



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Ingeniería Química

Colegio de Ingeniería Química

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL
ENRIQUECIMIENTO DE FUENTE DE CARBONO EN
LA GENERACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO
PARA EL TRATAMIENTO DE VINAZA”**

**Tesis presentada para obtener
el grado de:
Licenciatura en Ingeniería Química.**

Presenta:

Xochitl Ariadne Benito Cardoso

Director de Tesis:

Dra. Mayra Ruiz Reyes

Codirector de Tesis:

Dr. Manuel Sánchez Cantú

H. Puebla de Z. diciembre, 2025



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/174/2025
Asunto: Registro de Tema de Tesis.

C. XÓCHITL ARIADNE BENITO CARDOSO
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Química cuyo título es el siguiente:

"Determinación del efecto del enriquecimiento de fuente de carbono en la generación de un consorcio microbiano para el tratamiento de Vinaza"

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

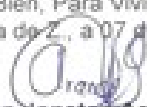
CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Directora de Tesis: Dra. Mayra Ruiz Reyes.
Co-Director de Tesis: Dr. Manuel Sánchez Cantú

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**.

Atentamente
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 07 de Octubre de 2025


Dr. Rubén Jonathan Aranda García
Secretario Académico



C.c.p. Directora de Tesis: Dra. Mayra Ruiz Reyes
C.c.p. Co-Director de Tesis: Dr. Manuel Sánchez Cantú
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C. P. 72590
(021) 329 55 00
Exts. 7250 y 7251

CTAI01



**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



CIUDAD UNIVERSITARIA

**Mtro. Juan Manuel Rosas Tapia
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente**

**ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS**

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Química

Xochitl Ariadne Benito Cardoso

Quién presenta como tema de tesis:

“Determinación del efecto del enriquecimiento de fuente de carbono en la generación de un consorcio microbiano para el tratamiento de Vinaza”

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., a 24 de noviembre de 2025

Director de Tesis
Dra. Mayra Ruíz Reyes

Agradecimientos.

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible el desarrollo de esta tesis. En primera agradecer a Dios por permitirme llegar hasta este momento, por brindarme su amor, esperanza, confianza y su fuerza de voluntad para ejecutar cada labor, su acompañamiento en cada etapa fue de gran ayuda y motivación. Mi vida a sido un hilo de emociones y retos que han sido superados gracias a él. Mi amor eterno al todo poderoso que me ha salvado mil veces. Mi admiración, respeto, amor por siempre.

En segunda, agradecer a mis padres. Ellos que estuvieron en las buenas y malas. Si algo aprendí a lo largo de este recorrido es a valorar cada sacrificio que hicieron para yo poder llegar hasta aquí, sin ellos el camino sería más largo y gris. Gracias por las oportunidades, el amor y los consejos aplicados, no sólo en el ámbito escolar. Como dice mi mamá “Hay enseñanzas que por más que quiera enseñarte sin dolor tu debes experimentarlas en carne propia” y realmente ha sido una de las enseñanzas que más me marco, por escucharme, aconsejarme y ser mi mejor amiga, gracias. Papá gracias por enseñarme que la vida no sólo se trata de estudiar, que siempre hay tiempo para todo, gracias por involucrarme en el mundo del deporte, cuando era niña tal vez lo veía como una obligación, pero ahora me doy cuenta de la importancia que tiene al aplicar un balance en esto llamado vida.

A mis hermanos, Wanda, Rubi y Howard porque son una de mis motivaciones y amores más grandes en la vida. Cada momento de felicidad, tristeza, enojo y demás los he compartido con ustedes y ese lazo tan grande que formamos se ha fortalecido día con día.

A mis amigos. Britani, Arleth, Pablo, Susana, Michel, Noé, Fer, Fany, Naye e Iván, porque ustedes son parte de mi familia. Mi vida escolar ha sido maravillosa. Por su brillo, por su amor y cariño, les estoy eternamente agradecida. Que dios los bendiga a ustedes y sus maravillosas familias.

A mis roomies, Fer, Astrid, Joce, Mariana, Karla, Diana, Luna, Abril, Alejandro, Paco, Milton, Romina, Felipe, Kenneth y Coeto, por sacarme de mi burbuja y enseñarme que la vida escolar no siempre es estudiar. Por compartirme de sus conocimientos, calidez, amor, alegría y su compañerismo, mi amistad esta para ustedes en cada momento que me necesiten,

aprendí muchas cosas de cada uno y realmente estoy muy feliz de coincidir en esta vida con ustedes, sé que Dios nos bendice con personas tan bonitas, pero realmente ustedes son extraordinarios. Que la vida este llena de bendiciones para ustedes.

Un agradecimiento especial a la Doctora Mayra Ruíz Reyes, porque sin ella no sería posible realizar esta tesis. Es una persona admirable y estoy muy agradecida, no sólo por brindarme orientación, apoyo, comprensión y sus conocimientos, sino también por brindarme la calidez de su corazón. Por ser como una amiga, me brindo su confianza y estoy tan feliz de que usted sea mi asesora, que dios la bendiga a usted y su familia. Siga impulsando a los alumnos como lo hizo con nosotros, es admirable y quiero que sepa que sus ánimos y palabras siempre las llevaré conmigo para mejorar.

Gracias a mi co-asesor de tesis el Doctor Manuel Sánchez Cantú, que a pesar del poco tiempo de conocerlo me brindo su confianza, apoyo y consejos para mejorar, realmente estoy agradecida.

A mis sinodales, el Doctor Pacheco y al Maestro Soto, por ser parte de mi jurado. Las observaciones, comentarios y apoyo emocional también fomentaron una mejora en mí, de verdad muchas gracias.

A mis profesores de licenciatura, de prepa y secundaria por todos los conocimientos que me transmitieron, los admiro y aprecio mucho. Se que al igual que yo más compañeros comparten la felicidad de tenerlos como profesores de la escuela y de la vida.

Por último, pero no menos importante agradecerme a mí, por el crecimiento, porque fui capaz de superar cada obstáculo, algunos no en el tiempo esperado, pero, siempre sin rendirme. Gracias a todos por cuidarme, por su apoyo, amor y comprensión, que dios bendiga a cada uno de ustedes. Gracias.

Resumen.

En este trabajo de tesis se desarrolló una adaptación de un consorcio microbiano para el tratamiento de vinaza, mediante una serie de pruebas experimentales orientadas a evaluar su capacidad de degradación. El estudio inició con la estimulación del crecimiento de los microorganismos, seguida de su caracterización fenotípica, determinación de la viabilidad microbiana y evaluación del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza mediante espectrofotometría Vis, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis modelo GENESYS 30.

Los inóculos se prepararon empleando fuentes de carbono, nitrógeno y de micronutrientes, con base en los protocolos descritos por Vega et al. (2023); Hernández et al. (2019).

Posteriormente, se realizó la caracterización fenotípica, mediante tinción de Gram para el conteo celular y como complemento la tinción con azul de metileno para la morfología celular, utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad microbiana, se determinó a través de mediciones de absorbancia en los rangos de 600 nm y 712 nm, parámetros comúnmente utilizados para estimar crecimiento celular según Camacho et al. (2010).

La determinación de sólidos suspendidos se efectuó con la finalidad de separar la biomasa microbiana por medio de una centrifugación en una centrifuga Labnet modelo HERMELE Z300.

Por último, la capacidad del consorcio microbiano para degradar la vinaza se evaluó considerando las variaciones en la intensidad de color en el rango 450 nm-455 nm, así como un barrido espectral de 325 nm-640 nm, con el propósito de identificar los picos característicos de la vinaza, esto de acuerdo con la literatura Padilha de Souza et al. (2015). Con estos resultados se calculó el rendimiento de los inóculos y el porcentaje de reducción de absorbancia, evidenciando la eficiencia del consorcio microbiano en el tratamiento de la vinaza.

Contenido

Introducción.	2
Objetivo general:.....	3
Objetivos particulares:.....	3
Hipótesis.....	3
Capítulo 1 Antecedentes.....	4
1.1 Agua.	5
1.2 Mezcal.	5
1.3 Tipos de Mezcal.	6
1.4 Proceso de elaboración de Mezcal.	7
1.4.1 Extracción del agave del campo.	8
1.4.2 Cocimiento.	8
1.4.3 Molienda.....	8
1.4.4 Fermentación.	9
1.4.5 Destilación	9
1.4.5 Envasado.....	10
1.4.6 Normas del proceso.	10
1.5 Residuales del mezcal.	11
1.6 Vinaza.....	11
1.7 Alternativas para uso o tratamiento de la vinaza.	13
1.8 Proceso biológico anaeróbico para el tratamiento de la vinaza.....	15
1.8.1 Inóculo	16
1.8.2 Interpretación de la digestión anaeróbica.....	17
1.9 Parámetros operacionales.....	19
1.9.1 Espectrofotometría UV-Vis.....	19
1.9.2 Tinción de Gram.	20
1.9.3. Tinción de azul de metileno.	22
1.9.4 Densidad celular	23
1.9.5 Grupos bacterianos Clostridium	25
1.9.6 Electrocoagulación.	25

1.9.7 Adaptación de consorcios y caracterización.	26
Capítulo 2 Metodología	27
2.1. Pruebas experimentales para estimular el crecimiento de microorganismos propios de la vinaza.	29
2.1.1 Preparación del inóculo.	29
2.1.2 Condiciones de mantenimiento.....	30
2.1.3 Pruebas vinaza cruda y diluida.	30
2.1.4 Evaluación de crecimiento microbiano.....	31
2.2. Determinación de las características fenotípicas.....	32
2.2.1 Tinción de Gram.	32
2.2.2 Tinción con azul de metileno.	33
2.2.3 Variaciones de pH	34
2.3 Determinación de viabilidad del inóculo.....	35
2.3.1 Conteo celular.	35
2.3.2 Densidad celular por determinación de absorbancia.	36
2.3.3 Determinación de sólidos suspendidos.	37
2.4 Determinación de la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza..	38
2.4.1 Determinación de la capacidad de degradación de vinaza.	41
Capítulo 3 Resultados.....	42
3.1 Pruebas experimentales para estimular el crecimiento de microorganismos propios de la vinaza.	43
3.2 Determinación de las características fenotípicas.....	45
3.2.1 Tinción de Gram y azul de metileno.....	46
3.3. Determinación de la viabilidad del inóculo.....	47
3.3.1 Densidad celular por determinación de Absorbancia	50
3.4 Determinación de la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza..	52
Conclusiones	58
Anexo A.	60
Bibliografía	61

Índice de Figuras

Figura 1.1 Centro Virtual de Información del Agua, 2017	5
Figura 1.2 Proceso de elaboración del mezcal	7
Figura 1.3 Destilación en ollas de barro.....	10
Figura 1.4 Esquema del proceso de digestión anaerobia.....	19
Figura 1.5 Estructura de la pared bacteriana de Gram positiva y negativa.	22
Figura 1.6 Cuadrícula cámara de Neubauer.....	25
Figura 2.1 Esquema de procedimiento a seguir en tesis	28
Figura 2.2 Procedimiento de tratamiento de las formulaciones.	31
Figura 2.3 Procedimiento con Microscopio óptico binocular marca Motic modelo BA310E	33
Figura 2.4 Tinción simple. Microorganismos teñidos con azul de metileno	34
Figura 2.5 Potenciómetro Hanna Instruments modelo HI 223.....	34
Figura 2.6 Conteo celular con cámara de Neubauer (Subía et al., 2018).....	36
Figura 2.7 Espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 30	37
Figura 2.8 Centrifuga Labnet modelo HERMELE Z300	38
Figura 2.9 Fuente de poder BK PRECISION 1550.....	41
Figura 3.1 Crecimiento celular en inóculos M1-M9.2.....	44
Figura 3.2 Acumulación de No. Células M1-M9.2.	49
Figura 3.3 Velocidades de crecimiento inóculos M1-M9.2.	50
Figura 3.4 Acumulación de sólidos suspendidos en inóculos M1-M9.2.....	52
Figura 3.5 Identificación de picos característicos inóculo M9 (325 nm-640 nm).....	53
Figura 3.6 Identificación de picos característicos inóculo M9R (325 nm-640 nm).....	53
Figura 3.7 Reducción de absorbancia porcentual en inóculos M1-M9.2.....	55
Figura 3.8 Remoción a 1 y 1.5 V en la muestra del inóculo Mss.	57

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Categorías del mezcal. (Nogales , 2017).....	6
Tabla 1.2 Normatividad aplicable al proceso de elaboración del mezcal (CIATEJ, 2014).....	10
Tabla 1.3 Alternativas: tecnologías de tratamiento.	13
Tabla 1.4 Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Rodríguez & Arenas, 2018).	22
Tabla 2.1 Formulaciones para la preparación del inóculo.	30
Tabla 3.1 Determinación de pH y temperatura inóculos M1-M9.2	43
Tabla 3.2 Crecimiento microbiano en inóculos M1-M6 y M9.2	43
Tabla 3.3 Monitoreo de pH (24h-168 h) en inóculos M1-M6 y M9.2.....	44
Tabla 3.4 Densidad celular para inóculos M1-M6 y M9.2.	45
Tabla 3.5 Identificación de Gram positivas en inóculos M1R, M6 y Mss.	46
Tabla 3.6 Velocidades de crecimiento M1-M9.2.	48
Tabla 3.7 Determinación de absorbancias y tasas de cambio en inóculos M1-M6 y M9.2.	51
Tabla 3.8 Determinación de rendimientos de sustrato degradado M1-M6 y M9.2.	55
Tabla 3.9 Monitoreo de pH y temperatura inóculo Mss.....	56
Tabla 3.10 Degradación de la vinaza antes y después del tratamiento en el inóculo Mss.	56

Introducción.

La vinaza es un residuo líquido generado por la industria, principalmente en el proceso de destilación en la producción de bioetanol, este presenta un pH bajo (≤ 3) y altos valores de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) ($3000-9000 \text{ mg/L}^{-1}$), por lo que, su descarga directa a cuerpos de agua impacta negativamente los ecosistemas acuáticos reduciendo la luminosidad del agua al aumentar su turbidez limitando la penetración de luz y afectando la fotosíntesis de las plantas acuáticas, alterando así la cadena alimentaria. Además, la vinaza fomenta el proceso de eutrofización, que se caracteriza por un incremento en la concentración de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo. Este fenómeno favorece el crecimiento excesivo de algas y microorganismos, lo que, a su vez, reduce la concentración de oxígeno en el agua y origina zonas muertas que son inhóspitas para otras formas de vida acuática (Zúñiga Cerón & Gandini Ayerbe, 2013).

El desequilibrio ecológico derivado de la eutrofización no solo afecta la biodiversidad acuática, sino que también puede desencadenar un aumento en las poblaciones de insectos y vectores, como mosquitos y otros organismos transmisores de enfermedades. Estos efectos combinados no solo alteran la salud de los ecosistemas acuáticos, sino que también tienen repercusiones directas sobre las comunidades humanas cercanas, aumentando el riesgo de enfermedades y afectando la calidad del agua utilizada para consumo.

