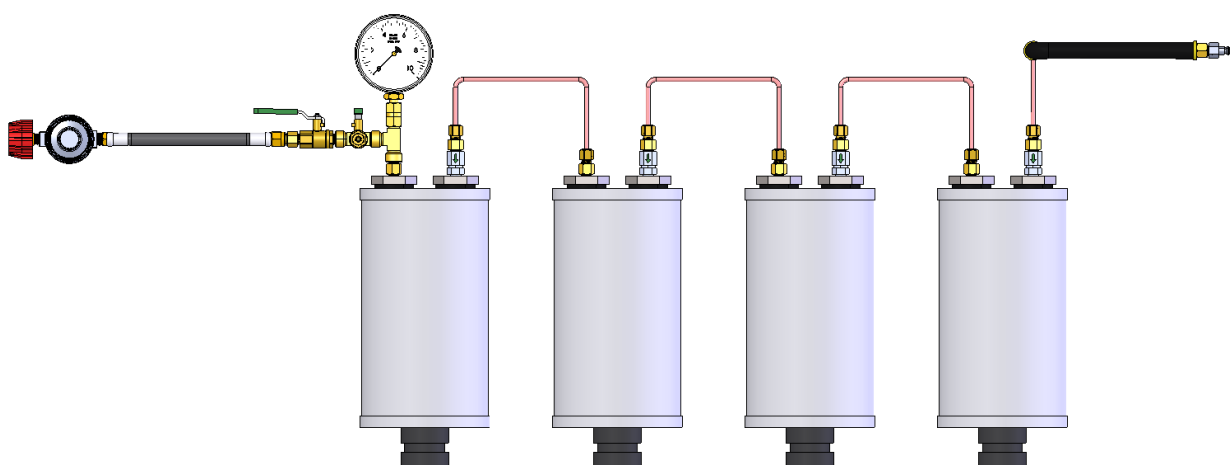


**Figura 15. Vista frontal del biodigestor**

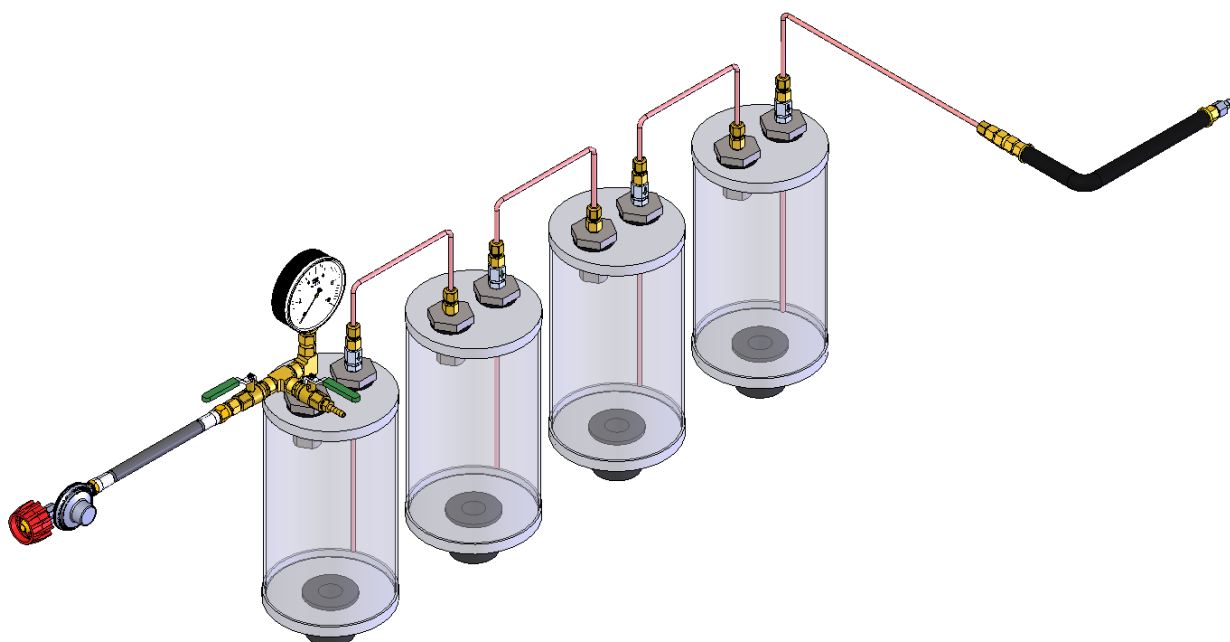
#### 7.4.2 Diseño tridimensional de filtros para el biodigestor

En la **Figura 16** se presenta un sistema de filtros cilíndricos, interconectados por una tubería de cobre flexible, que establece un flujo direccional de izquierda a derecha para el gas proveniente del biodigestor. Este flujo converge hacia una salida destinada al almacenamiento o a su utilización como fuente de calor. Cada cilindro, fue un elemento fundamental del sistema, estos incorporan una entrada y una salida de gas estratégicamente ubicadas en la parte superior, donde se encuentra una válvula unidireccional que garantiza el ingreso del biogás, previniendo el reflujo entre los contenedores. Adicionalmente, cada contenedor dispone en su base de un puerto de acceso sellado, diseñado para facilitar la extracción de materiales y el mantenimiento de los elementos purificadores del biogás. Además, la **Figura 17**, revela el diseño interno de los filtros, donde el conducto de cobre en cada entrada permite un contacto directo entre el biogás y el material filtrante. Esta configuración promueve un flujo ascendente, maximizando el área de contacto y, por ende, la eficiencia del proceso de purificación. El último filtro de la serie integra un manómetro para el monitoreo de la presión, permitiendo una regulación segura del flujo mediante válvulas globo. A la salida de este último contenedor, se distinguen dos tipos de conexión: una para el suministro directo de biogás, y otra con una conexión de espiga intercambiable para el muestreo mediante jeringas. Es importante destacar que la conexión de los filtros al biodigestor se realiza mediante un sistema de acoplamiento rápido, favoreciendo la movilidad del biodigestor para cuando se realice agitación o traslado de este, además, de la misma manera que para el biodigestor, se les realizaron pruebas de presión, alcanzando cada filtro una presión de 5 psi. Finalmente, tal como se ilustra en la **Figura 18**, el conjunto de filtros se encuentra dispuesto sobre una base de madera que proporciona estabilidad, evitando el contacto directo con el suelo y ofreciendo soporte estructural al sistema.

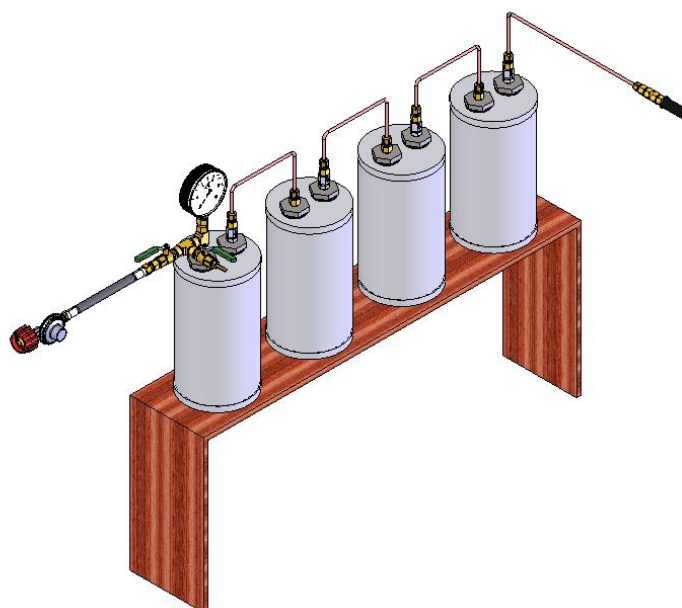
La **Figura 19** se aprecia el sistema completo, con el biodigestor y los filtros en su diseño final, señalando el inicio de la etapa de construcción.