En este sentido se han buscado alternativas que permitan minimizar el impacto ambiental relacionados con este efluente. Si bien, la digestión anaerobia se ha reportado como uno de los tratamientos más efectivos en la reducción de la DQO, la viabilidad de su implementación depende de contar con medios microbianos adaptados al efluente. Ante la variabilidad que presentan las características fisicoquímicas de la vinaza, debido a que estas dependen tanto del proceso como de la materia prima empleada para la producción de bioetanol, se presenta la necesidad de contar con un medio microbiano específico para el efluente a tratar.

Por lo que, ante la necesidad de contar con el medio microbiano específico surge la necesidad de desarrollar formulaciones de inóculos microbianos que promuevan su crecimiento y supervivencia en el efluente a tratar.

Objetivo general:

Determinar del efecto del enriquecimiento de fuente de carbono en la generación de un consorcio microbiano para el tratamiento de vinaza

Objetivos particulares:

1. Realizar pruebas experimentales para estimular el crecimiento de microorganismos propios de la vinaza empleando diferentes inóculos.
2. Determinar para cada inóculo las características fenotípicas de los microorganismos.
3. Determinar la viabilidad del inóculo para promover el crecimiento microbiano mediante conteo celular.
4. Evaluar la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza mediante determinación de la absorbancia por espectrofotometría Vis.

Hipótesis

“Añadir fuentes de carbono como glucosa o polisacáridos a inóculos microbianos, promueve el crecimiento de asociaciones microbianas obtenidas a partir de la vinaza mejorando su capacidad para la reducción de la absorbancia de vinaza.”

Capítulo 1 Antecedentes



“Incluso los residuos más oscuros del mezcal pueden transformarse en conocimiento, vida y solución; la ciencia encuentra valor donde otros solo ven desecho”

-Anónimo

1.1 Agua.

Elemento vital para la vida y el equilibrio ecológico. El agua cubre el 70% de la superficie del planeta; sin embargo, solo el 2.5% es agua dulce, y de esta, el 19% es utilizada por el sector industrial, Fernández (2012). En esta situación resulta preocupante, ya que los procesos industriales no solo demandan grandes volúmenes de agua, sino que también generan efluentes contaminantes que alteran su calidad, esto de acuerdo con información del Centro Virtual de Información del Agua, 2017, representado en la figura 1.



Figura 1.1 Centro Virtual de Información del Agua, 2017

1.2 Mezcal.

La palabra mezcal tiene su origen en vocablos de la lengua náhuatl metl que significa maguey e ixcalli que significa cocer. Estos dos términos dan lugar a la palabra mexcalli, cuya traducción literal es “maguey cocido” según López Nava et al., (2014). El maguey mezcalero es una planta de la familia de las amarilidáceas, de hojas largas y fibrosas de forma lanceolada, color verde azulado. Se aprovecha la piña o cabeza (tallo y base de sus hojas) para la elaboración de mezcal (SRE, 2011). De acuerdo con Patrón el uso del maguey ha sido importante antes y después de la conquista en pueblos indígenas siendo aprovechada para hilo de coser, hacer sogas, vestido, mantas y punzones (2015). De acuerdo con la NOM-070-SCFI-1994, bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones, el mezcal es una bebida alcohólica que se obtiene por destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, mismas que son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica (SCFI, 2016). Por tanto, el aprovechamiento del maguey ha sido muy extenso, siendo el principal uso para el sector agroindustrial. Su

producción consiste en cocer el núcleo de agave en hornos de piedra, seguido de una fermentación y destilación natural.

En los nueve estados de la República Mexicana con denominación de origen del mezcal, se producen anualmente cinco millones de litros de mezcal, de los cuales 4.5 millones (90%), son producidos en Oaxaca (CRM, 2019). Cada litro de mezcal producido artesanal o industrialmente genera, como subproducto de la fermentación y destilación del agave (Rodríguez & De la Cerna, 2017) entre 10 litros y 12 litros de vinaza de acuerdo con la literatura Beltrán et al., (2001).

1.3 Tipos de Mezcal.

De acuerdo con la (SRE, 2011) existen dos tipos de mezcal, el tipo I es mezcal 100% agave, mientras que el tipo II es Mezcal con un 20% de carbohidratos permitidos. Por otro lado, mencionamos que existen tres categorías de mezcal de acuerdo con el proceso específico utilizado de cocción del maguey: Mezcal, Mezcal Artesanal y Mezcal Ancestral (SCFI, 2016), Siendo las principales diferencias mostradas en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Categorías del mezcal. (Nogales, 2017)

PROCESO DE PRODUCCIÓN	MEZCAL	MEZCAL ARTESANAL	MEZCAL ANCESTRAL
Cocimiento	Hornos de pozo Autoclave para cabezas	Hornos de pozo Hornos elevados de mampostería	Hornos de pozo
Molienda	Tahona Molino egipcio o chileno Trapiche Desgarradora o tren de molinos	Mazo en canoa Tahona Molino chileno o egipcio Trapiche Desgarradora o tren de molinos	Mazo en canoa Tahona Molino chileno o egipcio
Fermentación	Recipiente de madera	Oquedades en piedra, tierra o tronco.	Con fuego directo en olla de barro y

	Piletas de mampostería	Piletas de mampostería	de montera de barro o madera.
	Tanques de acero inoxidable	Recipiente de madera o barro	
		Pieles de animal, cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey (bagazo)	
Destilación	Alambiques Destiladores continuos Columnas de cobre o acero inoxidable	Con fuego directo en alambiques de caldera de cobre u olla de barro, madera, cobre o acero inoxidable.	Con fuego directo en olla de barro y montera de barro o madera; cuyo proceso debe incluir la fibra del maguey (bagazo) Cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey (bagazo)

1.4 Proceso de elaboración de Mezcal.

La elaboración del mezcal tiene 6 etapas: extracción del agave del campo, cocción, molienda, fermentación, destilado y el envasado del producto (véase Figura 1.2) (Mezcalunion, 2025).



Figura 1.2 Proceso de elaboración del mezcal

Mencionando que de acuerdo con la NOM-251-SSA1-2009 se debe cumplir con las prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios (SSA1, 2009) y

la NOM-005-SEMARNAT-1997, la cual establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de vegetación forestal y tiene como objetivo el aprovechamiento sostenible de poblaciones rurales (SEMARNAT, 1997).

1.4.1 Extracción del agave del campo.

Para la elaboración del mezcal, menciona Gschaedler que solo se aprovecha la “piña” o cabeza que conforma el cuerpo de la planta sin las hojas (sf).

Principalmente se realiza de acuerdo con el grado de madurez (CIATEJ, 2014), los productores lo asocian con la edad de la planta. Además, Gschaedler menciona que los productores estiman entre 6 y 10 años para la edad óptima de la cosecha del agave (sf), siendo algunas evidencias la coloración de la hoja, ejemplo: la del *Agave cupreata*, las hojas comienzan a ensancharse y adquirir forma de romboide, siendo de una coloración más clara (CIATEJ, 2014). Una vez que la planta de agave se encuentra madura, la piña se debe de jimar, es decir, las hojas del agave se deben cortar para dejar la piña limpia para obtener el mezcal (Mastranzo, 2023).

1.4.2 Cocimiento.

De acuerdo con la NOM-070-SCFI-2016, la cocción involucra el cocimiento de cabezas o jugos de maguey en hornos de pozo, mampostería o autoclave (SCFI, 2016). De acuerdo con la literatura Gschaedler menciona que este proceso se lleva a cabo en una cavidad hecha manualmente en el piso “horno”, siendo las dimensiones de 5.0 y 12.0 metros de diámetro con una profundidad de 2.0 a 4.0 metros, siendo la capacidad de entre 6 y 30 toneladas (sf). Las cabezas de agave, que son ricas en fructanos, se cuecen en hornos o autoclaves tradicionales para hidrolizarlos y liberar los azúcares fermentables (monómeros u oligosacáridos con menores grados de polimerización), principalmente fructosa, glucosa, xilosa y maltosa, esto de acuerdo con Cuello et al. (2018). Es decir, la hidrólisis permitirá descomponer los carbohidratos complejos del agave en azúcares simples como los mencionados anteriormente.

1.4.3 Molienda

La molienda se realiza de diferentes formas: macerado a mano, machacado en una tahona (molino que funciona por la fuerza de caballos o mulas), o en una desgarradora apoyándose

además con una prensa. Al terminar la molienda se obtiene el jugo llamado mosto y el bagazo; el mosto es depositado o bombeado a las tinas de fermentación (SRE, 2011).

1.4.4 Fermentación.

Los jugos obtenidos de la molienda son diluidos y puestos en reposo para inducir la fermentación, es aquí donde, los azúcares son transformados en alcohol. (CIATEJ, 2014). El mosto de agave puede fermentar con la microbiota natural o inocularse con levadura de panadería o comercial de las industrias de bebidas alcohólicas (Ruiz, s.f.). Para lograr una fermentación efectiva, se consideran variables de proceso como: la temperatura, la relación materia prima: levadura y el tiempo de fermentación (Mastranzo, 2023). Es relevante mencionar que en la etapa de fermentación se desarrollan microorganismos como hongos (levaduras) y bacterias que se alimentan del azúcar del maguey, transformándola en alcohol (en este proceso una molécula de azúcar se desdobra en dos de alcohol) (CIATEJ, 2014). Es así como se hace mención de que la fermentación del mosto es realizada por levaduras *No-Sachcaromyces* y *Sacharomyces*, pero también aislado de bacterias lácticas y *Zymomonas mobilis* (bacteria anaerobia Gram negativa), siendo el principal producto de la bebida el etanol por la fermentación de los azúcares mediante microorganismos añadidos o naturales (Ruiz, s.f.).

1.4.5 Destilación

Es la fase mediante la cual se realiza la separación de los alcoholes contenidos en el mosto fermentado una vez sometido al calentamiento, evaporación y condensación, empleando para ello un alambique obteniéndose el mezcal (CIATEJ, 2014). Es decir, en esta operación se efectúa la separación del alcohol, aprovechando para ello sus diferentes puntos de ebullición. Al producto obtenido se le conoce como mezcal de primera destilación (SRE, 2011). Los compuestos del mezcal se destilan en diferentes tipos de recipientes. Los productores rurales pueden usar ollas de barro como se muestra en la Figura 3 (Mezcaloteca, 2021), mientras que los productores industriales o semiindustriales utilizan recipientes de cobre donde se lleva a cabo el calentamiento (Ruiz, s.f.).

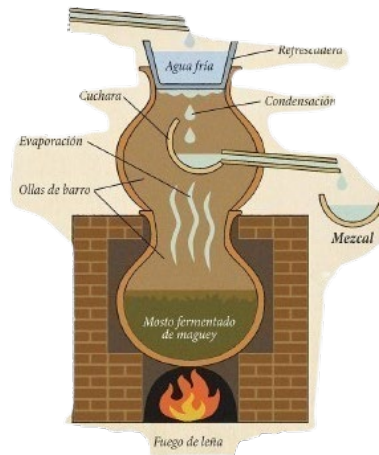


Figura 1.3 Destilación en ollas de barro

1.4.5 Envasado.

El producto final, se almacena para cualquiera de los tipos indicados en la norma NOM-070-SCFI-2016, o se destina directamente al envasado (SCFI, 2016). De requerirse ajustar el grado alcohólico se deberá utilizar agua bidestilada conforme a la norma mexicana NMX-V-013-NORMEX-2019, que establece los métodos de ensayo para la determinación del contenido alcohólico (NORMEX, 2019) (por ciento de alcohol en volumen a 20°C) expresado en % Alc. Vol. en bebidas alcohólicas y muestras del proceso de elaboración (CIATEJ, 2014)

1.4.6 Normas del proceso.

Durante la ejecución del proceso de elaboración del mezcal se siguieron las normas presentadas en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Normatividad aplicable al proceso de elaboración del mezcal (CIATEJ, 2014).

Proceso	NOM	NMX
Cocimiento	NOM-012-RECNAT-1996	
	NOM-120-SSA1-1994	
	NOM-017-STPS-2008	
Molienda	NOM-120-SSA1-1994	
	NOM-017-STPS-2008	

Fermentación	NOM-070-SCFI-1994	
	NOM-120-SSA1-1994	
	NOM-017-STPS-2008	
Destilación	NOM-070-SCFI-1994	NMX-004-NORMEX-2013
	NOM-120-SSA1-1994	NMX-005-NORMEX-2013
	NOM-017-STPS-2008	NMX-006-NORMEX-2013
	NOM-142-SSA1-1995	NMX-013-NORMEX-2005
	NOM-251-SSA1-2009	NMX-015-NORMEX-2006
		NMX-017-NORMEX-2005
Envasado	NOM-070-SCFI-1994	
	NOM-120-SSA1-1994	
	NOM-142-SSA1-1995	
	NOM-017-STPS-2008	
	NOM-002-SCFI-2011	

1.5 Residuales del mezcal.

De acuerdo con la literatura, en el proceso de producción del Mezcal se generan dos tipos de residuales uno de ellos líquido, que se origina en el proceso de destilación y el otro sólido, conocido como bagazo el cual se genera durante la fermentación y destilación del maguey (Pérez, 2021).

El bagazo se obtiene después de que las piñas de agave son troceadas, cocidas, enjugadas y exprimidas para extraer los azúcares fermentables para la elaboración de mostos de agave (Mastranzo, 2023). Este consiste en manojos de fibras húmedas compuestas por celulosa y hemicelulosa, que funcionan para almacenar moléculas y por lignina, que le dan sostén al cuerpo de la planta (Pérez, 2021).

1.6 Vinaza

Este es uno de los residuales orgánicos de mayor efecto contaminante sobre la flora y fauna Camacho et al., (2018). Además, se caracteriza por ser un líquido de color café y olor dulce (CONADESUCA, 2016). La vinaza puede ser considerada una suspensión de sólidos orgánicos y minerales que contienen altas concentraciones de compuestos que dan color al efluente y tienen baja biodegradabilidad como melanoidinas, caramelos y compuestos

fenólicos (ácidos húmicos y tánicos) esto de acuerdo con A et al., (2021). Además, Camacho menciona que las características de la vinaza dependen directamente del proceso de obtención de alcohol y del tratamiento que se realice para separar el alcohol de la melaza ya fermentada (2018). Otros factores que influyen en su composición son las especies de levadura utilizadas, la relación fondaje-vinaza y de la materia prima utilizada en la destilación.

Las vinazas de mezcal presentan elevadas concentraciones de materia orgánica, *DQO*: 35,000 *mg/l* – 122,000 *mg/l*, conductividad eléctrica (2.6 *mS/cm* -5.81*mS/cm*), sólidos totales (45,000 *mg/l* – 96,000 *mg/l*), acidez (*pH* 3.5 – 4.5) y una temperatura de descarga elevada (70°C a 90 °C). En los nueve estados de la República Mexicana con denominación de origen del mezcal, se producen anualmente cinco millones de litros de mezcal, de los cuales 4.5 millones (90%), son producidos en Oaxaca (CRM, 2019). Cada litro de mezcal producido artesanal o industrialmente genera, como subproducto de la fermentación y destilación del agave (Rodríguez & De la Cerna , 2017) entre 10 litros y 12 litros de vinaza Beltrán et al., (2001). Lo que indica que, se vierten al medio ambiente anualmente y sin tratamiento alguno, entre 45 y 54 millones de litros de vinazas, este residuo proveniente de la destilería puede variar de acuerdo con la materia prima utilizada para la fermentación y pueden ser almidones, cereales, melazas, jugo de caña, así como, productos que contengan unidades de glucosa, de ahí la importancia de su caracterización. En la tabla 1.3 del Anexo A, se muestra una síntesis de la composición de vinaza reportada por varios autores, de los cuales se destaca que los que se encuentran en mayor cantidad son: potasio (1542mg/l a 3961 mg/l), nitratos (499 mg/l), etanol (2.2 g/l), magnesio (343mg/l a 669 mg/l) y los sólidos totales (28,000mg/l a 133, 833 mg/l).

Como se observa en la **Tabla 1 del Anexo A**, las sustancias que conforman la vinaza presentan propiedades, como la acidez, que puede dificultar la selección de los medios de control, esto en parte debido a los almacenados en contenedores metálicos, a causa de que se pueden provocar fugas de vinaza al medio ambiente (CONADESUCA, 2016). Así mismo, al presentar alta *DQO* (Demanda Química de Oxígeno) y alta *DBO* (Demanda biológica de oxígeno) promueven la degradación de los mantos freáticos, disminución de la luminosidad de las aguas y reducción de la actividad fotosintética (Zúñiga Cerón & Gandini Ayerbe,

2013). Además, la producción de eutrofización del agua aumento la población de insectos y vectores para el desarrollo de enfermedades y desarrollo normal de peces que ha sido reportada en la literatura (Caputo, 2020). De acuerdo con Dávila, son éstas algunas de las razones por las que la vinaza es catalogada como un subproducto líquido que impacta negativamente en el ambiente y especialmente en el recurso hídrico (2019).

1.7 Alternativas para uso o tratamiento de la vinaza.

La eliminación o reutilización de la vinaza hoy en día es una necesidad por resolver en la producción y gestión de la vinaza. La vinaza se puede utilizar en numerosos productos, como la alimentación animal, combustible, material de construcción y producción de biogás (Montiel Rosales , 2022); Parsaee et al., (2019); Almeida y Rizzato, 2022.

Sin embargo, es fundamental incentivar el uso de estas tecnologías en las zonas donde se produce la vinaza, para evitar el transporte y el riesgo de accidentes. Dado su potencial de causar impactos negativos, el desarrollo de tecnologías de control de contaminación de la vinaza se enfoca en la aerobiosis, y el reciclaje mediante técnicas de fermentación y fertiirrigación, las cuales se pueden utilizar a gran escala, mientras que la combustión de vinaza, la producción de levadura, la construcción, la producción de alimentos para el ganado anaeróbica, la incineración, se encuentran en diferentes etapas de desarrollo e investigación. La Tabla 1.3 resume las ventajas y desventajas de las alternativas presentadas.

Tabla 1.3 Alternativas: tecnologías de tratamiento.

Tecnologías	Uso	Objetivos	Ventajas	Desventajas
Evaporación al vacío	Fertilizante orgánico	Reducción de volumen de sub-productos (fertilizantes)	Reducción del volumen de residuos Reutilización del agua recuperada Menor impacto ambiental	Equipo costoso Posibles problemas de corrosión

			integración energética		
Reciclaje reúso de Vinaza	o Alimento de de ganado	Mejorar las zonas de cultivo con bajos contenidos en sales, potasio y MO. Reducción del requerimiento de agua de proceso. Obtención de nuevos productos como complementos alimenticios en la ganadería.	de	Recuperación de nutrientes Reducción de la contaminación contaminación de	Costoso Posible contaminación Calidad del producto final
Secado de la Vinaza	Fertilizante orgánico	Posibilidad de integración energética Producción de fertilizantes	de	Reducción de volumen de residuos Obtención de un producto valorizado	Alto consumo energético Costoso
Biodigestión	Producción de nutrientes Generación de energía	Reducir hasta un 70% DQO y 90% DBO Capacidad (volumen) de trabajo de hasta 100% Alta generación de gas, $0.45m^3 /$ $kg_{DQO}-0.55 m^3 /$ kg_{DQO}	de	Generación de energía renovable Reducción de emisiones Fertilizante natural	Tratamiento lento Dependencia de condiciones operativas Es necesario contar con consorcio microbiano especifico

Reducción de insumos.

Fuente: Cortez et al. (1992). (Cortéz, 1992).

El tratamiento adecuado de la vinaza es uno de los principales desafíos debido a los grandes volúmenes generados en los procesos productivos de etanol. La fertirrigación es uno de los métodos más utilizados para la disposición final de la vinaza, que consiste en la aplicación directa de las aguas residuales en el suelo, con el fin de reciclar agua y nutrientes para los cultivos esto de acuerdo con Díaz et al., (2002). Por otro lado, Christofolletti menciona que a pesar de presentar ventajas como la aplicación rápida, no requerir tecnologías complejas, aumentar el rendimiento agrícola y el reemplazo de fertilizantes químicos (2013), la aplicación continua y de gran volumen puede causar impactos negativos. La salinización del suelo, la acidificación de los cuerpos de agua, la lixiviación de compuestos tóxicos en las aguas subterráneas, las emisiones de gases de efecto invernadero, la liberación de olores desagradables, el desequilibrio de nutrientes se encuentra entre las desventajas de la práctica inadecuada de la fertirrigación (Fuess & Garcia , 2014).

Debido a que la vinaza contiene alta carga orgánica biodegradable mayormente conformada por sólidos volátiles, los procesos biológicos anaerobios se presentan como una alternativa viable para su tratamiento (Fuess & Garcia , 2014), teniendo como productos finales ácidos grasos volátiles, metano o hidrógeno. En donde se puede lograr la reducción de la carga orgánica y el aprovechamiento de recursos generados por el proceso. Sin embargo, la implementación de estas tecnologías en las zonas donde se produce la vinaza requiere de un inóculo adecuado y parámetros operacionales que permitan la operación estable y recuperación de productos finales. Si bien, el tipo de inóculo influye en la producción, su comportamiento depende de los parámetros operacionales y tipo de sustrato, por lo que su estudio es relevante y específica para cada tipo de cultivo y en este caso las características de la vinaza.

1.8 Proceso biológico anaeróbico para el tratamiento de la vinaza.

Se ha mencionado que este proceso se presenta como alternativa que puede convertir la carga orgánica en biometano, biohidrógeno y ácidos grasos volátiles, pero que en su

mayoría este proceso es utilizado para reducir la carga orgánica y al tener ventaja en la eficacia de remoción de materia orgánica, conversión en nuevos recursos y baja producción de lodos es la opción más factible.

1.8.1 Inóculo

Un inóculo puede estar compuesto por un consorcio de diversas especies microbianas, como las presentes en los lodos aerobios o anaerobios de las plantas de tratamiento de aguas residuales. También puede tratarse de cultivos específicos de microorganismos con afinidad por un compuesto, los cuales pueden conseguirse comercialmente o en los laboratorios de centros de investigación en contaminantes esto de acuerdo con Mora et al., (2005).

Por su parte, el medio microbiano es una mezcla de nutrientes que permiten el crecimiento bacteriano. De acuerdo con UnADM (2011), estos deben contener agua (H_2O), *carbono (C)*, *nitrógeno (N)*, *azufre (S)*, entre otros elementos.

Una alternativa comúnmente utilizada es la adaptación de consorcios microbianos a partir del propio efluente. Empleando el mismo sustrato, pero variando tanto el tipo de inóculo como temperatura, es posible obtener distintos niveles de eficiencia en la degradación.

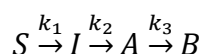
En la literatura se han reportado diferentes rangos de temperatura para la producción de gas a partir de sólidos volátiles: mesófilo (30 °C), termófilo (50-60°C) e hipertermófilo (>65°C). Las condiciones mesófilas suelen ofrecer mayores rendimientos en la degradación de DQO, mientras que las termófilas favorecen una mayor eficiencia de biogás, especialmente cuando el efluente contiene materiales complejos provenientes de desechos agrícolas Ramos et al., (2018), Santos et al., (2014).

Existen tres tipos de adaptación de consorcios microbianos. El primero corresponde a los microorganismos nativos del agua residual, como los del género *Clostridium*, los cuales, según Echeverriborda et al., (2022), fermentan compuestos complejos como carbohidratos, proteínas y lípidos. El segundo tipo incluye a los microorganismos activados en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y adaptados a nuevos efluentes. Finalmente, el tercer tipo corresponde a asociaciones microbianas adaptadas a condiciones particulares del proceso.

Por tanto, la selección y adaptación del inóculo microbiano es relevante, ya que su origen y condiciones de operación influyen de manera directa a la eficiencia de degradación de vinaza y en la producción de biogás.

1.8.2 Interpretación de la digestión anaeróbica

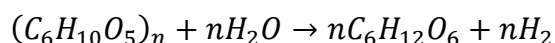
Las tres reacciones irreversibles en serie se pueden expresar conceptualmente como:



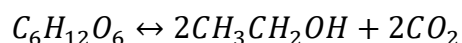
En donde S es la parte digerible del lodo o sólidos presentes. En el caso de los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales, del porcentaje de sólidos volátiles medidos, el 19% es no degradable (Lafratta y otros, 2021) ; por lo tanto, esta fracción debe tenerse en cuenta y, por lo tanto, se descuenta en el cálculo de S. I representa los principales compuestos producidos en la hidrólisis, como aminoácidos, azúcares y ácidos grasos volátiles. A es el ácido acético, el cual es el sustrato de la metanogénesis en la producción de biogás. B es el biogás producido. Esta representación se basa en reacciones de isomerización reversibles en serie. En esta representación se considera que las tres reacciones son de primer orden. La cinética de primer orden es la más comúnmente aplicada para la etapa de hidrólisis de la digestión anaerobia (Lafratta y otros, 2021). Sin embargo, si bien diferentes autores han utilizado diferentes cinéticas para modelar los subprocesos en la digestión anaerobia, la cinética Monod sigue siendo la más empleada.

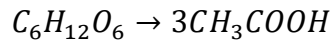
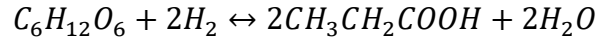
Anukam menciona que el proceso de digestión anaeróbica se desarrolla en cuatro etapas clave: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (2019) . La química de estas cuatro etapas se describe a continuación:

Hidrólisis. En esta etapa existe la ruptura de enlaces químicos mediante la adición de agua, esto debido a que, al reaccionar cationes y aniones con el agua, se ve alterado el pH para crear ruptura de los enlaces H-O.

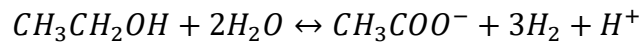
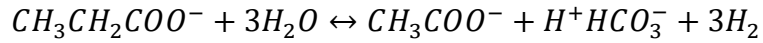


Acidogénesis. En esta etapa ocurre la fermentación y los compuestos solubles formados en la etapa anterior se degradan y convierten en CO_2 y H_2 .

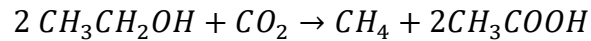
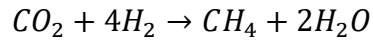
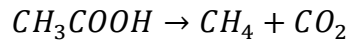




Acetogénesis. Es considerada la etapa de deshidrogenación, ya que el producto de desecho de la acetogénesis es el gas H_2 .



Metanogénesis. Es la cuarta etapa de la digestión anaerobia, en esta etapa las bacterias convierten el CH_3COOH y el H_2 en CH_4 y CO_2 .



De esta manera se llega al esquema descrito por Fernández et al. (2016). que refleja lo explicado anteriormente (véase Figura 1.4)

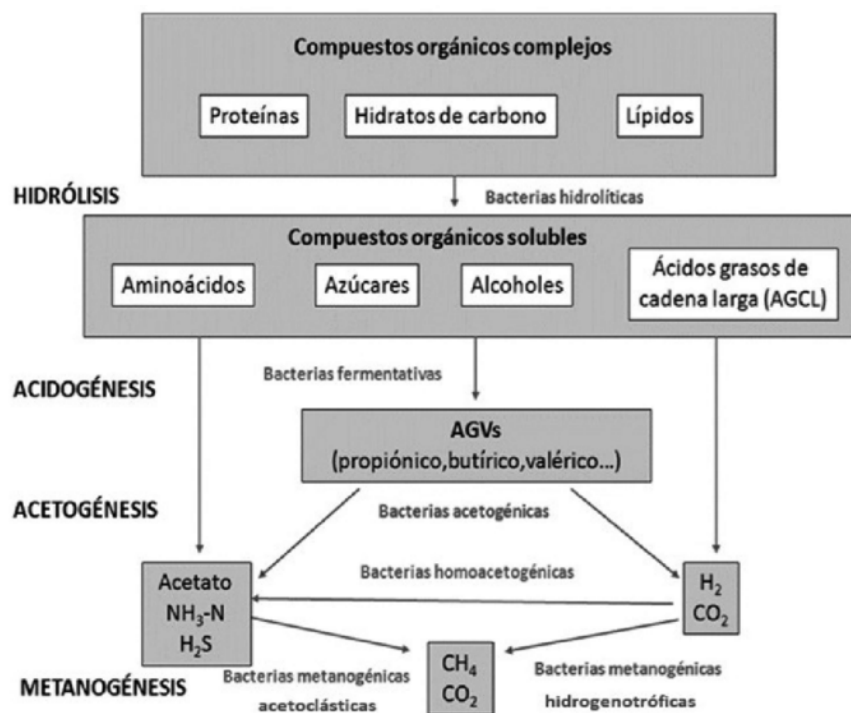


Figura 1.4 Esquema del proceso de digestión anaerobia.

1.9 Parámetros operacionales.

Para evaluar el efecto de las variables operativas en el desempeño del proceso se requiere implementar técnicas analíticas e instrumentales para determinación de las variables de respuesta, dentro de las técnicas mayormente empleadas para caracterización de efluentes y medio microbiano se encuentran:

- Espectrofotometría UV-Vis
- Tinción de Gram

1.9.1 Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría UV-Vis, es una técnica ampliamente utilizada para la identificación de compuestos. En este sentido, diversos estudios destacan el uso de espectrofotometría en la región visible y región UV para evaluar el desempeño de los procesos de tratamiento de vinaza mediante el seguimiento de la variación de la absorbancia y el cálculo del porcentaje de reducción de la Absorbancia (Ec. 1) logrado en cada proceso.

$$\% \text{ de Reducción}_{Abs} = \left(\frac{Abs_o - Abs}{Abs_o} \right) * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

En donde, Abs_o es la absorbancia inicial y, Abs es la absorbancia después del tratamiento.