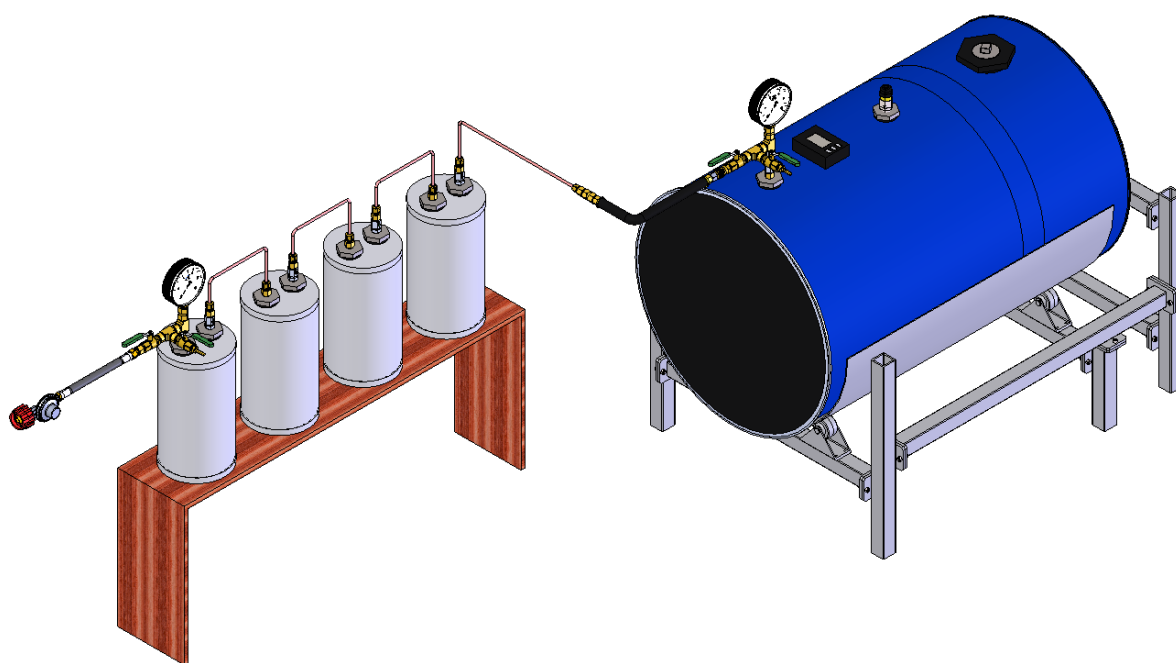
**Figura 16. Vista frontal de los filtros**



**Figura 17. Vista de la estructura interna de los filtros.**



**Figura 18. Filtros en base fija**



**Figura 19. Sistema de Biodigestión con Filtros Integrados**

Existen gran variedad de diseños de biodigestores utilizados para la producción de biogás, cada uno adaptado a diferentes condiciones y necesidades específicas. Uno de los diseños destacados es el implementado por Souza y da Silva [171], quienes diseñaron un biodigestor cilíndrico de 1.7 L, modelado en 3D con SolidWorks 2019. Este diseño se caracterizó por su nivel de automatización, ya que desarrollaron un software para monitorear y manipular las condiciones internas del biodigestor. El cilindro principal fue diseñado con vidrio, que permite la observación directa del proceso, y las tapas superior e inferior con poliuretano, para facilitar el aislamiento térmico y la durabilidad. Además, incorporaron un sistema de enchaquetado con flujo de agua caliente o fría, controlado mediante bombas, y un sensor de pH integrado, permitiendo así un control más preciso de las condiciones del proceso de digestión anaeróbica. La agitación fue implementada mediante un eje vertical de acero inoxidable con una hélice de cuchillas rectas, accionado por un motor eléctrico, optimizando la mezcla de la materia orgánica. Sin embargo, en nuestro diseño, no se incluyó la automatización debido a los costos adicionales asociados, como el consumo de electricidad para operar los componentes, priorizando la sencillez y sostenibilidad del sistema.

Por otro lado, Ali y colaborador [172], propusieron un biodigestor cilíndrico conectado a un tanque de mezcla ubicado en la entrada del sistema, mediante un ducto de 10 cm de diámetro. Este tanque de mezcla cumplía la función de homogeneizar el sustrato antes de ingresar al proceso de digestión, asegurando una alimentación más uniforme y eficiente. Dentro de la cámara de digestión, le incorporaron un termómetro interno, un medidor de flujo de gas y un agitador de hierro, además de una escala de vidrio para observar el nivel de digestato durante la alimentación. La innovación significativa fue la incorporación de un sistema de calentamiento solar, compuesto por un colector plano, una bomba, tuberías y un intercambiador en espiral posicionado dentro del biodigestor, lo que permitió aprovechar la energía solar para mantener las condiciones térmicas óptimas de la digestión. La salida del biogás fue almacenada en un globo flexible conectado mediante una válvula de una sola vía, facilitando el almacenamiento y uso de este. Al igual que Souza y da Silva [171], este diseño requería energía eléctrica para alimentar la bomba de circulación de agua, lo que implica consideraciones en cuanto a la autosuficiencia energética del sistema.

Por su parte, Daniyan y colaboradores [173], en su diseño desarrollado en SolidWorks (sin especificar la versión), crearon un biodigestor cilíndrico de 50 litros junto con una unidad de almacenamiento. Este sistema incluyó un mecanismo de agitación compuesto por un motor eléctrico, un eje sólido y rodamientos, orientado a garantizar una mezcla uniforme del sustrato, fundamental para maximizar la producción de biogás. Además, incorporaron válvulas, accesorios, sensores de presión, medidores de pH y temperatura, así como un microcontrolador Arduino para la manipulación y monitoreo de las condiciones internas. La presencia de estos componentes permite un control más preciso del proceso, aunque aumenta la complejidad y el costo del sistema.

Todos estos autores coinciden en que la forma cilíndrica del biodigestor es la opción más recomendada, debido a su mayor resistencia estructural y a la facilidad que ofrece para la mezcla de la materia orgánica [174]. Nuestro proyecto también optó por esta forma, integrando dichas ventajas. Además, se ha observado que la mayoría de los diseños existentes incorporan automatización o procesos automáticos; sin embargo, nuestro diseño no contempla esta sistematización para evitar costos adicionales de operación y electricidad, priorizando la simplicidad y sostenibilidad. Cabe destacar que, si bien estos autores se enfocan principalmente en el diseño para la digestión y el almacenamiento del biogás, dejan de lado aspectos importantes como el sistema de filtrado para la purificación del biogás y las tomas de muestra para su análisis. En nuestro proyecto, se incorporaron estos componentes adicionales para facilitar el muestreo y verificar la eficiencia de los filtros, asegurando que cumplan con su función. Además, se consideraron medidas de seguridad, como la inclusión de una válvula de alivio y válvulas unidireccionales, para garantizar un funcionamiento seguro y evitar riesgos. Nuestro diseño también se pensó con un acceso sencillo a todos sus componentes, tanto en la estructura del biodigestor como en los sistemas de filtrado, para facilitar tareas de mantenimiento e inspección. Otro aspecto importante fue la portabilidad: se diseñó de manera que el equipo pudiera ser manipulado por partes, con conexiones rápidas y una estructura desmontable, permitiendo su transporte y manejo en diferentes lugares sin dificultad.

#### 7.4.3 Construcción del sistema de biodigestión y filtros

La **Figura 20** presenta el sistema de biodigestión construido, compuesto por el biodigestor y sus filtros asociados, instalado en el Invernadero para la Investigación sobre Alternativas Sustentables para el Manejo de Insectos y Plantas de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro ( $20^{\circ}35'24''$  latitud norte,  $100^{\circ}24'42''$  longitud oeste). Esta ubicación estratégica dentro del invernadero proporciona un ambiente térmico mesofílico, minimizando la necesidad de energía para mantener la temperatura óptima de operación. El biodigestor opera actualmente con un 7% de ST con 25:1 de relación C/N. Produciendo entre 8 y 12 L de biogás diariamente, lo que equivale un rendimiento de  $60 \text{ L} \cdot \text{kgSV}^{-1}$ . No obstante, para obtener resultados más representativos de su potencial, es necesario permitir que el biodigestor funcione durante el TRH establecido previamente en condiciones de laboratorio, fijado en 87 d. Los cálculos preliminares sugieren que, con un Tiempo de Retiro de Sólidos (TRS) de 45 d, se extraerán aproximadamente 40 L de mezcla orgánica del biodigestor, desplazando una cantidad equivalente de digestato hacia el sistema de salida. Para garantizar la homogeneidad de la mezcla y la distribución uniforme de bacterias y calor se ha implementado una rutina de agitación diaria.