Las longitudes de onda empleadas para las determinaciones varían en función del objetivo del estudio. Dentro de los cuales podemos mencionar mediciones de variación de intensidad de color a 450 nm-455 nm. (Del Gobbo L. y otros, 2023; Wei-Chin y otros, 2022; C. Battisti y otros, 2019), mientras que en otros estudios (Padilha de Souza, y otros, 2016), se determina el porcentaje de reducción de la absorbancia a 254 nm (región alofática), 284 nm (grupos aromáticos como fenoles), 310 nm (anillos aromáticos conjugados) y 500 nm (moléculas que absorben luz visible).

Particularmente, entre los 450nm-455 nm se destacan las melanoidinas, compuestos responsables de la coloración oscura asociada a la etapa final de la reacción de Maillard. (Del Gobbo L. y otros, 2023; Wei-Chin y otros, 2022; C. Battisti y otros, 2019).

En el caso de las vinazas, los compuestos fenólicos presentes provienen de la degradación de las fibras del jugo del bagazo. Su toxicidad para organismos acuáticos, incluso a bajas concentraciones, ha llevado a clasificarlos como contaminantes prioritarios (Aviña Ruelas y otros, 2023).

Por tanto, el análisis de la absorbancia en este rango permite no solo identificar la presencia de melanoidinas, sino también evaluar la eficiencia de procesos de tratamiento al observar una posible disminución en su concentración.

Por lo mencionado la espectrofotometría UV-vis permite evaluar la eficiencia de los tratamientos que se espera sean aplicados a la vinaza, siendo el resultado la reducción de las absorbancias en longitudes de onda referentes a los compuestos orgánicos

1.9.2 Tinción de Gram.

En un sistema de tratamiento de efluentes, el tratamiento secundario o también llamado tratamiento biológico, tiene como objetivo la reducción de DBO y DQO. Gracias al desarrollo de ecosistemas de diferentes tipos de bacterias este tipo de sistemas pueden lograr rendimientos de hasta el 95%. Este objetivo principal se logra mediante tres pasos fundamentales:

1. Transformar y disolver componentes biodegradables en productos finales aceptables.
2. Capturar e incorporar sólidos coloidales no sedimentables a un floculo biológico, también llamado biopelícula.
3. Transformar o remover nutrientes como nitrógeno y fósforo.

Sin embargo, conocer las características de la biomasa que predomina o se ha logrado adaptar al efluente a tratar es relevante. En este sentido, la Tinción de Gram permite diferenciar dos grandes dominios de especies bacterianas: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Sandle, 2021). Además, permite la caracterización fenotípica de estas por su tamaño y morfología celular (Leber, 2016). El procedimiento que desarrolló Hans Christian Gram, ahora llamado tinción de Gram, demostró dos categorías generales de bacterias que causaban neumonía: algunas se teñían de violeta y otras se teñían de rojo. Las bacterias teñidas de azul fueron conocidas como Gram positivas, y las teñidas de rojo como Gram negativas. Pero fue hasta 1963 cuando M.R.J. Salton explicó el mecanismo de diferenciación de la técnica de Gram. La tinción de Gram diferencia a las bacterias en dos grandes grupos. Se llama bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina. Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias (véase Tabla 1.4). Corrales et al., (2013), destacó que las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración (véase Figura 1.5).

En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración. La tinción de Gram puede proporcionar información rápida para diagnósticos de infecciones, puede revelar los agentes causales incluso con una toma de muestra no adecuada. También hace posible distinguir entre contaminación de la muestra y una verdadera infección. Puede ayudar al clínico a seguir o cambiar un tratamiento antibiótico inicial antes de los resultados del cultivo, y en algunos casos, es capaz de mostrar la necesidad de una atención médica urgente (Rodríguez & Arenas, 2018).

Tabla 1.4 Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Rodríguez & Arenas, 2018).

	Bacterias Gram +	Bacterias Gram -
Color de la tinción de Gram	Violeta	Rojo
Pared Celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en pared celular	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Presente	Ausente

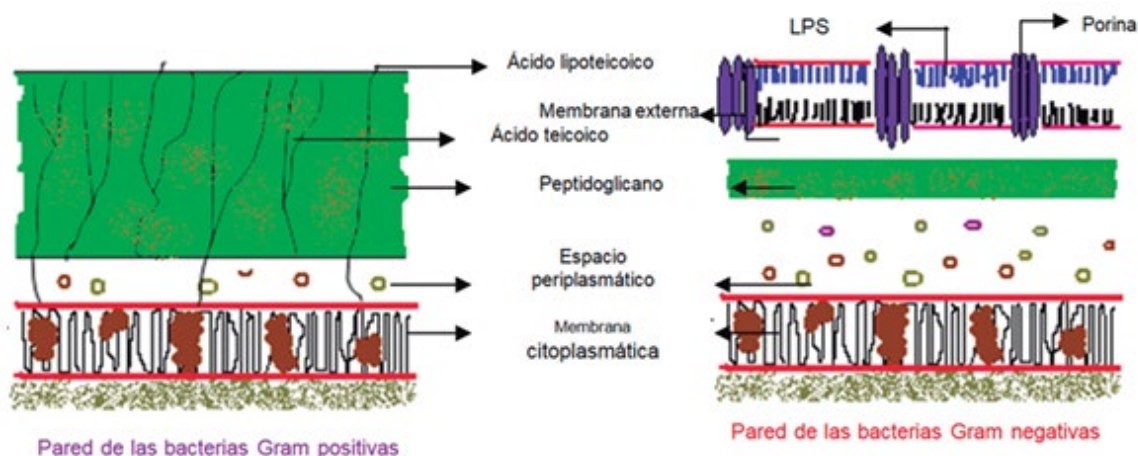


Figura 1.5 Estructura de la pared bacteriana de Gram positiva y negativa.

Para este trabajo de tesis, además de la información fenotípica que puede otorgar esta técnica nos ayuda a identificar la necesidad de oxígeno en el sistema de reacción, ya que, las bacterias Gram positivas son anaerobias obligadas, en cambio, un gran grupo de bacterias aerobias que toman color rosado (Gram negativas). Es así como se menciona que la clave para la reducción eficiente de la DBO y DQO son las comunidades bacterianas, así mismo, es de suma importancia conocer las características de la biomasa microbiana para una mejor adaptación al efluente.

1.9.3. Tinción de azul de metileno.

La tinción de azul de metileno también conocida como Loeffler es una técnica simple que es utilizada para fines diversos, tales como la determinación de la morfología bacteriana. De

acuerdo con la literatura también es utilizada como complemento de la tinción de Gram, especialmente para la tinción de bacterias Gram-negativas, como las especies de *Neisseria*, esto de acuerdo con Constanza et al., (2019).

Por su parte, González et al., (2020) menciona que esta técnica es empleada para la observación de los gránulos metacromáticos en las bacterias, es decir, inclusiones citoplasmáticas que sirven como reserva energética y de fosfato.

Así mismo, Constanza et al., (2019), menciona que el azul de metileno permite distinguir estructuras que resultan poco visibles con la tinción de Gram, como revelar la morfología de las bacterias fusiformes (delgadas y largas) y espiroquetas (en forma de espiral). Este colorante tiñe los gránulos de un azul intenso mientras que el resto de las células adquiere un tono azul claro. De acuerdo con diversos autores, el tiempo de exposición al reactivo varían de 3 minutos a 5 minutos dependiendo de la cepa utilizada González et al., (2020).

La importancia de la técnica radica en su uso como herramienta complementaria de la tinción de Gram, ya que permite una mejor visualización de ciertas estructuras bacterianas que, de otro modo, podrían pasar desapercibidas, facilitando así una identificación más precisa de la morfología bacteriana, así como la viabilidad microbiana.

1.9.4 Densidad celular

El crecimiento de una población bacteriana puede ser entendido desde diferentes perspectivas y de acuerdo con éstas se puede llegar a determinar la medida del crecimiento mediante metodologías. Para algunos, es la capacidad para multiplicarse que tienen las células individuales, esto es iniciar y completar una división celular. De esta forma, se considera a los microorganismos como partículas discretas y el crecimiento es entendido como un aumento en el número total de partículas bacterianas. Para otros, el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias debido a que sólo se tiene en cuenta el número de microorganismos viables, esto es capaces de crecer indefinidamente. Para bacterianos, bioquímicos los fisiólogos y biólogos moleculares una medida del crecimiento es el incremento de biomasa. Para ellos, la síntesis macromolecular y un incremento en la capacidad para la síntesis de los componentes celulares es una medida del crecimiento. Para este grupo la división celular es un proceso esencial pero menor que

rara vez limita el crecimiento, ya que lo que limita el crecimiento es la capacidad del sistema enzimático para utilizar los recursos del medio y formar biomasa esto de acuerdo con la literatura consultada Ramírez et al., (s.f.).

El recuento celular mediante microscopía óptica es la técnica más utilizada para estimar la densidad celular, ya que es un método sencillo y poco costoso (económicamente hablando). Sin embargo, es un método que resulta algo tedioso en su faceta instrumental (Gallego Albiach & Pérez Igualada, Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento).

Ahora bien, para calcular la densidad celular se emplea la Ecuación 2 (Gallego Albiach & Pérez Igualada).

$$Densidad = \frac{Número\ de\ células\ contadas}{(Superficie\ de\ conteo\ (mm^2) \times Profundidad\ (mm) \times Dilución)} \quad Ec. 2$$

Mencionando que para realizar el conteo se utiliza la cámara de Neubauer, siendo este un dispositivo utilizado en los laboratorios para realizar el recuento de células en un volumen conocido de una muestra líquida. Consta de una cuadrícula de 9 cuadros y cada cuadrado grande contiene 16 cuadrados más pequeños. Estos cuadrados más pequeños están divididos en 25 cuadrículas más pequeñas, lo que resulta en un total de 400 cuadrículas (véase Figura 1.6). Virrueta et al., (2023), describe que cada una de estas cuadrículas tiene una profundidad precisa y conocida, lo que permite el cálculo del volumen de muestra contenida en cada cuadrícula.

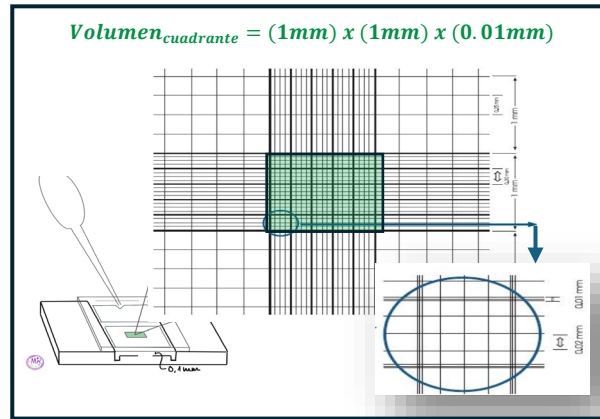


Figura 1.6 Cuadrícula cámara de Neubauer

1.9.5 Grupos bacterianos Clostridium

Es un género de bacterias anaerobias formadoras de esporas termorresistentes, que en ausencia de oxígeno y poca acidez germinan y producen toxinas. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el medio ambiente. Por ello, pueden transmitirse a una gran diversidad de alimentos, tanto crudos como transformados (conservas, fermentados, ahumados, envasados, etc.). Se encuentran dentro de la clasificación de anaeróbicos estrictos. Estos organismos son potencialmente capaces de producir hidrógeno adicional mediante la re-oxidación del NADH generado durante la glucólisis, hasta dos moléculas adicionales de H₂ pueden generarse por esta ruta (Rodríguez Cortés , 2016).

1.9.6 Electrocoagulación.

El método que consiste en inducir corriente eléctrica en el agua residual a través de placas metálicas paralelas de diversos materiales puede resultar eficaz en la decoloración de la vinaza, dado a que su coloración marrón oscura característica se debe a su alto contenido de taninos, ácidos húmicos, caramelos y melanoidinas, que son producidos por la reacción de Maillard menciona Gamboa et al., (2011), además, ocurre entre azúcares y proteínas en el proceso de producción de etanol, y que debido a que estos compuestos tienen propiedades recalcitrantes y antimicrobianas, el proceso de electrocoagulación puede ser una recomendación para realizarse un tratamiento previo y así potenciar el tratamiento biológico del efluente y crecimiento de biomasa indica Montaña et al., (2019). Con lo anterior se puntualiza que la electrocoagulación tiene un enfoque prometedor para la neutralización de

la vinaza y el posterior tratamiento biológico, en particular porque es difícil encontrar métodos de neutralización del pH que no agreguen iones contaminantes.

1.9.7 Adaptación de consorcios y caracterización.

De acuerdo con un estudio realizado se menciona que un consorcio de microorganismos nativos de aguas residuales son una fuente viable para crear una cepa microbiana capaz de reducir bajas y altas cargas orgánicas, además el tipo de tratamiento biológico elegido es el ideal para el proceso de bioestimulación del consorcio de microorganismos, dando lugar a su rápida adaptación, esto de acuerdo con García et al., (s.f.). Hay que mencionar que el uso de consorcios presenta desafíos especialmente relacionados a la estabilidad del proceso, pero que se ofrece menor susceptibilidad a la contaminación por bacterias consumidoras de H_2 y Oxígeno. Así mismo, Wall y colaboradores mencionan que una comunidad microbiana diversa es más adaptable a la variación del sustrato debido a la presencia de rutas metabólicas alternativas capaces de desarrollar una red alimentaria donde grupos específicos de organismos mantienen una baja concentración de productos intermedios críticos y promueven el flujo de carbono y electrones desde la materia prima hasta el producto deseado (2008). Así es como se resalta que la adopción de consorcios microbianos es importante ya que estos pueden desarrollarse a partir de microorganismos nativos de aguas residuales, lo que les permite enfrentar bajas cargas orgánicas.

Capítulo 2 Metodología



“La paciencia es amarga,
pero el fruto es dulce”

-Aristóteles

La metodología de este trabajo de tesis está dividida, dividido en cuatro etapas, cada una de ellas responde a los objetivos específicos del estudio y permite abordar, de manera progresiva, el análisis del efecto de la fuente de carbono en la generación del consorcio microbiano. La metodología combina técnicas clásicas con herramientas modernas, garantizando una investigación rigurosa. Como ya se mencionó, la estrategia de trabajo se divide en cuatro etapas. La primera etapa se enfoca en la realización de pruebas experimentales para estimular el crecimiento de microorganismos propios de la vinaza empleando diferentes formulaciones para la preparación del inóculo. En la segunda etapa se determinan las características fenotípicas del consorcio microbiano, destacando la aplicación de dos técnicas de tinción principales. La tercera etapa consiste en la determinación de viabilidad del inóculo, mediante tres indicadores específicos que permiten establecer su funcionalidad. Por último, la cuarta etapa está orientada en la determinación de la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza, empleando un análisis por espectrofotometría UV-Vis. La Figura 2.1 muestra un esquema general del procedimiento seguido, el cual permite contextualizar la metodología aplicada.

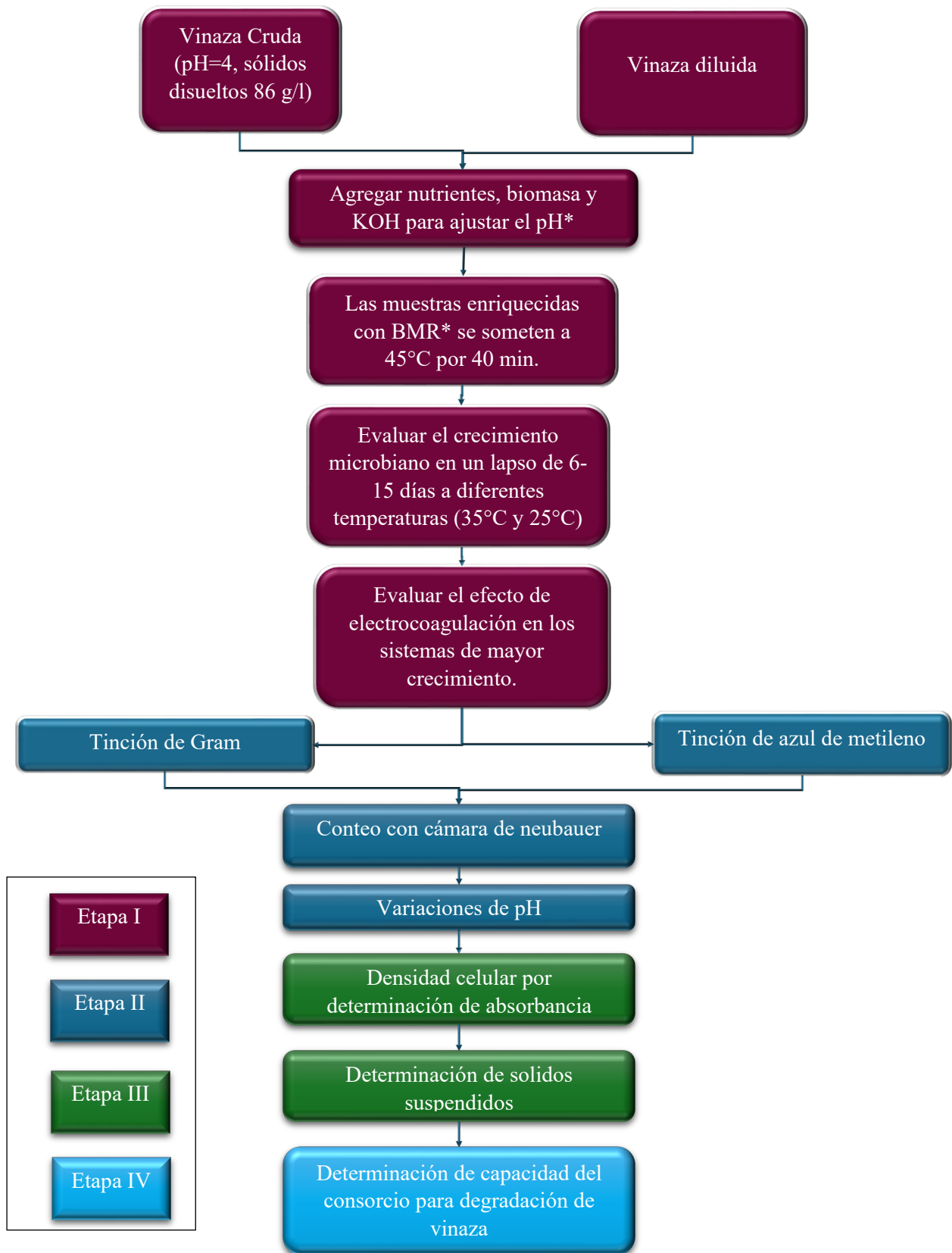


Figura 2.1 Esquema de procedimiento a seguir en tesis

2.1. Pruebas experimentales para estimular el crecimiento de microorganismos propios de la vinaza.

2.1.1 Preparación del inóculo.

Se diseñaron 13 formulaciones para la preparación del inóculo (ver Tabla 2.1), cada una con su respectiva fuente de carbono (vinaza, glucosa, harina de maíz y harina de arroz). La cointilización de fuentes de carbono es muy ventajosa, ya que puede beneficiar el crecimiento celular, además de mejorar el rendimiento y productividad. Según lo reportado por Ma et al. (2024), la glucosa es la fuente de carbono preferida, con alta prioridad y eficiencia catabólica. Por otro lado, las harinas al contener como principal nutriente al almidón proporcionan nutrientes complejos (amilasa y amilopectina) para el crecimiento de los microorganismos, además, al ser mezclada con otros componentes puede formar un sustrato más efectivo, esto de acuerdo con los autores Vega et al. (2023); Hernández et al. (2019).

Como fuente de nitrógeno se utilizó extracto de levadura, debido a su importancia en la generación de biomasa. Además, la elección respondió a criterios de accesibilidad económica, de acuerdo con Rojo et al. (2023). En cuanto a los micronutrientes, se empleó vinaza. Debido a su riqueza en materia orgánica (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos) e inorgánica soluble donde predomina el potasio, calcio y azufre, además, puede ser utilizada para ser digerida en anaerobiosis para obtención de biogás y para constituir sustrato para la producción de biomasa datos obtenidos de Cajo et al. (2011).

La vinaza fue suministrada por Mezcal Artesanal Mi General Salazar, ubicado en Atlixco, Puebla; mientras que la glucosa, harina de maíz, harina de arroz y extracto de levadura fueron obtenidos del laboratorio de investigación CA-247 de la facultad de Ingeniería Química.

Es relevante mencionar que el inóculo final está conformado por el medio microbiano base presente en la vinaza, complementado con la formulación que favoreció un mejor crecimiento microbiano y una mayor producción de biogás.

Tabla 2.1 Formulaciones para la preparación del inóculo.

Sistema	Inóculo	Enriquecimiento
1	M1	Extracto de levadura (0.0209 g), vinaza
2	M1R	Extracto de levadura (0.0209 g), vinaza, BMR
3	M3	Glucosa (0.075 g), vinaza, KOH
4	M3R	Glucosa (0.075 g), vinaza, BMR
5	Mss	Extracto de levadura, glucosa, vinaza
6	MssR	Extracto de levadura (0.09 g), glucosa (0.033 g), vinaza, BMR
7	M5	Harina de maíz, vinaza
8	M6	Harina de arroz, vinaza
9	M7	Harina de arroz, vinaza
10	M8	Harina de arroz (0.2024 g), Glucosa (0.2024 g), KOH y vinaza diluida
11	M9	Extracto de levadura (0.780g), Harina de arroz (1.56 g), vinaza diluida y KOH
12	M9R	Extracto de levadura (0.78 g), Harina de arroz (1.56 g), KOH y vinaza diluida
13	M9.2	Extracto de levadura (0.78 g), Harina de arroz (1.56 g), KOH y vinaza diluida

2.1.2 Condiciones de mantenimiento.

Durante el período de incubación, los inóculos fueron mantenidos mediante la adición periódica de nutrientes. Se hizo uso de 2 g/l de harina de arroz, 3 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de glucosa. A cada sistema se le adicionaron 5 ml cada 48 horas.

2.1.3 Pruebas vinaza cruda y diluida.

Las pruebas se realizaron de manera secuencial como se muestra en la Figura 13. Se partió de dos escenarios experimentales: la vinaza cruda (sistemas 1 al 9) y vinaza diluida (sistemas 10 al 13). En ambos casos, se agregaron nutrientes, biomasa y se ajustó el pH a 7 con *KOH* (1M), con el fin de establecer condiciones semejantes entre los inóculos seleccionados de acuerdo con Torres et al. (2019).

Para continuar, en las formulaciones 2,4 y 6, la vinaza fue enriquecida con 1 ml de biomasa de rumen (BMR) y fue sometida a un tratamiento térmico a 45°C por 40 min, para asegurar la separación de grupos bacterianos del género *Clostridium* del resto de los microorganismos presentes en la muestra (Rodríguez et al., 2016). Después de someterse a enfriamiento a temperatura ambiente se aplicó el método de aislamiento bacteriano por dilución según Sanz Cervera (2011). Para ello, se empleó 1 ml de la muestra original y se mezcló con 24 ml de agua destilada y esterilizada. Con la dilución final se prepararon los medios correspondientes a las formulaciones F1 y F3. En el caso de las formulaciones F2 y F4, se emplearon 25 ml de vinaza sin diluir. Las 4 formulaciones fueron incubadas en un horno de convección natural (marca GC) a 35°C durante 15 días, procedimiento mencionado para mantener las condiciones estables Espinosa et al. (2007)

2.1.4 Evaluación de crecimiento microbiano.

Finalizado el procedimiento de preparación, se evaluó el crecimiento microbiano durante un lapso de 6 días a 15 días. Las incubaciones se realizaron a diferentes temperaturas: 25°C y 35°C, seleccionadas con base en las cinéticas disponibles de trabajos previos como Brito (sf).

La Figura 2.2 muestra un esquema simplificado del procedimiento de tratamiento de las formulaciones.

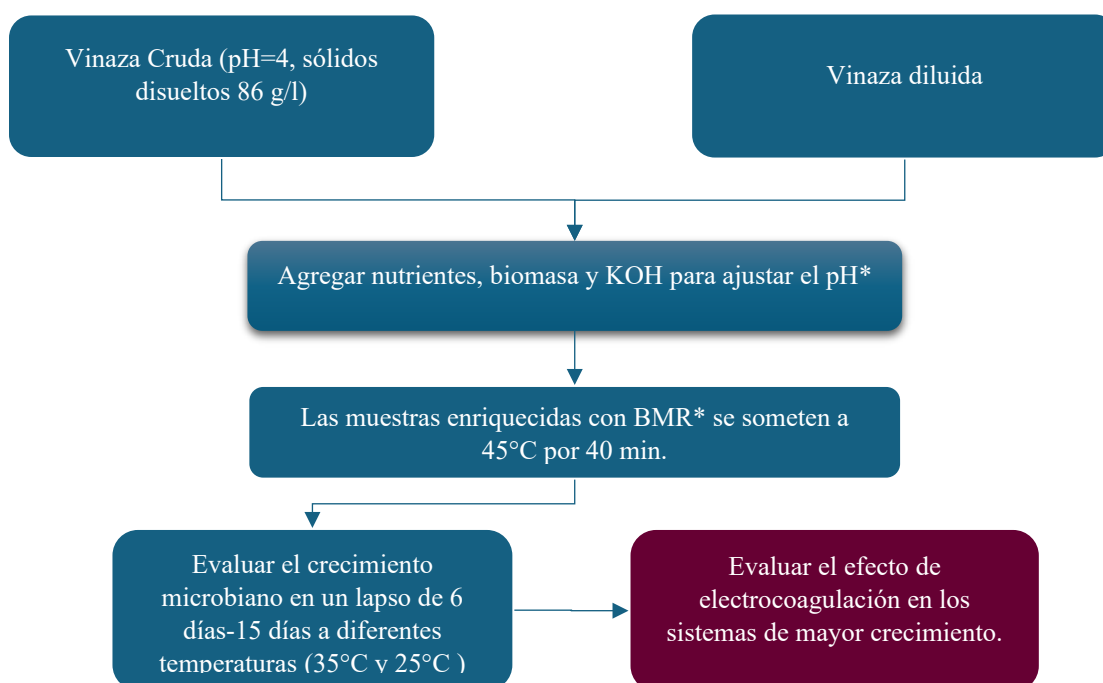


Figura 2.2 Procedimiento de tratamiento de las formulaciones.

Se detallan las etapas de adición de nutrientes, ajuste de pH, tratamiento térmico con biomasa de rumen (BMR), evaluación del crecimiento microbiano a diferentes temperaturas y análisis del efecto de la electrocoagulación en los sistemas de mayor crecimiento.

2.2. Determinación de las características fenotípicas.

Para el cumplimiento del objetivo dos, se presenta la siguiente metodología.

En este apartado se llevaron a cabo dos tinciones: Gram y azul de metileno, así como pruebas de variaciones de pH, con el propósito de identificar características fenotípicas del consorcio microbiano presente en los inóculos seleccionados.

2.2.1 Tinción de Gram.

Se realizó la tinción de Gram con el objetivo de diferenciar a las Gram positivas de las Gram negativas, lo cual permite deducir ciertas propiedades fisiológicas como identificar la anaerobiosis y facilitar el conteo celular esto de acuerdo con Corrales et al., (2020).

El análisis se llevó a cabo siguiendo los métodos estándar de análisis de agua y aguas residuales (APHA-AWWA-WPCF, 1998). El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Se esterilizó el portaobjetos con agua destilada.
2. Se tomó una alícuota de 1 ml de la muestra de vinaza.
3. Se mezclan 15 ml de vinaza en 15 ml de agua destilada.
4. Se colocó una alícuota de 0.05 ml en el portaobjetos previamente esterilizado (extendiendo la muestra obtenida en una película fina y uniforme).
5. Se fijó la muestra en el portaobjetos utilizando un mechero de laboratorio.
6. Se adicionó el colorante violeta de cristal en el portaobjetos, dejándolo actuar durante 90 segundos.
7. Se realizó un enjuague con un decolorante .3.
8. Se aplicó yodo sobre el portaobjetos durante 90 segundos.
9. Se realizó un segundo enjuague al portaobjetos con decolorante .4
10. Se aplicó safranina en el portaobjetos durante 60 segundos.
11. Se lavó el portaobjetos con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
12. Finalmente, se secó el portaobjetos con ayuda del mechero.

13. Las tinciones fueron observadas en un microscopio óptico binocular Marca Motic, modelo BA310E con objeto de 100x (véase Figura 2.3).

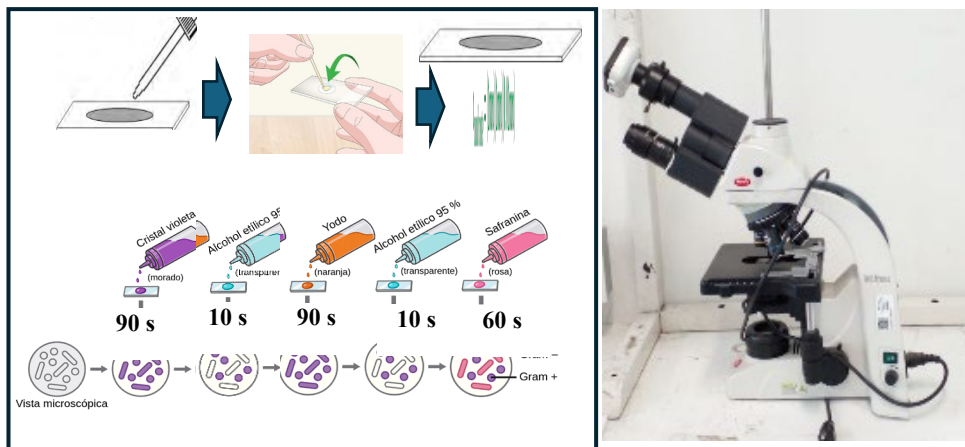


Figura 2.3 Procedimiento con Microscopio óptico binocular marca Motic modelo BA310E

2.2.2 Tinción con azul de metileno.

Con el objetivo de evaluar la viabilidad microbiana e identificar características morfológicas como forma (cocos y bacilos), el tamaño (0.1 micras a 4 micras) y el tipo de agrupación (estreptococos, tétradas, sarcinas, estafilococos, cocobacilo y estreptobacilos) se realizó una tinción con azul de metileno, según lo descrito en la literatura por González et al. (2020).