**Figura 20. Implementación del biodigestor y sus filtros**

Un biodigestor móvil de 25 L implementado por Herwintono y colaboradores [175], lo situaron a nivel del suelo, ellos no contemplaron un sistema de enchaquetado para la regulación térmica, lo compensaron con un recubrimiento de asfalto y aluminio destinado a la contención térmica. Si bien el biodigestor incorporó un agitador manual con aspas, su implementación requiere la apertura del sistema, comprometiendo potencialmente las condiciones anaeróbicas necesarias para la digestión. Adicionalmente, el termómetro infrarrojo, debido al recubrimiento, podría ofrecer mediciones de temperatura poco precisas. Aunque se incluye un manómetro para monitorear la presión del biogás, la medición se realiza fuera del biodigestor. La purificación del biogás se abordó mediante un filtro cilíndrico horizontal con  $NaOH$  y  $Ca(OH)_2$  en polvo. En contraste con el diseño presentado, nuestro enfoque incorpora un diseño en 3D para la fabricación, permitiendo una optimización más precisa de los componentes. Si bien ambos proyectos utilizan válvulas globo para el control del flujo de biogás, nuestro diseño enfatiza la seguridad y la facilidad de mantenimiento, integrando un medidor de pH, válvulas unidireccionales y permitiendo el acceso para mantenimiento sin necesidad de desensamblar el sistema, a diferencia del diseño de Herwintono y colaboradores [175], que carece de estas consideraciones.

Por otro lado, el diseño de de Souza y da Silva [171], mencionado anteriormente, este diseño se caracterizó por el uso de vidrio para el cilindro principal y poliuretano para las tapas superior e inferior, cabe destacar que el uso de vidrio como material principal podría generar inhibición en la producción de biogás debido a la fotosensibilidad de ciertos metanógenos [176]. Además, los autores mencionan el uso de un sello doble para garantizar la hermeticidad en la agitación accionada por un motor eléctrico; sin embargo, la fricción inherente al movimiento del agitador podría comprometer la integridad del sello a largo plazo. El biogás producido se almacenó en bolsas Tedlar de 5 L, no integraron sistema de purificación. En contraste, nuestro biodigestor no requiere de gasto energético adicional ni expone los metanógenos a la luz directa, representando una alternativa de menor costo operativo y menor impacto ambiental.

En contraste, Nkoi y colaboradores [177], desarrollaron un biodigestor cilíndrico vertical de 14 L, construido en acero AISI 304SS. En este estudio, los autores prescindieron de un diseño previo a la construcción, basándose en ecuaciones para determinar

parámetros clave como la presión y la carga del biodigestor. El sistema implementó agitación manual, aunque sin detallar ni el método de sellado ni las características del agitador interno. El diseño incorpora un puerto de entrada superior y una salida lateral inferior, un manómetro para el monitoreo de la presión, pero carece de termómetro y sensor de pH. Las salidas de biogás son controladas mediante válvulas globo, sin embargo, no se mencionan medidas de seguridad adicionales. El biogás generado se dirige hacia cámaras de almacenamiento construidas en el mismo material, acero. En contraposición, nuestro diseño integra las cámaras de recolección como parte de un sistema de purificación del biogás, utilizando materiales selectos para este fin. Además, se incorporan dos puntos de muestreo para el biogás: uno a la salida del biodigestor y otro a la salida de los filtros, permitiendo evaluar la eficiencia del proceso de purificación. A diferencia del diseño de Nkoi y colaboradores [177], nuestro sistema implementó válvulas unidireccionales y de alivio para garantizar una mayor seguridad en la operación.

La revisión de la literatura revela una diversidad de enfoques en el diseño de biodigestores para la producción de biogás. Si bien cada diseño presenta fortalezas particulares, nuestro enfoque se distingue por la integración de un diseño tridimensional previo a la construcción, la priorización de la seguridad operativa, la facilidad de mantenimiento y el monitoreo del proceso. A diferencia de otros sistemas, nuestro diseño minimiza el consumo energético y la exposición de los metanógenos a la luz, contribuyendo a una mayor eficiencia y sostenibilidad del proceso de digestión anaeróbica.

## 8 Conclusiones

La utilización de *R. communis* como co-sustrato en la co-digestión de heces porcinas y equinas, ajustando una relación C/N de 25:1, favoreció la producción de biogás. La mayor producción de biogás se obtuvo con la co-digestión de semilla de bagazo con heces equinas a temperatura controlada y la menor producción se obtuvo a esta misma temperatura con el control positivo de heces porcinas, entre ambos resultados, la diferencia fue estadísticamente significativa.

A temperatura controlada, la secuencia de mayor a menor producción de biogás fue: semilla de bagazo con heces equinas; control positivo de heces equinas; partes aéreas con heces equinas; partes aéreas con heces porcinas, semilla de bagazo con heces equinas; partes aéreas con heces porcinas; semilla de bagazo con heces porcinas; partes aéreas con heces porcinas; y finalmente, el control positivo de heces porcinas.

A temperatura ambiente, la mayor producción se obtuvo con semilla de bagazo y heces equinas; seguida por partes aéreas con semilla de bagazo y heces porcinas; partes aéreas con heces equinas; partes aéreas con semilla de bagazo y heces equinas; control positivo de heces equinas; semilla de bagazo con heces porcinas; partes aéreas con heces porcinas; y, en menor orden, el control positivo de heces porcinas.

Además, se logró implementar un prototipo de biodigestor para la producción de biogás. Los resultados, aunque prometedores, requieren un seguimiento continuo a lo largo del TRH establecido para validar completamente el potencial del sistema y su capacidad para mejorar la producción de biogás y la purificación de este. Se espera que la información generada a partir de este estudio contribuya al avance del diseño y la implementación de sistemas de biodigestión más eficientes, seguros y sostenibles.

## 9 Bibliografía

- [1] “Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development | Department of Economic and Social Affairs”. Consultado: el 8 de mayo de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://sdgs.un.org/2030agenda>
- [2] “Climate Change 2021: The Physical Science Basis | Climate Change 2021: The Physical Science Basis”. Consultado: el 8 de mayo de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/>
- [3] G. Kvesitadze *et al.*, “Two-stage anaerobic process for bio-hydrogen and bio-methane combined production from biodegradable solid wastes”, *Energy*, vol. 37, núm. 1, pp. 94–102, 2012, doi: 10.1016/j.energy.2011.08.039.
- [4] C. Da Costa Gomez, “Biogas as an energy option”, en *The Biogas Handbook: Science, Production and Applications*, Elsevier Inc., 2013, pp. 1–16. doi: 10.1533/9780857097415.1.
- [5] Tropicos, “Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 06 May 2025 <https://tropicos.org>”. Consultado: el 5 de mayo de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Ricinus%20communis>
- [6] R. Pita y A. A. Martínez-larrañaga, “Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma Pita R, Anadón A y Martínez-Larrañaga MR”, 2004, Consultado: el 13 de octubre de 2021. [En línea]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/919/91921301.pdf>
- [7] D. S. Ogunniyi, “Castor oil: A vital industrial raw material”, el 1 de junio de 2006, *Elsevier*. doi: 10.1016/j.biortech.2005.03.028.
- [8] INIFAP, “La higuerilla como cultivo de alternativa | Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias | Gobierno | [gob.mx](http://gob.mx)”. Consultado: el 5 de mayo de 2025. [En línea]. Disponible en:

<https://www.gob.mx/inifap/articulos/la-higuerilla-como-cultivo-de-alternativa>

- [9] H. Guzmán-Bello, I. López-Díaz, M. Aybar-Mejía, M. Domínguez-Garabitos, y J. A. de Frias, “Biomass Energy Potential of Agricultural Residues in the Dominican Republic”, *Sustainability* 2023, Vol. 15, Page 15847, vol. 15, núm. 22, p. 15847, nov. 2023, doi: 10.3390/SU152215847.
- [10] A. Limayem y S. C. Ricke, “Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects”, *Prog Energy Combust Sci*, vol. 38, núm. 4, pp. 449–467, ago. 2012, doi: 10.1016/J.PECS.2012.03.002.
- [11] S. A. Neshat, M. Mohammadi, G. D. Najafpour, y P. Lahijani, “Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 79, pp. 308–322, nov. 2017, doi: 10.1016/J.RSER.2017.05.137.
- [12] M. C. D. Salangsang, M. Sekine, S. Akizuki, H. D. Sakai, N. Kurosawa, y T. Toda, “Effect of carbon to nitrogen ratio of food waste and short resting period on microbial accumulation during anaerobic digestion”, *Biomass Bioenergy*, vol. 162, p. 106481, jul. 2022, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2022.106481.
- [13] G. Robles, R. B. Nair, S. Kleinsteuber, M. Nikolausz, y I. Sárvári Horváth, “Biogas Production: Microbiological Aspects”, 2018, pp. 163–198. doi: 10.1007/978-3-319-77335-3\_7.
- [14] “IEA – International Energy Agency”. Consultado: el 25 de febrero de 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.iea.org/>
- [15] H. Blanco y A. Faaij, “A review at the role of storage in energy systems with a focus on Power to Gas and long-term storage”, el 1 de enero de 2018, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.rser.2017.07.062.

- [16] P. Moriarty y D. Honnery, "What is the global potential for renewable energy?", el 1 de enero de 2012, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.rser.2011.07.151.
- [17] C. Alberto, G. Bustamante, y O. M. Cerutti, *ESTADO DEL ARTE DE LA BIOENERGÍA EN MÉXICO*. 2016.
- [18] M. Guo, W. Song, y J. Buhain, "Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective", el 1 de febrero de 2015, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.rser.2014.10.013.
- [19] R. Pogaku y R. Hj. Sarbatly, *Advances in biofuels*, vol. 9781461462. Springer US, 2014. doi: 10.1007/978-1-4614-6249-1.
- [20] J. E. Castellanos-Sánchez, F. A. Aguilar-Aguilar, R. Hernández-Altamirano, J. A. Venegas Venegas, y D. Raj Aryal, "Biogas purification processes: review and prospects", *Biofuels*, vol. 15, núm. 2, pp. 215–227, 2024, doi: 10.1080/17597269.2023.2223801;WEBSITE:WEBSITE:TFOPB;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- [21] P. McKendry, "Energy production from biomass (part 3): gasification technologies", *Bioresour Technol*, vol. 83, núm. 1, pp. 55–63, may 2002, doi: 10.1016/S0960-8524(01)00120-1.
- [22] P. Basu, "Gasification Theory", *Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction: Practical Design and Theory*, pp. 211–262, ene. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-812992-0.00007-8.
- [23] J. Wang y Y. Yin, *Biohydrogen Production from Organic Wastes*. en *Green Energy and Technology*. Singapore: Springer Singapore, 2017. doi: 10.1007/978-981-10-4675-9.
- [24] A. Singh y D. Rathore, *Biohydrogen production: Sustainability of current technology and future perspective*. New Delhi: Springer India, 2017. doi: 10.1007/978-81-322-3577-4.

- [25] Z. Fang, "Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries", 2013, *Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg*. doi: 10.1007/978-3-642-32735-3.
- [26] N. Kolesárová, M. Hutan, I. Bodík, y V. Špalková, "Utilization of biodiesel by-products for biogas production", 2011. doi: 10.1155/2011/126798.
- [27] H. Ghavinati y M. Tabatabaei, *Biogas: Fundamentals, Process, and Operation*. 2018.
- [28] T. Abbasi, S. M. Tauseef, y S. A. Abbasi, *Biogas energy*. Springer New York, 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-1040-9.
- [29] D. Yu, J. M. Kurola, K. Lähde, M. Kymäläinen, A. Sinkkonen, y M. Romantschuk, "Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes", *J Environ Manage*, vol. 143, p. 54, 2014, doi: 10.1016/j.jenvman.2014.04.025.
- [30] C. G. . Gunnerson y David. Stuckey, "Anaerobic digestion : principles and practices for biogas systems", p. 154, 1986.
- [31] C. Baskar, S. Baskar, y R. S. Dhillon, *Biomass conversion: The interface of biotechnology, chemistry and materials science*, vol. 9783642284. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. doi: 10.1007/978-3-642-28418-2.
- [32] T. Abbasi, S. M. Tauseef, y S. A. Abbasi, "Anaerobic digestion for global warming control and energy generation - An overview", el 1 de junio de 2012, *Pergamon*. doi: 10.1016/j.rser.2012.02.046.
- [33] T. G. Induchoodan, I. Haq, y A. S. Kalamdhad, "Factors affecting anaerobic digestion for biogas production: a review", *Advanced Organic Waste Management: Sustainable Practices and Approaches*, pp. 223–233, ene. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-85792-5.00020-4.

- [34] J. D. Murphy y T. Thamsiriroj, “Fundamental science and engineering of the anaerobic digestion process for biogas production”, en *The Biogas Handbook: Science, Production and Applications*, Elsevier Inc., 2013, pp. 104–130. doi: 10.1533/9780857097415.1.104.
- [35] E. Rosenberg, E. F. De Long, S. Lory, E. Stackebrandt, y F. Thompson, *The prokaryotes: Other major lineages of bacteria and the archaea*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-38954-2.
- [36] R. S. Wolfe y B. C. McBride, “A New Coenzyme of Methyl Transfer, Coenzyme M”, *Biochemistry*, vol. 10, núm. 12, pp. 2317–2324, jun. 1971, doi: 10.1021/bi00788a022.
- [37] C. D. Taylor, B. C. McBride, R. S. Wolfe, y M. P. Bryant, “Coenzyme M, Essential for Growth of a Rumen Strain of *Methanobacterium ruminantium* Downloaded from”, 1974. Consultado: el 18 de mayo de 2021. [En línea]. Disponible en: <http://jb.asm.org/>
- [38] W. E. Balch y R. S. Wolfe, “New Approach to the Cultivation of Methanogenic Bacteria: 2-Mercaptoethanesulfonic Acid (HS-CoM)-Dependent Growth of *Methanobacterium ruminantium* in a Pressurized Atmosphere”, 1976. Consultado: el 18 de mayo de 2021. [En línea]. Disponible en: <http://aem.asm.org/>
- [39] D. R. Boone, W. B. Whitman, y P. Rouvière, “Diversity and Taxonomy of Methanogens”, en *Methanogenesis*, Springer US, 1993, pp. 35–80. doi: 10.1007/978-1-4615-2391-8\_2.
- [40] M. W. Friedrich, “Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea”, 2005, *Academic Press Inc.* doi: 10.1016/S0076-6879(05)97026-2.
- [41] J. Zábranská, J. Štěpová, R. Wachtl, P. Jenlčák, y M. Dohányos, “The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters

at different loading rates”, en *Water Science and Technology*, Int Water Assoc, nov. 2000, pp. 49–56. doi: 10.2166/wst.2000.0168.

- [42] S. Mchugh, M. Carton, G. Collins, y V. O’flaherty, “Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37 °C”, 2004, doi: 10.1016/j.femsec.2004.02.012.
- [43] G. Zur Nutzung, “Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung”, 2016, Consultado: el 5 de octubre de 2021. [En línea]. Disponible en: [www.dbfz.de](http://www.dbfz.de)
- [44] J. W. A. Langeveld, R. Guisson, y H. Stichnothe, “MOBILISING SUSTAINABLE SUPPLY CHAINS – BIOGAS CASES BIOGAS PRODUCTION FROM MUNICIPAL SOLID WASTE, OIL PALM RESIDUES AND CO-DIGESTION”, *IEA Bioenergy*, p. 98, 2016.
- [45] S. Z. Bolaji y A. O. Benson, “Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.): Botany, Ecology and Uses”, 2014. Consultado: el 18 de mayo de 2021. [En línea]. Disponible en: [www.ijsr.net](http://www.ijsr.net)
- [46] V. Scholz y J. N. da Silva, “Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel”, el 1 de febrero de 2008, *Pergamon*. doi: 10.1016/j.biombioe.2007.08.004.
- [47] H. Bateni, K. Karimi, A. Zamani, y F. Benakashani, “Castor plant for biodiesel, biogas, and ethanol production with a biorefinery processing perspective”, *Appl Energy*, vol. 136, pp. 14–22, 2014, doi: 10.1016/j.apenergy.2014.09.005.
- [48] S. Brahma *et al.*, “Biodiesel production from mixed oils: A sustainable approach towards industrial biofuel production”, *Chemical Engineering Journal Advances*, vol. 10, p. 100284, may 2022, doi: 10.1016/J.CEJA.2022.100284.