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo mencionado por Sami et al. (1994), el cual se describe a continuación:

1. Se tomó una muestra de 1ml de la vinaza y se diluyó en una proporción de 1:25 con aguas destilada.
2. Se aplicó la solución de azul de metileno a la muestra diluida y se dejó actuar durante 4 minutos.
3. Se colocó una alícuota de 0.05 ml de la muestra en la cámara de Neubauer, previamente preparada con el cubreobjetos colocado.
4. Se permitió que la muestra ingresara por capilaridad hasta asentarse.
5. Se agregó una gota de aceite de inmersión al cubreobjetos.
6. Se procedió con la observación con el microscopio modelo Motic BA310E, empleando un objetivo de 100x
7. Finalmente, se registraron los datos correspondientes a la viabilidad microbiana.

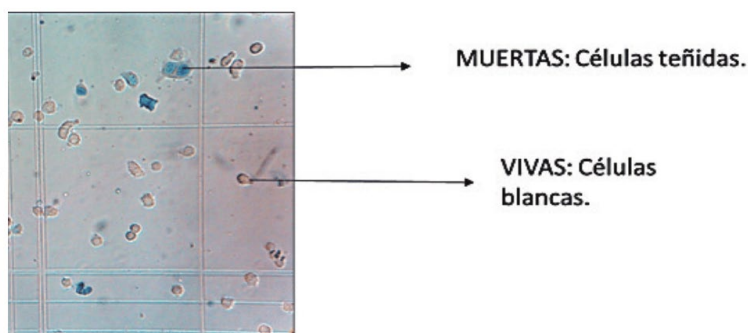


Figura 2.4 Tinción simple. Microorganismos teñidos con azul de metileno

2.2.3 Variaciones de pH

El análisis de las variaciones de pH se llevó a cabo con el objetivo de caracterizar la acidez natural de la vinaza, así como, ajustar el pH para detectar posibles cambios en las características fenotípicas de acuerdo con Díaz et al. (2017).

El procedimiento por seguir es el siguiente:

1. Se tomó una muestra de 1 ml de vinaza y se diluyó en una proporción de 1:25 con agua destilada.
2. Se midió el pH utilizando potenciómetro Hanna Instruments modelo HI 223 (véase Figura 2.5).
3. Se ajustó el pH a 7 mediante la adición de 0.2 ml de KOH en el estado inicial (1M).
4. Se monitoreó el pH diariamente ya que este puede cambiar a lo largo del tiempo.
5. Finalmente, se evaluó como estos cambios afectaron el pH, de acuerdo con el procedimiento descrito por Aristizábal (2015).



Figura 2.5 Potenciómetro Hanna Instruments modelo HI 223

2.3 Determinación de viabilidad del inóculo

Para el cumplimiento del objetivo tres se evaluó la viabilidad del inóculo; es decir, la habilidad de una población microbiana para multiplicarse y producir una colonia macroscópica en un medio de cultivo o producir turbidez en un medio líquido apropiado esto de acuerdo con la bibliografía consultada Guerra et al. (2020), para ello, se utilizaron tres indicadores, uno directo, mediante el conteo celular y dos indirectos, a través de la medición de absorbancia y determinación de sólidos suspendidos.

2.3.1 Conteo celular.

Para esta evaluación se empleó la cámara de Neubauer, con el fin de realizar un recuento de células en un volumen conocido de la muestra de vinaza. El procedimiento seguido se describe a continuación:

1. Se mezclaron 15 ml de vinaza con 15 ml de agua destilada, obteniendo una dilución de 1:2.
2. Se colocó con cuidado el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, evitando burbujas y derrames.
3. Con ayuda de una pipeta, se depositaron 0.05 ml de la muestra diluida (1:2) en el borde de la cámara de Neubauer. De esta manera la muestra se introdujo por capilaridad.
4. Se dejó reposar durante cuatro minutos para que las células se asentaran y distribuyeran de manera homogénea.
5. Se realizó la observación con ayuda del microscopio óptico binocular Marca Motic, modelo BA310E, con objeto de 100x
6. El conteo celular se efectuó en un área de 1 mm^2 , con una profundidad de 0.1 mm (véase Figura 15) (Sami y otros, 1994).
7. A partir de las imágenes obtenidas por esta técnica se calculó la densidad celular de acuerdo con la Ecuación 2, mencionando que se obtienen unidades de *células por mililitro* de acuerdo con Gallego et al., (sf).

$$Densidad = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Superficie de conteo (mm}^2\text{) x Profundidad (mm) x Dilución}} \quad \text{Ec. 2}$$

Mencionando que la superficie de conteo es el área observada, mientras que la profundidad se refiere a la distancia que existe entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos (véase Figura 2.6).

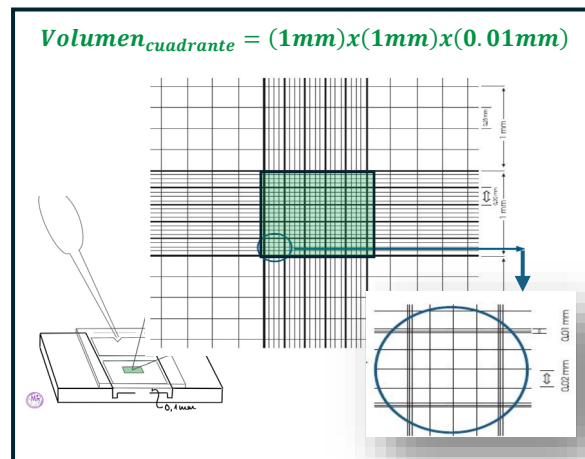


Figura 2.6 Conteo celular con cámara de Neubauer (Subía et al., 2018)

2.3.2 Densidad celular por determinación de absorbancia.

Para este análisis se utilizó la luz visible en un rango de 400nm-700 nm, en el cual se midió la turbidez causada por células en suspensión, como indicador del crecimiento celular esto de acuerdo con la referencia Franco et al. (2023).

El proceso se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1. Se preparó una dilución de la muestra en una proporción de 1:2 (15 ml de vinaza y 15 ml de agua destilada).
2. Se tomó en una cubeta de espectrofotómetro 1 ml de muestra diluida (1:2) y en otra agua destilada la cual funge como blanco.
3. Se encendió el espectrofotómetro UV-Vis modelo GENESYS 30 (véase Figura 2.7) y se calibró a cero la absorbancia utilizando la cubeta con agua destilada.
4. Una vez que fue calibrado el equipo se quitó la muestra de blanco y se colocó la cubeta con muestra de vinaza diluida.

5. Se realizó el barrido correspondiente, y al finalizar, se registraron las absorbancias obtenidas a 600 nm, que es comúnmente utilizada para estimar crecimiento celular de acuerdo con los autores Camacho et al. (2010).
6. Por último, se almacenan los resultados. A partir de los valores de absorbancia se determinaron las velocidades máximas de crecimiento celular bajo las condiciones establecidas de acuerdo con la literatura reportada Muloiwa et al. (2020).



Figura 2.7 Espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 30

2.3.3 Determinación de sólidos suspendidos.

El tercer indicador es la determinación de sólidos suspendidos. Esta técnica se empleó con el fin de separar la biomasa microbiana por medio de un centrifugado, y, a su vez cuantificar los sólidos suspendidos presentes en la muestra de acuerdo con Contreras et al. (2001). La secuencia de pasos se describe a continuación:

1. Se esterilizaron los tubos de centrifuga con una capacidad de 50 ml para evitar contaminación.
2. A partir de esto, se tomaron 180 ml de vinaza y se diluyeron en una proporción de 1:5. La muestra fue agitada hasta homogenizarla.
3. Se pesaron los tubos vacíos de centrifuga vacíos en báscula OHAUS Adventurer modelo H-5276.
4. Posteriormente, se vertieron en los tubos de centrifuga 45 ml de la muestra diluida, asegurándose de cerrarlos correctamente para evitar derrames y garantizar un equilibrio adecuado durante la centrifugación.
5. A continuación, se pesaron los tubos de centrifuga con la muestra deseada.
6. Los tubos balanceados se colocaron en una centrifuga Labnet modelo HERMELE Z300 (véase Figura 2.8). y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos (Chen et al., 2021).
7. Se transfirió el sobrenadante en otros tubos de centrifuga y se procedió al secado.

8. Luego, se realizó el pesaje de sólidos en la misma balanza.
9. Se registraron los datos obtenidos y se desecharon adecuadamente los residuos de vinaza en contenedor especial.
10. Finalmente, la masa de sólidos separados por centrifugación fue determinada por gravimetría, utilizando la Ecuación 3.

$$SST = m_{tubo+SST} - m_{tubo_{seco}} \quad Ec. 3$$



Figura 2.8 Centrifuga Labnet modelo HERMELE Z300

2.4 Determinación de la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza.

En esta etapa se evaluó el desempeño de los procesos de tratamiento mediante el análisis de la absorbancia, considerando las variaciones en la intensidad de color dentro del rango 450 nm-455 nm, así como un barrido espectral de 325 nm-640 nm, con el propósito de identificar los picos característicos de la vinaza, esto de acuerdo con la literatura Padilha de Souza et al. (2015). Para ello, el procedimiento empleado es el siguiente:

1. Se calibró el espectrofotómetro UV-Vis modelo GENESYS 30 a cero usando una cubeta con agua destilada como blanco.
2. Después, se retiró la cubeta del blanco y se colocó la cubeta con la muestra de vinaza diluida.
3. Se realizó un barrido en el rango de 325 nm-640 nm, identificando los picos característicos de la vinaza (Padilha de Souza y otros, 2015).

4. A continuación, se registraron las absorbancias específicas en el intervalo de 450 nm - 455 nm, correspondientes a la intensidad de color mencionadas por Del Gobbo et al., (2019).
5. Finalmente, la degradación de la vinaza fue determinada mediante la Ecuación 4, mientras que el rendimiento de degradación se calculó utilizando la Ecuación 5, el proceso de cálculo se explica a continuación:

5.1 Inicialmente, se toman los valores de absorbancia (inicial y final) a 455 nm.

5.2 Posteriormente, se calcula el porcentaje de reducción. De acuerdo con la Ecuación 4, se realiza una diferencia entre la absorbancia inicial y final, dividiendo el resultado entre la absorbancia inicial. Finalmente, este cociente se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de degradación.

$$\% \text{ de Reducción Abs} = \frac{Abs_o - Abs}{Abs_o} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

En donde, Abs_o es la absorbancia inicial y, Abs es la absorbancia después del tratamiento.

5.3 Para calcular el rendimiento celular:

Se obtiene por medio del cociente entre la tasa de cambio de absorbancia y la tasa de crecimiento celular, obteniendo el rendimiento.

$$Y_{abs/celulas} = \frac{-r_{max,abs}}{+r_{max,cel}}$$

$$Y_{abs/celulas} \approx \frac{\left(\frac{\Delta[abs]}{\Delta t}\right)}{\left(\frac{\Delta No.Cel}{\Delta t}\right)} \quad \text{Ec.5}$$

$$Y_{abs/celulas} = \text{Rendimiento de sustrato degradador}_{max,abs}$$

$-r_{max,abs}$ = **Tasa máxima de degradación o consumo del sustrato**

$+r_{max,cel}$ = **Tasa máxima de crecimiento celular.**

5.4 Se evalúa la tasa de cambio de absorbancia con respecto al tiempo, que representa a la velocidad de degradación del sustrato.

$$\frac{\Delta[abs]}{\Delta t} = \frac{Abs - Abs_0}{t - t_0} \quad Ec. 5.1$$

$\frac{\Delta[abs]}{\Delta t}$ = Cambio en la concentración de sustrato degradado por unidad de tiempo

t = tiempo final

t₀ = tiempo inicial

5.5 Cálculo de la tasa de biomasa generada. La tasa puede calcularse por dos métodos:

a) Por medio del cambio en el número de células:

$$+ \frac{\Delta No. Cel}{\Delta t} = \frac{X_{cel} - X_{cel_0}}{t - t_0} \quad Ec. 5.2$$

$+ \frac{\Delta No. Cel}{\Delta t}$ = Cambio en el número de células en un intervalo de tiempo.

X_{cel} = Acumulados de conteo celular final

X_{cel_0} = Acumulados de conteo celular inicial

b) Por concentración de sólidos suspendidos (SS):

$$+ \frac{\Delta C_{ss}}{\Delta t} = \frac{C_{ss} - C_{ss_0}}{t - t_0} \quad Ec. 5.3$$

C_{ss} = Concentración final de sólidos secos

C_{ss_0} = Concentración inicial de sólidos secos

2.4.1 Determinación de la capacidad de degradación de vinaza.

La formulación que mostró el mayor rendimiento de crecimiento fue seleccionada para someterse a pruebas de electrocoagulación de bajo voltaje: 0 V, 1 V, 1.5 V durante un tiempo de exposición de 30 minutos. De acuerdo con Ojeda, las pruebas de electrocoagulación son un tratamiento electroquímico muy utilizado en el tratamiento de residuales, por medio del cual se desestabilizan contaminantes suspendidos haciendo pasar una corriente eléctrica a través de este (2010).

El equipo utilizado fue el BK PRECISION 1550 (véase Figura 2.9) como fuente de poder sobre la muestra de vinaza, esto debido a que la vinaza contiene sustancias que intervienen en reacciones REDOX. Posteriormente, se realizó un monitoreo de la absorbancia a 550 nm, el pH y temperatura durante un período de 6 días, esto con el fin de evaluar la evolución de remoción, la cual es calculada de acuerdo con la ecuación 4.



Figura 2.9 Fuente de poder BK PRECISION 1550.

Capítulo 3 Resultados



“En la naturaleza, la cooperación es tan importante como la competencia”

-Lynn Margulis

En este capítulo se presentan los principales resultados obtenidos durante la adaptación de consorcios microbianos provenientes de la vinaza de mezcal. El trabajo se dividió en cuatro etapas, las cuales permitieron evaluar el comportamiento del consorcio en diferentes condiciones.

Inicialmente se seleccionaron las formulaciones más factibles para estimular el crecimiento microbiano, utilizando una fuente de carbono, nitrógeno y de micronutrientes. Para la fase posterior, se realizó una caracterización fenotípica de consorcio mediante tinciones (tinción de Gram y azul de metileno). En la tercera fase, se evaluó la viabilidad del inóculo a través de un conteo celular haciendo uso de la cámara de Neubauer, la medición de sólidos suspendidos y la densidad celular por medio de la determinación de absorbancia. Por último, se analizó la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza.