- [49] M. A. Bashir, S. Wu, J. Zhu, A. Krosuri, M. U. Khan, y R. J. Ndeddy Aka, “Recent development of advanced processing technologies for biodiesel production: A critical review”, *Fuel Processing Technology*, vol. 227, p. 107120, mar. 2022, doi: 10.1016/J.FUPROC.2021.107120.
- [50] F. Monlau, E. Latrille, A. C. Da Costa, J.-P. Steyer, y H. Carrère, “Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreatment”, *Appl Energy*, vol. 102, pp. 1105–1113, feb. 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.06.042.
- [51] M. Shafiei, H. Zilouei, A. Zamani, M. J. Taherzadeh, y K. Karimi, “Enhancement of ethanol production from spruce wood chips by ionic liquid pretreatment”, *Appl Energy*, vol. 102, pp. 163–169, feb. 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.060.
- [52] M. Adl, K. Sheng, y A. Gharibi, “Technical assessment of bioenergy recovery from cotton stalks through anaerobic digestion process and the effects of inexpensive pre-treatments”, *Appl Energy*, vol. 93, pp. 251–260, may 2012, doi: 10.1016/j.apenergy.2011.11.065.
- [53] P. Salehian y K. Karimi, “Alkali pretreatment for improvement of biogas and ethanol production from different waste parts of pine tree”, *Ind Eng Chem Res*, vol. 52, núm. 2, pp. 972–978, ene. 2013, doi: 10.1021/ie302805c.
- [54] E. E. N. Alves, C. D. F. Souza, K. R. A. Inoue, y T. D. S. Leite, “Potential of production of biogas from the castor bean (*Ricinus communis* L.) cake”, *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2010, ASABE 2010*, vol. 5, núm. 10, pp. 9–3834, 2010, doi: 10.13031/2013.29831.
- [55] L. Zhang, B. Zhang, X. Zhu, H. Chang, S. Ou, y H. Wang, “Role of bioreactors in microbial biomass and energy conversion”, en *Green Energy and Technology*, vol. 0, núm. 9789811076763, Springer Verlag, 2018, pp. 39–78. doi: 10.1007/978-981-10-7677-0\_2.

- [56] M. H. Gerardi, *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. 2003. doi: 10.1002/0471468967.
- [57] M. Henze, M. C. M. van Loosdrecht, G. A. Ekama, y D. Brdjanovic, “Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design”, *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*, sep. 2008, doi: 10.2166/9781780401867.
- [58] I. M. Cotabarren, J. Moreno, A. L. Martínez, F. A. Cabrera, y J. Piña, “Valorization of anaerobic digestion liquid residue through the production of organic fertilizer by fluidized bed granulation”, *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 147, pp. 113–121, jul. 2019, doi: 10.1016/J.CHERD.2019.04.043.
- [59] M. S. Switzenbaum, “Anaerobic fixed film wastewater treatment”, *Enzyme Microb Technol*, vol. 5, núm. 4, pp. 242–250, jul. 1983, doi: 10.1016/0141-0229(83)90072-8.
- [60] A. C. Wilkie, “Fixed-film anaerobic digestion of flushed waste”, US 7,297.274 B2, el 20 de noviembre de 2004 Consultado: el 24 de junio de 2025. [En línea]. Disponible en: <http://www.napa.ufl.edu/2000news/>
- [61] F. Partial, “Bioreactors and bioreactions engineering (2014)”, pp. 1–4, 2014, Consultado: el 16 de septiembre de 2025. [En línea]. Disponible en: [https://books.google.com/books/about/Bioprocess\\_Engineering.html?hl=es&id=0VHtngEACAAJ](https://books.google.com/books/about/Bioprocess_Engineering.html?hl=es&id=0VHtngEACAAJ)
- [62] M. A. Akindolire, H. Rama, y A. Roopnarain, “Psychrophilic anaerobic digestion: A critical evaluation of microorganisms and enzymes to drive the process”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 161, p. 112394, jun. 2022, doi: 10.1016/J.RSER.2022.112394.
- [63] Q. Liao, J.-S. Chang, C. Herrmann, y A. Xia, *Bioreactors for microbial biomass and energy conversion*.

- [64] E. Holl *et al.*, “Two-stage anaerobic digestion: State of technology and perspective roles in future energy systems”, *Bioresour Technol*, vol. 360, p. 127633, sep. 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2022.127633.
- [65] R. Sarup. Singh, Ashok. Pandey, y Edgard. Gnansounou, “Biofuels : production and future perspectives”, p. 578, 2017.
- [66] E. Ryckebosch, M. Drouillon, y H. Vervaeren, “Techniques for transformation of biogas to biomethane”, el 1 de mayo de 2011, *Pergamon*. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.02.033.
- [67] A. Petersson y A. Wellinger, “Biogas upgrading technologies- developments and innovations Task 37-Energy from biogas and landfill gas”, *IEA Bioenergy*, p. 20, 2009, Consultado: el 26 de mayo de 2021. [En línea]. Disponible en: [www.iea-biogas.net](http://www.iea-biogas.net).
- [68] N. Abatzoglou y S. Boivin, “A review of biogas purification processes”, el 1 de enero de 2009, *John Wiley & Sons, Ltd*. doi: 10.1002/bbb.117.
- [69] M. R. Rodero *et al.*, “Biogas Purification and Upgrading Technologies”, Springer, Cham, 2018, pp. 239–276. doi: 10.1007/978-3-319-77335-3\_10.
- [70] W. A. Telliard, “Method 1684: Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids”, *U. S. Environmental Protection Agency*, núm. January, p. 13, 2001.
- [71] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, y F. Smith, “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances”, *Anal Chem*, vol. 28, núm. 3, pp. 350–356, 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [72] W. Boyles, “The Science of CHEMICAL OXYGEN DEMAND”, *Technical Information Series, Booklet No. 9*, 1997, Consultado: el 15 de marzo de 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.nrc.gov/docs/ML0510/ML051080100.pdf>

- [73] A. Walkley y I. A. Black, "An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method", *Soil Sci*, vol. 37, núm. 1, pp. 29–38, 1934, doi: 10.1097/00010694-193401000-00003.
- [74] J. Kjeldahl, "A new method for the determination of nitrogen in organic matter", *Z Anal Chem*, pp. 366–382, 1883.
- [75] M. Y. Nurliyana *et al.*, "Effect of C/N ratio in methane productivity and biodegradability during facultative co-digestion of palm oil mill effluent and empty fruit bunch", *Ind Crops Prod*, vol. 76, pp. 409–415, dic. 2015, doi: 10.1016/J.INDCROP.2015.04.047.
- [76] P. E. Luton, J. M. Wayne, R. J. Sharp, y P. W. Riley, "The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill", 2002, *Society for General Microbiology*. doi: 10.1099/00221287-148-11-3521.
- [77] J. D. Oliner, K. W. Kinzler, y B. Vogelstein, "In vivo cloning of PCR products in E.coli", *Nucleic Acids Res*, vol. 21, núm. 22, pp. 5192–5197, nov. 1993, doi: 10.1093/NAR/21.22.5192.
- [78] R. T.-M. B. Evol y undefined 1987, "The neighbor-joining method: a new method for", *academia.eduRP TreesMol Biol Evol*, 1987•*academia.edu*, Consultado: el 20 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.academia.edu/download/56986116/7sait.pdf>
- [79] P. Baltrėnas y E. Baltrėnaitė, "The Selection and Economic Assessment of Small-Scale Bioreactors Producing Biogas", en *Small Bioreactors for Management of Biodegradable Waste*, Springer International Publishing, 2018, pp. 63–89. doi: 10.1007/978-3-319-78211-9\_3.
- [80] S. A. Vali, J. Moral-Vico, X. Font, y A. Sánchez, "Adsorptive removal of siloxanes from biogas: recent advances in catalyst reusability and water

content effect”, *Biomass Convers Biorefin*, vol. 14, núm. 19, pp. 23259–23273, oct. 2024, doi: 10.1007/S13399-023-04478-1/FIGURES/3.

- [81] O. I. Maile, E. Muzenda, y H. Tesfagiorgis, “Chemical Absorption of Carbon Dioxide in Biogas Purification”, *Procedia Manuf*, vol. 7, pp. 639–646, ene. 2017, doi: 10.1016/J.PROMFG.2016.12.095.
- [82] R. Kaur, P. Gera, M. K. Jha, y T. Bhaskar, “Pyrolysis kinetics and thermodynamic parameters of castor (*Ricinus communis*) residue using thermogravimetric analysis”, *Bioresour Technol*, vol. 250, pp. 422–428, feb. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.077.
- [83] S. Fournel *et al.*, “Influence of biomass properties on technical and environmental performance of a multi-fuel boiler during on-farm combustion of energy crops”, *Appl Energy*, vol. 141, pp. 247–259, mar. 2015, doi: 10.1016/J.APENERGY.2014.12.022.
- [84] Lincoln. Taiz, I. M. . Møller, A. S. . Murphy, y Eduardo. Zeiger, “Plant physiology and development”, 2023.
- [85] A. Demirbaş, “Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals”, *Energy Convers Manag*, vol. 42, núm. 11, pp. 1357–1378, jul. 2001, doi: 10.1016/S0196-8904(00)00137-0.
- [86] P. McKendry, “Energy production from biomass (part 1): overview of biomass”, *Bioresour Technol*, vol. 83, núm. 1, pp. 37–46, may 2002, doi: 10.1016/S0960-8524(01)00118-3.
- [87] Z. Hilioti, C. M. Michailof, D. Valasiadis, E. F. Iliopoulou, V. Koidou, y A. A. Lappas, “Characterization of castor plant-derived biochars and their effects as soil amendments on seedlings”, *Biomass Bioenergy*, vol. 105, pp. 96–106, oct. 2017, doi: 10.1016/j.biombioe.2017.06.022.
- [88] C. G. MacHado, C. C. Martins, S. C. S. Cruz, J. Nakagawa, y F. R. Da Silva Pereira, “Quality of castor bean seeds (*Ricinus communis* L.)

- affected by raceme and fruit position during storage”, *Semin Cienc Agrar*, vol. 31, núm. 1, pp. 301–312, 2010, doi: 10.5433/1679-0359.2010v31n2p301.
- [89] P. C. Coradi, C. H. P. Fernandes, C. C. Peralta, y T. L. Pereira, “Effects of drying and storage conditions in the quality of sunflower seeds”, *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, vol. 20, núm. 1, pp. 26–35, 2015, doi: 10.12661/pap.2015.005.
- [90] R. Chandra, V. K. Vijay, P. M. V. Subbarao, y T. K. Khura, “Production of methane from anaerobic digestion of jatropha and pongamia oil cakes”, *Appl Energy*, vol. 93, pp. 148–159, 2012, doi: 10.1016/j.apenergy.2010.10.049.
- [91] J. Böske, B. Wirth, F. Garlipp, J. Mumme, y H. Van den Weghe, “Anaerobic digestion of horse dung mixed with different bedding materials in an upflow solid-state (UASS) reactor at mesophilic conditions”, *Bioresour Technol*, vol. 158, pp. 111–118, abr. 2014, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2014.02.034.
- [92] B. A. Wartell, V. Krumins, J. Alt, K. Kang, B. J. Schwab, y D. E. Fennell, “Methane production from horse manure and stall waste with softwood bedding”, *Bioresour Technol*, vol. 112, pp. 42–50, may 2012, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.02.012.
- [93] C. T. Chong *et al.*, “Pyrolysis characteristics and kinetic studies of horse manure using thermogravimetric analysis”, *Energy Convers Manag*, vol. 180, pp. 1260–1267, ene. 2019, doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2018.11.071.
- [94] A. K. Kalia y S. P. Singh, “Horse dung as a partial substitute for cattle dung for operating family-size biogas plants in a hilly region”, *Bioresour Technol*, vol. 64, núm. 1, pp. 63–66, abr. 1998, doi: 10.1016/S0960-8524(97)00159-4.

- [95] D. J. Lee *et al.*, “Valorization of animal manure: A case study of bioethanol production from horse manure”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 403, p. 126345, ene. 2021, doi: 10.1016/J.CEJ.2020.126345.
- [96] S. Caro y O. Dahl, “Thermochemical valorisation of waste: Pyrolytic conversion of horse manure”, *Clean Eng Technol*, vol. 4, p. 100181, oct. 2021, doi: 10.1016/J.CLET.2021.100181.
- [97] Z. Wang *et al.*, “Impact of total solids content on anaerobic co-digestion of pig manure and food waste: Insights into shifting of the methanogenic pathway”, 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.06.048.
- [98] S. Riya, K. Suzuki, L. Meng, S. Zhou, A. Terada, y M. Hosomi, “The influence of the total solid content on the stability of dry-thermophilic anaerobic digestion of rice straw and pig manure”, *Waste Management*, vol. 76, pp. 350–356, jun. 2018, doi: 10.1016/J.WASMAN.2018.02.033.
- [99] J. Zhang *et al.*, “Enhancing biogas production from livestock manure in solid-state anaerobic digestion by sorghum-vinegar residues”, *Environ Technol Innov*, vol. 26, p. 102276, may 2022, doi: 10.1016/J.ETI.2022.102276.
- [100] H. H. Stein y G. C. Shurson, “BOARD-INVITED REVIEW: The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets”, *J Anim Sci*, vol. 87, núm. 4, pp. 1292–1303, abr. 2009, doi: 10.2527/JAS.2008-1290.
- [101] Y. Wang *et al.*, “Methane production from the co-digestion of pig manure and corn stover with the addition of cucumber residue: Role of the total solids content and feedstock-to-inoculum ratio”, *Bioresour Technol*, vol. 306, p. 123172, jun. 2020, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.123172.
- [102] A. Sakina, N. Nazir, P. Sultan, y Q. P. Hassan, “Bioconversion of agricultural residues and waste to value added products”, *Value-*

*Addition in Agri-Food Industry Waste through Enzyme Technology*, pp. 355–364, ene. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-89928-4.00015-8.

- [103] Sonu *et al.*, “Agro-waste to sustainable energy: A green strategy of converting agricultural waste to nano-enabled energy applications”, *Science of The Total Environment*, vol. 875, p. 162667, jun. 2023, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2023.162667.
- [104] N. Nwokolo, P. Mukumba, K. Obileke, y M. Enebe, “Waste to Energy: A Focus on the Impact of Substrate Type in Biogas Production”, *Processes 2020, Vol. 8, Page 1224*, vol. 8, núm. 10, p. 1224, oct. 2020, doi: 10.3390/PR8101224.
- [105] M. C. Caruso *et al.*, “Recent Updates on the Use of Agro-Food Waste for Biogas Production”, *Applied Sciences 2019, Vol. 9, Page 1217*, vol. 9, núm. 6, p. 1217, mar. 2019, doi: 10.3390/APP9061217.
- [106] J. P. Chastain, “Composition of Equine Manure as Influenced by Stall Management”, *Agriculture 2022, Vol. 12, Page 823*, vol. 12, núm. 6, p. 823, jun. 2022, doi: 10.3390/AGRICULTURE12060823.
- [107] L. ling Li y S. tian Li, “Nitrogen Mineralization from Animal Manures and Its Relation to Organic N Fractions”, *J Integr Agric*, vol. 13, núm. 9, pp. 2040–2048, sep. 2014, doi: 10.1016/S2095-3119(14)60769-3.
- [108] A. D. Dima, O. C. Pârvulescu, C. Mateescu, y T. Dobre, “Optimization of substrate composition in anaerobic co-digestion of agricultural waste using central composite design”, *Biomass Bioenergy*, vol. 138, p. 105602, jul. 2020, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2020.105602.
- [109] C. A. Williams, L. B. Kenny, y A. O. Burk, “Effects of grazing system, season, and forage carbohydrates on glucose and insulin dynamics of the grazing horse”, *J Anim Sci*, vol. 97, núm. 6, pp. 2541–2554, may 2019, doi: 10.1093/jas/skz103.

- [110] T. Shubaashini y A. Raj Kumar, "Performance Evaluation of UFAPB Reactor for Treatment of Domestic Sewage", *International Journal of Engineering Research and*, vol. V4, núm. 10, pp. 132–135, 2015, doi: 10.17577/ijertv4is100212.
- [111] D. Bona *et al.*, "The Biorefinery Concept Applied to Bioethanol and Biomethane Production from Manure", *Waste Biomass Valorization*, vol. 9, núm. 11, 2018, doi: 10.1007/s12649-017-9981-2.
- [112] H. Carrère, B. Sialve, y N. Bernet, "Improving pig manure conversion into biogas by thermal and thermo-chemical pretreatments", *Bioresour Technol*, vol. 100, núm. 15, 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.015.
- [113] A. Lehtomäki, S. Huttunen, y J. A. Rintala, "Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio", *Resour Conserv Recycl*, vol. 51, núm. 3, pp. 591–609, sep. 2007, doi: 10.1016/J.RESCONREC.2006.11.004.
- [114] Joseph. Felsenstein, *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, 2004. Consultado: el 22 de septiembre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://latam.casadellibro.com/libro-inferring-phylogenies/9780878931774/929679>
- [115] C. Zhu, J. Zhang, Y. Tang, X. Zhengkai, y R. Song, "Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis", *Microbiol Res*, vol. 166, núm. 1, pp. 27–35, ene. 2011, doi: 10.1016/J.MICRES.2010.01.004.
- [116] J. De Vrieze, T. Hennebel, N. Boon, y W. Verstraete, "Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation", *Bioresour Technol*, vol. 112, pp. 1–9, may 2012, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.02.079.
- [117] F. Murru, K. Fliegerova, E. Mura, J. Mrázek, J. Kopečný, y G. Moniello, "A comparison of methanogens of different regions of the equine

hindgut”, *Anaerobe*, vol. 54, pp. 104–110, dic. 2018, doi: 10.1016/J.ANAEROBE.2018.08.009.