3.1 Pruebas experimentales para estimular el crecimiento de microorganismos propios de la vinaza.

De las 13 pruebas experimentales que se realizaron con su respectiva fuente de carbono, nitrógeno y de micronutrientes se realizó un monitoreo inicial de pH y temperatura para evaluar condiciones de la vinaza, así como el crecimiento celular obtenido en los sistemas M1-M6 y M9.2. Dado que los tiempos de muestreo variaban entre algunas pruebas, se optó por analizar únicamente aquellos momentos en los que coincidían, específicamente en las horas 24, 48, 72 y 168.

Los resultados se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Determinación de pH y temperatura inóculos M1-M9.2

Parámetro	M1	M1R	M3	M3R	Mss	M5	M6	M7	M8	M9	M9R	M9.2
Ph	4.3	4.3	4.3	4.3	4.2	4.9	4.3	4.3	3.4	3.9	3.6	3.1
pH ajustado	7.9	7.3	7.8	7.1	7	8.4	7.29	7.29	6.9	4.3	7	5.9
Temperatura (°C)	35	35	35	35	35	35	35	35	25	25	25	25

Y los resultados obtenidos para las muestras seleccionadas para conteo celular y monitoreo de pH se muestran en la Tabla 3.2. Crecimiento microbiano en inóculos M1-M6 y M9.2 y Tabla 3.3 Monitoreo de pH (24h-168 h) en inóculos M1-M6 y M9.2. Así mismo, en la Figura 3.1, se muestran de manera ilustrativa los resultados obtenidos en las tablas mencionadas.

Tabla 3.2 Crecimiento microbiano en inóculos M1-M6 y M9.2

Número de células Gram +	M1	M1R	M3	M3R	Mss	M5	M6	M9.2
24 h	45	34	66	45	62	30	57	61
48 h	29	75	37	25	61	21	25	53
72 h	23	42	20	70	32	32	35	84
168 h	38	81	18	29	71	31	19	198

Tabla 3.3 Monitoreo de pH (24h-168 h) en inóculos M1-M6 y M9.2.

pH	M1	M1R	M3	M3R	Mss	M5	M6	M9.2
24 h	7.9	7.3	7.8	8.8	6.7	7.59	2.29	3.1
48 h	7.9	7.7	7.2	7.1	7	7.3	7.9	6.789
72 h	7.09	7.1	8.768	8.159	7.1	7.48	7.42	6.931
168 h	7.6	7.26	7.45	7.7	7.029	7.235	7.322	7.628

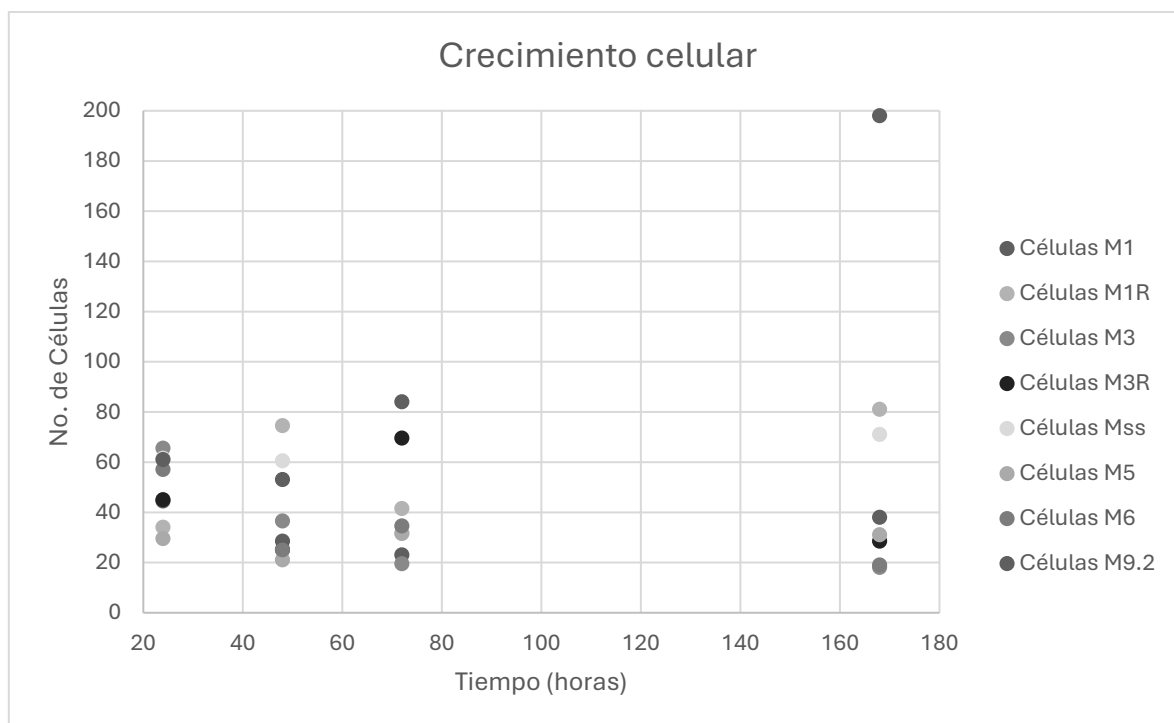


Figura 3.1 Crecimiento celular en inóculos M1-M9.2.

Nota. El gráfico representa el crecimiento de células Gram positivas en los inóculos M1-M6 y M9.2 medidos en un lapso de 7 días.

A partir de la gráfica se observa que el inóculo M9.2, derivado del inóculo Mss, presentó el mayor crecimiento celular, lo que sugiere que esta combinación de condiciones favoreció significativamente el desarrollo microbiano en comparación de los demás inóculos.

Se prosiguió con calcular la densidad celular. Para ello, se hizo uso de la ecuación 2, explicada en la metodología (véase capítulo II), la cual nos permitió obtener el número de

celular por mililitro ($\frac{\text{células}}{\text{ml}}$). Los resultados se presentan en la Tabla 3.4 Densidad celular para inóculos M1-M6 y M9.2.

Tabla 3.4 Densidad celular para inóculos M1-M6 y M9.2.

Inóculo	Número de células Acumuladas	Superficie de conteo mm^2	Profundidad mm	Dilución	Densidad
M1	134	0.2	0.1	25	0.268×10^6 células /ml
M1R	231	0.2	0.1	25	0.462×10^6 células /ml
M3	139.5	0.2	0.1	25	0.279×10^6 células /ml
M3R	168	0.2	0.1	25	0.336×10^6 células /ml
Mss	224.5	0.2	0.1	25	0.449×10^6 células /ml
M5	113	0.2	0.1	25	0.226×10^6 células /ml
M6	135.5	0.2	0.1	25	0.291×10^6 células /ml
M9.2	396	0.2	0.1	30	0.792×10^6 células /ml

Como se observa en la Tabla 3.4, la mayor densidad celular la obtuvo el inóculo M9.2, seguida del Mss.



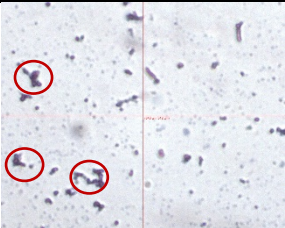
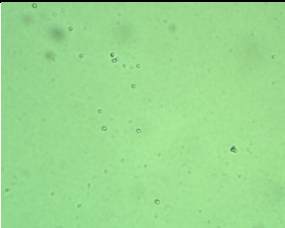
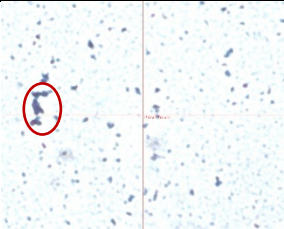

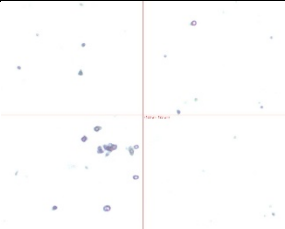
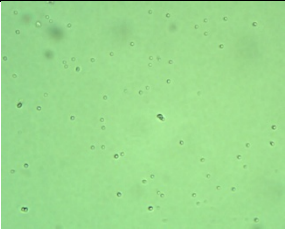
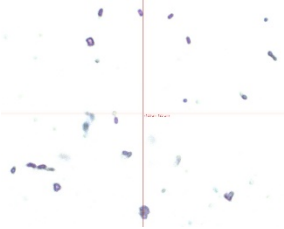

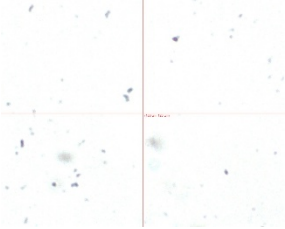
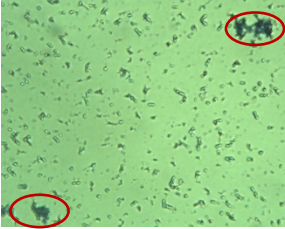
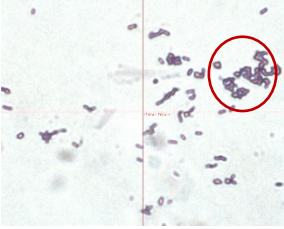
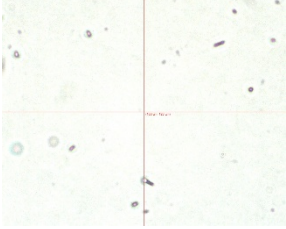

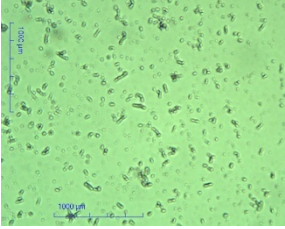
3.2 Determinación de las características fenotípicas.

Para el desarrollo del estudio, se obtuvieron los siguientes resultados en función a los métodos de tinción aplicados para la identificación de características fenotípicas.

3.2.1 Tinción de Gram y azul de metileno.

A manera de ejemplo se describen los inóculos M1R, M6 y Mss (véase Tabla 3.5) para la tinción de Gram y M9.2 para la tinción con azul de metileno.

Tabla 3.5 Identificación de Gram positivas en inóculos M1R, M6 y Mss.

t (h)	M1R	M6	Mss	M9.2
24 h				
48 h				
72 h				
168 h				

De acuerdo con la tabla anterior (véase Tabla 3.5), se observa que en las primeras 24 horas, las células observadas en los inóculos M1R, M6 y M9.2 aparecen con una mayor cantidad de

células libres (individuales) y con una baja densidad. En cambio, el inóculo Mss desde las primeras 24 horas ya muestra agrupamientos celulares más notorios, lo que sugiere un crecimiento más acelerado. Entre las 48h y 72 h, se observa un aumento en la cantidad de células, especialmente en Mss y M1R, ya que, hay mayor cantidad de agrupaciones, mientras que en M6 y M9.2 es limitado el crecimiento. A las 168 h, los inóculos M1R y M9.2, muestran una agrupación muy densa (señalado en la imagen), lo que podría arrojar a la formación de una biopelícula como mecanismo de adaptación y al encontrarse diversos microorganismos se puede ver influenciada por las diversas interacciones. De acuerdo con la literatura consultada, la formación de biofilms *S. cerevisiae* está influenciada por la disponibilidad de nutrientes, principalmente de fuentes de carbono, nitrógeno y lípidos. Activando al gen FLO11 para la formación de biofilms cuando hay una reducción de carbono y nitrógeno, esto de acuerdo con la literatura consultada Zara et al., (2020). Este proceso es importante porque favorece la estabilidad y viabilidad celular, reduciendo los tiempos de tratamiento. Por ende, se establece que la formación de biopelículas se debe a una respuesta por la reducción de la fuente de carbono y nitrógeno.

Respecto a la morfología, de acuerdo con González et al. (2020), las células presentan una forma cocoide y bacilar en su mayoría, con variaciones mínimas en tamaño y agrupaciones en forma de tétradas, estafilococos, sarcinas, diplobacilos y estreptobacilos. Y, muestran estabilidad de acuerdo con las condiciones evaluadas.

3.3. Determinación de la viabilidad del inóculo.

Para la evaluación de la viabilidad del inóculo, se determinaron las velocidades máximas de crecimiento celular a partir de curvas de crecimiento, aplicando líneas de tendencia. De esta manera se identificó en que inóculo se presentó una tasa mayor en función del tiempo.

En la Tabla 3.6 se presentan las velocidades de crecimiento obtenidas para cada inóculo, respecto al conteo celular.

Tabla 3.6 Velocidades de crecimiento M1-M9.

Inóculo	Tiempo (h)	Acumulación No. Células	$\frac{dX_{cel}}{dt} \approx \frac{\Delta X_{cel}}{\Delta t}$
M1	24	44.5	0
M1	48	73	1.188
M1	72	96	0.958
M1	168	134	0.396
M1R	24	34	0
M1R	48	108.5	3.104
M1R	72	150	1.729
M1R	168	231	0.844
M3	24	65.5	0
M3	48	102	1.521
M3	72	121.5	0.813
M3	168	139.5	0.188
M3R	24	45	0
M3R	48	70	1.042
M3R	72	139.5	2.896
M3R	168	168	0.297
Mss	24	61.5	0
Mss	48	122	2.521
Mss	72	153.5	1.313
Mss	168	224.5	0.740
M5	24	29.5	0
M5	48	50.5	0.875
M5	72	82	1.313
M5	168	113	0.323
M6	24	57	0
M6	48	82	1.042
M6	72	116.5	1.438
M6	168	135.5	0.198
M9.2	24	61	0
M9.2	48	114	2.208
M9.2	72	198	3.5
M9.2	168	396	2.063