- [118] K. R. Sowers y J. G. Ferry, “Isolation and Characterization of a Methylophilic Marine Methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 45, núm. 2, pp. 684–690, 1983, doi: 10.1128/AEM.45.2.684-690.1983.
- [119] T. Nomura, A. Yoshihara, T. Nagao, H. Tokumoto, y Y. Konishi, “Effect of the surface characteristics of *Methanosarcina barkeri* on immobilization to support materials”, *Advanced Powder Technology*, vol. 18, núm. 5, pp. 489–501, ene. 2007, doi: 10.1163/156855207782146599.
- [120] B. S. Samuel y J. I. Gordon, “A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, núm. 26, pp. 10011–10016, jun. 2006, doi: 10.1073/PNAS.0602187103.
- [121] “Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology”, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2010, doi: 10.1007/978-3-540-77587-4.
- [122] Y. Zhao, D. R. Boone, R. A. Mah, J. E. Boone, y L. Xun, “Isolation and characterization of *Methanocorpusculum labreanum* sp. nov. from the LaBrea Tar Pits”, *Int J Syst Bacteriol*, vol. 39, núm. 1, pp. 10–13, ene. 1989, doi: 10.1099/00207713-39-1-10/CITE/REFWORKS.
- [123] “Opinion 62: Transfer of the Type Species of the Genus *Methanococcus* to the Genus *Methanosarcina* as *Methanosarcina mazei* (Barker 1936) comb. nov. et emend. Mah and Kuhn 1984 and Conservation of the Genus *Methanococcus* (Approved Lists, 1980) emend. Mah and Kuhn 1984 with *Methanococcus vannielii* (Approved Lists, 1980) as the Type Species”, *Int J Syst Bacteriol*, vol. 36, núm. 3,

pp. 491–491, jul. 1986, doi: 10.1099/00207713-36-3-491/CITE/BIBTEX.

- [124] M. Göker *et al.*, “Genome sequence of the mud-dwelling archaeon *Methanoplanus limicola* type strain (DSM 2279(T)), reclassification of *Methanoplanus petrolearius* as *Methanolacinia petrolearia* and emended descriptions of the genera *Methanoplanus* and *Methanolacinia*”, *Stand Genomic Sci*, vol. 9, núm. 3, pp. 1076–1088, oct. 2014, doi: 10.4056/SIGS.5138968.
- [125] S. Shimizu, R. Upadhye, Y. Ishijima, y T. Naganuma, “*Methanosarcina horonobensis* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface Miocene formation”, *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 61, núm. Pt 10, pp. 2503–2507, oct. 2011, doi: 10.1099/IJS.0.028548-0.
- [126] P. D. Franzmann, N. Springer, W. Ludwig, E. Conway De Macario, y M. Rohde, “A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov.”, *Syst Appl Microbiol*, vol. 15, núm. 4, pp. 573–581, dic. 1992, doi: 10.1016/S0723-2020(11)80117-7.
- [127] Y. Yashiro, S. Sakai, M. Ehara, M. Miyazaki, T. Yamaguchi, y H. Imachi, “*Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge”, *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 61, núm. Pt 1, pp. 53–59, ene. 2011, doi: 10.1099/IJS.0.014811-0.
- [128] T. Iino *et al.*, “*Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*”, *Microbes Environ*, vol. 28, núm. 2, pp. 244–250, jun. 2013, doi: 10.1264/JSME2.ME12189.
- [129] W. F. Fricke *et al.*, “The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis”, *J*

*Bacteriol*, vol. 188, núm. 2, pp. 642–658, ene. 2006, doi: 10.1128/JB.188.2.642-658.2006.

- [130] S. Rea, J. P. Bowman, S. Popovski, C. Pimm, y A. D. G. Wright, “Methanobrevibacter millerae sp. nov. and Methanobrevibacter olleyae sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth”, *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 57, núm. Pt 3, pp. 450–456, mar. 2007, doi: 10.1099/IJS.0.63984-0.
- [131] E. A. Economou, G. Dimitropoulou, N. Prokopidou, I. Dalla, y T. Sfetsas, “Anaerobic Digestion Remediation in Three Full-Scale Biogas Plants through Supplement Additions”, *Methane 2023, Vol. 2, Pages 265-278*, vol. 2, núm. 3, pp. 265–278, jul. 2023, doi: 10.3390/METHANE2030018.
- [132] M. Chuvochina *et al.*, “Proposal of names for 329 higher rank taxa defined in the Genome Taxonomy Database under two prokaryotic codes”, *FEMS Microbiol Lett*, vol. 370, ene. 2023, doi: 10.1093/FEMSLE/FNAD071.
- [133] A. Poehlein, V. V. Zverlov, R. Daniel, W. H. Schwarz, y W. Liebl, “Complete Genome Sequence of *Clostridium stercorarium* subsp. *stercorarium* Strain DSM 8532, a Thermophilic Degradar of Plant Cell Wall Fibers”, *Genome Announc*, vol. 1, núm. 2, pp. e00073-13, 2013, doi: 10.1128/GENOMEA.00073-13.
- [134] A. Oren, “The Family Methanocorpusculaceae”, *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, pp. 225–230, jul. 2014, doi: 10.1007/978-3-642-38954-2\_314.
- [135] N. Goyal, Z. Zhou, y I. A. Karimi, “Metabolic processes of *Methanococcus maripaludis* and potential applications”, *Microb Cell Fact*, vol. 15, núm. 1, pp. 1–19, jun. 2016, doi: 10.1186/S12934-016-0500-0/FIGURES/7.

- [136] S. C. Chong y D. R. Boone, “Methanocorpusculum”, *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1–4, sep. 2015, doi: 10.1002/9781118960608.GBM00504.
- [137] C. L. Romagnoli *et al.*, “Diversity of Mycobacteriaceae from aquatic environment at the São Paulo Zoological Park Foundation in Brazil”, *PLoS One*, vol. 15, núm. 1, p. e0227759, ene. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0227759.
- [138] H. M. Wexler, “Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty”, *Clin Microbiol Rev*, vol. 20, núm. 4, pp. 593–621, oct. 2007, doi: 10.1128/CMR.00008-07.
- [139] A. Oren, “The family methanosarcinaceae”, *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, pp. 259–281, jul. 2014, doi: 10.1007/978-3-642-38954-2\_408.
- [140] G. Capson-Tojo *et al.*, “Methanosarcina plays a main role during methanogenesis of high-solids food waste and cardboard”, *Waste Management*, vol. 76, pp. 423–430, jun. 2018, doi: 10.1016/J.WASMAN.2018.04.004.
- [141] T. Nishiyama, A. Ueki, N. Kaku, K. Watanabe, y K. Ueki, “Bacteroides graminisolvens sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste”, *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 59, núm. Pt 8, pp. 1901–1907, 2009, doi: 10.1099/IJS.0.008268-0.
- [142] E. Z. Salazar de Vegas<sup>1</sup> y B. Nieves<sup>2</sup>, “Acinetobacter spp: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos”, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 25, núm. 2, pp. 64–71, 2005, Consultado: el 19 de octubre de 2025. [En línea]. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562005000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- [143] D. Pulami *et al.*, “Acinetobacter baumannii in manure and anaerobic digestates of German biogas plants”, *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 96, núm. 10, oct. 2020, doi: 10.1093/FEMSEC/FIAA176.
- [144] J. Wang y Y. Yin, “Biological production of medium-chain carboxylates through chain elongation: An overview”, *Biotechnol Adv*, vol. 55, p. 107882, mar. 2022, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107882.
- [145] P. Guo, K. Zhang, X. Ma, y P. He, “Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges”, *J Anim Sci Biotechnol*, vol. 11, núm. 1, pp. 1–10, feb. 2020, doi: 10.1186/S40104-019-0402-1/FIGURES/2.
- [146] F. Morio *et al.*, “Antimicrobial Susceptibilities and Clinical Sources of Dialister Species”, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 51, núm. 12, p. 4498, dic. 2007, doi: 10.1128/AAC.00538-07.
- [147] G. M. Maestrojuan, J. E. Boone, R. A. Mah, J. A. G. F. Menaia, M. S. Sachs, y D. R. Boone, “Taxonomy and halotolerance of mesophilic Methanosarcina strains, assignment of strains to species, and synonymy of Methanosarcina mazei and Methanosarcina frisia”, *Int J Syst Bacteriol*, vol. 42, núm. 4, pp. 561–567, oct. 1992, doi: 10.1099/00207713-42-4-561/CITE/REFWORKS.
- [148] N. Sánchez, A. Sandoval, F. Díaz-Corrales, y J. Serrano, “El género Rhodococcus. Una revisión didáctica”, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 24, núm. 1–2, pp. 24–33, 2004, Consultado: el 20 de octubre de 2025. [En línea]. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562004000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- [149] G. Comi y C. Cantoni, “PSYCHROTROPHIC BACTERIA | Arthrobacter spp.”, *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, pp. 372–378, ene. 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00440-4.
- [150] I. I. Ngom *et al.*, “Taxono-genomics and description of Gordonibacter massiliensis sp. nov., a new bacterium isolated from stool of healthy

patient”, *New Microbes New Infect*, vol. 33, p. 100624, ene. 2020, doi: 10.1016/J.NMNI.2019.100624.

- [151] T. Kern, M. A. Fischer, U. Deppenmeier, R. A. Schmitz, y M. Rother, “Methanosarcina flavescens sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a full-scale anaerobic digester”, *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 66, núm. 3, pp. 1533–1538, mar. 2016, doi: 10.1099/IJSEM.0.000894/CITE/REFWORKS.
- [152] X. X. Li *et al.*, “Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs”, *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 120, pp. 170–185, may 2017, doi: 10.1016/J.IBIOD.2017.02.005.
- [153] B. G. Schroeder *et al.*, “Anaerobic mono-digestion of wheat straw in a three-stage semi-continuous system inspired by a beetle larva gut”, ago. 2025, doi: 10.21203/RS.3.RS-7320487/V1.
- [154] R. Kaur, P. Gera, M. K. Jha, y T. Bhaskar, “Pyrolysis kinetics and thermodynamic parameters of castor (*Ricinus communis*) residue using thermogravimetric analysis”, *Bioresour Technol*, vol. 250, pp. 422–428, feb. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.077.
- [155] D. G. Mulat y S. J. Horn, “Biogas Production from Lignin via Anaerobic Digestion”, *RSC Energy and Environment Series*, vol. 2018-January, núm. 19, pp. 391–412, 2018, doi: 10.1039/9781788010351-00391.
- [156] X. Ma, M. Yu, M. Yang, M. Gao, C. Wu, y Q. Wang, “Synergistic effect from anaerobic co-digestion of food waste and *Sophora flavescens* residues at different co-substrate ratios”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, núm. 36, pp. 37114–37124, dic. 2019, doi: 10.1007/S11356-019-06399-X/METRICS.
- [157] Y. Chen, J. J. Cheng, y K. S. Creamer, “Inhibition of anaerobic digestion process: A review”, *Bioresour Technol*, vol. 99, núm. 10, pp. 4044–4064, jul. 2008, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2007.01.057.

- [158] M. O. L. Yusuf, A. Debora, y D. E. Ogheneruona, “Ambient temperature kinetic assessment of biogas production from co-digestion of horse and cow dung”, 2011.
- [159] K. M. Haider *et al.*, “Chemical characterization of volatile organic compounds emitted by animal manure”, *J Environ Manage*, vol. 364, p. 121453, jul. 2024, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2024.121453.
- [160] R. T. Hinnant y M. M. Kothmann, “Collecting, Drying, and Preserving Feces for Chemical and Microhistological Analysis”, *Journal of Range Management*, vol. 41, núm. 2, p. 168, mar. 1988, doi: 10.2307/3898957.
- [161] M. J. A. Romero, D. Duca, y G. Toscano, “Advancements in the Conversion of Lipid-Rich Biowastes and Lignocellulosic Residues into High-Quality Road and Jet Biofuels Using Nanomaterials as Catalysts”, *Processes*, vol. 10, núm. 2, p. 187, feb. 2022, doi: 10.3390/PR10020187/S1.
- [162] N. Ali, A. K. Kurchania, y S. Babel, “Bio-methanisation of Jatropha curcas defatted waste”, *Global Journal of Engineering and Architecture*, vol. 1, núm. 2, pp. 6–11, mar. 2014, Consultado: el 7 de octubre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.globalscienceresearchjournals.org/abstract/biomethanisation-of-jatropha-curcas-defatted-waste-45754.html>
- [163] A. J. Ward, P. J. Hobbs, P. J. Holliman, y D. L. Jones, “Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources”, *Bioresour Technol*, vol. 99, núm. 17, pp. 7928–7940, nov. 2008, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2008.02.044.
- [164] L. Lianhua *et al.*, “Anaerobic co-digestion of Pennisetum hybrid and pig manure: A comparative study of performance and microbial community at different mixture ratio and organic loading rate”, *Chemosphere*, vol.

247, p. 125871, may 2020, doi:  
10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.125871.

- [165] J. Ye *et al.*, “Improved biogas production from rice straw by co-digestion with kitchen waste and pig manure”, *Waste Management*, vol. 33, núm. 12, pp. 2653–2658, dic. 2013, doi: 10.1016/J.WASMAN.2013.05.014.
- [166] H. Bateni, F. Bateni, y K. Karimi, “Effects of Oil Extraction on Ethanol and Biogas Production from Eruca sativa Seed Cake”, *Waste Biomass Valorization*, vol. 8, núm. 6, pp. 1897–1905, 2017, doi: 10.1007/s12649-016-9731-x.
- [167] M. Nitsche, F. Hensgen, M. Wachendorf, y M. Rosen, “Energy Generation from Horse Husbandry Residues by Anaerobic Digestion, Combustion, and an Integrated Approach”, doi: 10.3390/su9030358.
- [168] M. Zhou *et al.*, “Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure”, *Biochem Eng J*, vol. 152, p. 107390, dic. 2019, doi: 10.1016/J.BEJ.2019.107390.
- [169] S. Campanaro *et al.*, “New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters”, *Biotechnol Biofuels*, vol. 13, núm. 1, pp. 1–18, feb. 2020, doi: 10.1186/S13068-020-01679-Y/FIGURES/7.
- [170] H. A. Barker, “Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of Methanobacterium Omelianskii”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 6, núm. 1, pp. 201–220, dic. 1939, doi: 10.1007/BF02146187.
- [171] S. Maia, B. Biomass Biomass, C. de Souza Guimarães, y D. Rodrigues da Silva Maia, “Development of Anaerobic Biodigester for the Production of Biogas Used in Semi-Continuous System Bioprocesses: An Efficient Alternative for Co-Digestion of Low Biodegradability

Biomass”, *Biomass 2023, Vol. 3, Pages 18-30*, vol. 3, núm. 1, pp. 18–30, ene. 2023, doi: 10.3390/BIOMASS3010002.

- [172] R. Ali y R. Al-Sa'ed, “Pilot-scale anaerobic digester for enhanced biogas production from poultry manure using a solar water heating system”, *International Journal of Environmental Studies*, vol. 75, núm. 1, pp. 201–213, ene. 2018, doi: 10.1080/00207233.2017.1392766.
- [173] I. A. Daniyan, O. L. Daniyan, O. H. Abiona, y K. Mpofu, “Development and optimization of a smart system for the production of biogas using poultry and pig dung”, *Procedia Manuf*, vol. 35, pp. 1190–1195, 2019, doi: 10.1016/J.PROMFG.2019.06.076.
- [174] M. Issahaku, N. S. A. Derkyi, y F. Kemausuor, “A systematic review of the design considerations for the operation and maintenance of small-scale biogas digesters”, *Heliyon*, vol. 10, núm. 1, p. e24019, ene. 2024, doi: 10.1016/J.HELİYON.2024.E24019.
- [175] Herwintono, A. Winaya, K. Khotimah, y A. Hidayati, “Improvement of biogas quality product from dairy cow manure using NaOH and Ca(OH)<sub>2</sub> absorbents on horizontal tube filtration system of mobile anaerobic digester”, *Energy Reports*, vol. 6, pp. 319–324, dic. 2020, doi: 10.1016/J.EGYR.2020.11.152.
- [176] J. Sun y Z. He, “Light stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibition on methanogenesis during anaerobic digestion towards enhanced VFAs production”, *Water Res*, vol. 286, p. 124229, nov. 2025, doi: 10.1016/J.WATRES.2025.124229.
- [177] B. Nkoi, B. T. Lebele-Alawa, y B. Odobeatu, “Design and Fabrication of a Modified Portable Biogas Digester for Renewable Cooking-Gas Production”, *European Journal of Engineering and Technology Research*, vol. 3, núm. 3, pp. 21–29, mar. 2018, doi: 10.24018/EJENG.2018.3.3.647.