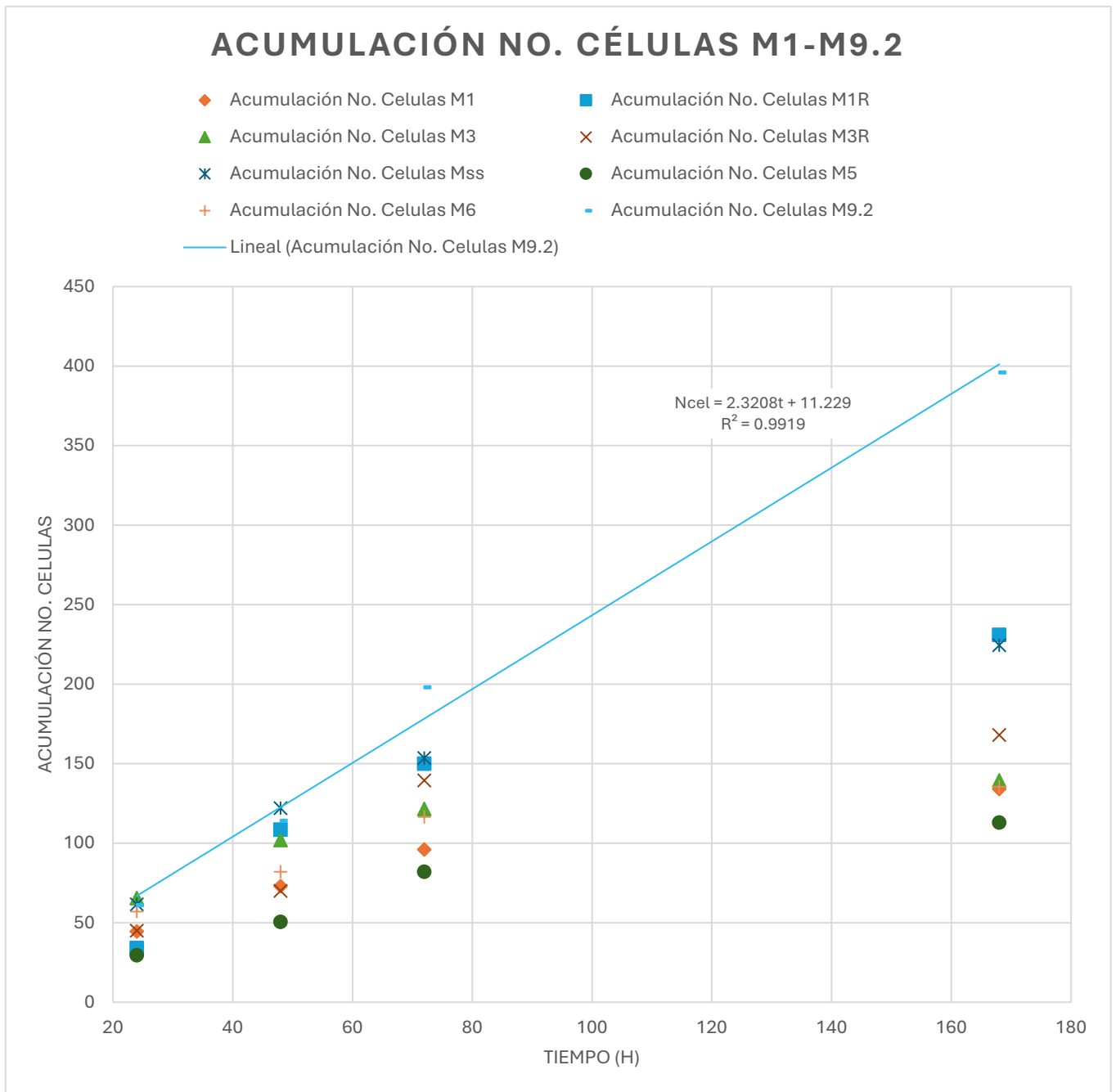


Figura 3.2 Acumulación de No. Células M1-M9.2.

De acuerdo con las gráficas de acumulación de número de células y velocidades de crecimiento (véase Figuras 3.2 y 3.3), el inóculo con mayor velocidad de crecimiento es el del inóculo M9.2 con un valor de 3.5. Este comportamiento se atribuye a dicho sistema fue

alimentado cada tercer día con su respectiva fuente de nutriente, lo cual favoreció su desarrollo continuo.

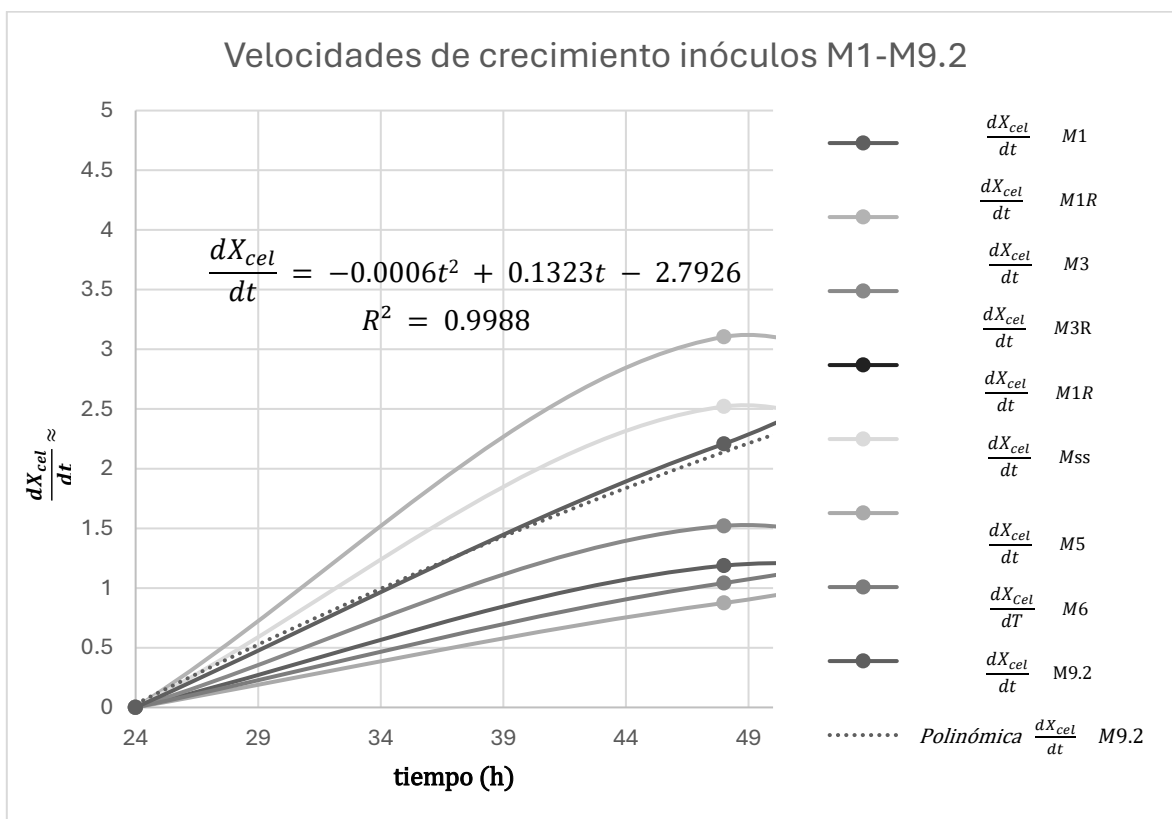


Figura 3.3 Velocidades de crecimiento inóculos M1-M9.2.

3.3.1 Densidad celular por determinación de Absorbancia

La densidad celular se determinó por medio de las absorbancias, a una longitud de onda de 600 nm (OD600), rango utilizado comúnmente para medir el crecimiento microbiano. En base a los valores obtenidos, se estimó la tasa de cambio de absorbancia respecto al tiempo $\frac{C_{abs}}{dt} \approx \frac{\Delta C_{abs}}{\Delta t}$ como una aproximación del crecimiento celular. Para ello, se hizo uso de la ecuación 5 (véase en capítulo 2).

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Determinación de absorbancias y tasas de cambio en inóculos M1-M6 y M9.2.

Inóculo	Tiempo (h)	Λ	Absorbancias	$\frac{dC_{abs}}{dt} \approx \frac{\Delta C_{abs}}{\Delta t}$
M1	24	600	0.034	0.00000
M1	192	600	0.034	
M1R	24	600	0.045	0.00001
M1R	192	600	0.047	
M3	24	600	0.055	-0.00027
M3	192	600	0.009	
M3R	24	600	0.06	0.00011
M3R	192	600	0.078	
Mss	24	600	0.282	-0.00140
Mss	192	600	0.047	
M5	24	600	0.01	-0.00007
M5	192	600	0.00	
M6	24	600	0.012	-0.00007
M6	168	600	0	
M9.2	24	600	0.523	-0.00061
M9.2	192	600	0.42	

Analizando que el inóculo Mss es la que obtuvo la mayor reducción en la tasa de absorbancia seguida de M9.2, que es respuesta de la pérdida de turbidez durante el tiempo evaluado, así como a la formación de sedimentos.

3.3.2 Determinación de sólidos suspendidos.

En esta sección se presentan los resultados correspondientes a la determinación de sólidos suspendidos de los diferentes inóculos analizados. La Figura 3.4. muestra la acumulación de sólidos suspendidos registrada en los inóculos M1-M6 y M9.2, lo que permite observar el comportamiento de cada uno.

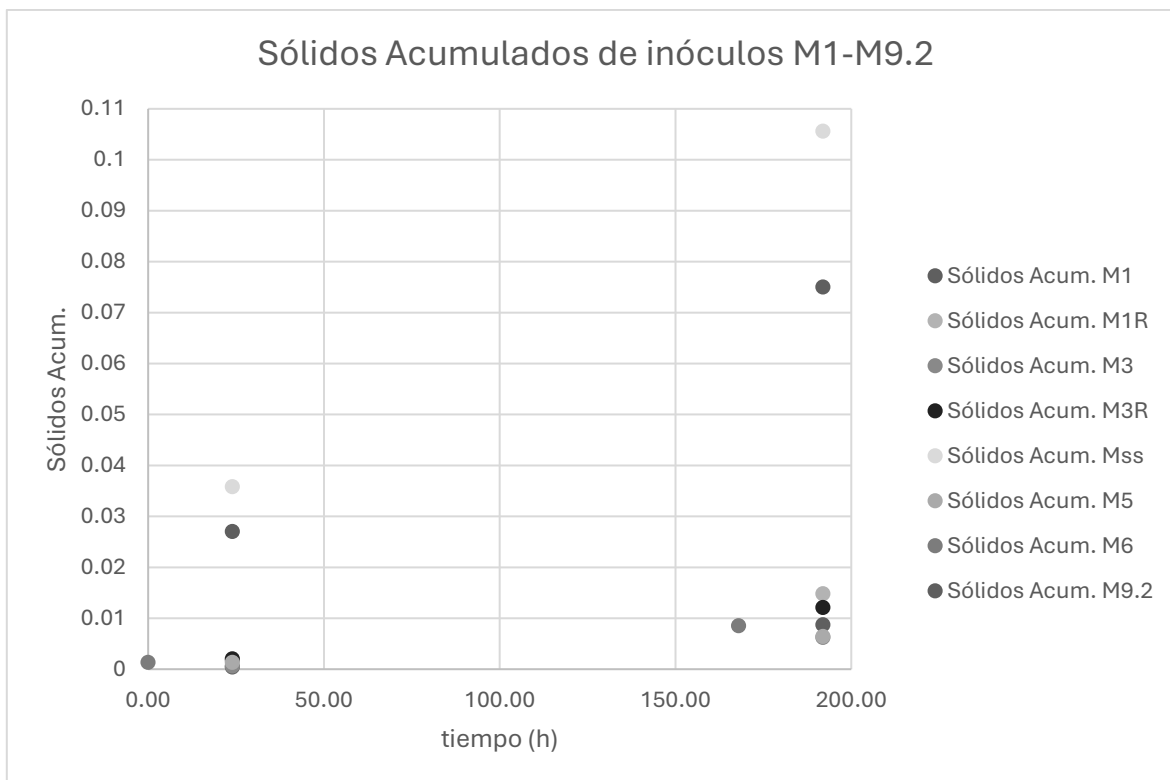


Figura 3.4 Acumulación de sólidos suspendidos en inóculos M1-M9.2.

De acuerdo con la figura 3.4 se observa que el inóculo Mss es el inóculo con mayor presencia de sólidos con un valor de 0.1056 g de sólidos secos acumulados, seguido del inóculo M9.2 con un valor de 0.075 g de sólidos secos suspendidos. Esta diferencia puede atribuirse al hecho de que el inóculo Mss sirvió como base para la elaboración del inóculo M9.2. De acuerdo con Tchobanoglus (2014), la acumulación de sólidos suele estar relacionada con la actividad microbiana y la estabilidad del sistema.

3.4 Determinación de la capacidad del consorcio microbiano para la degradación de la vinaza.

Para la evaluación del desempeño del proceso de adaptación, se realizó un barrido de 325 nm-640 nm, para identificar los picos característicos (Padhila de Souza y otros, 2016). Este análisis se centró en los inóculos M9 y M9R ya que mostraron una mayor visibilidad de los picos espectrales, permitiendo una mejor interpretación del comportamiento. En la Figura 3.5 se presentan las curvas de absorbancia características del inóculo M9.

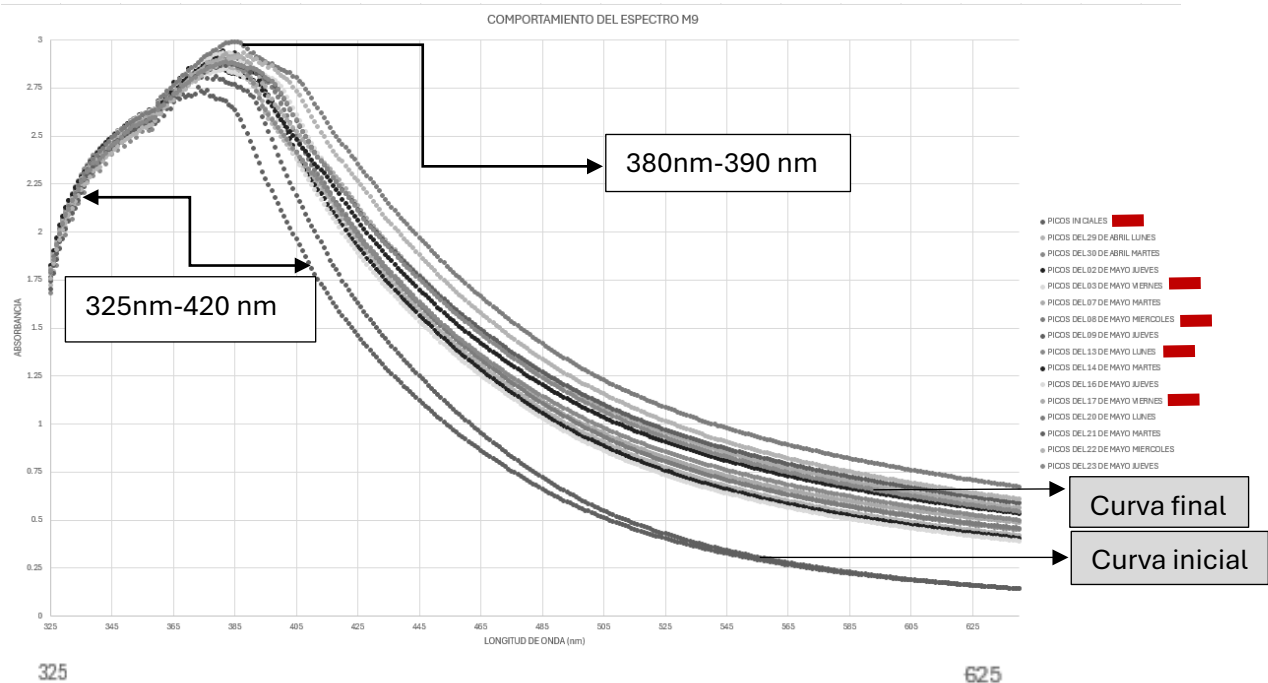


Figura 3.5 Identificación de picos característicos inóculo M9 (325 nm-640 nm)

Por otro lado, en la Figura 3.6 se presentan las curvas de absorbancia características del inóculo M9R.

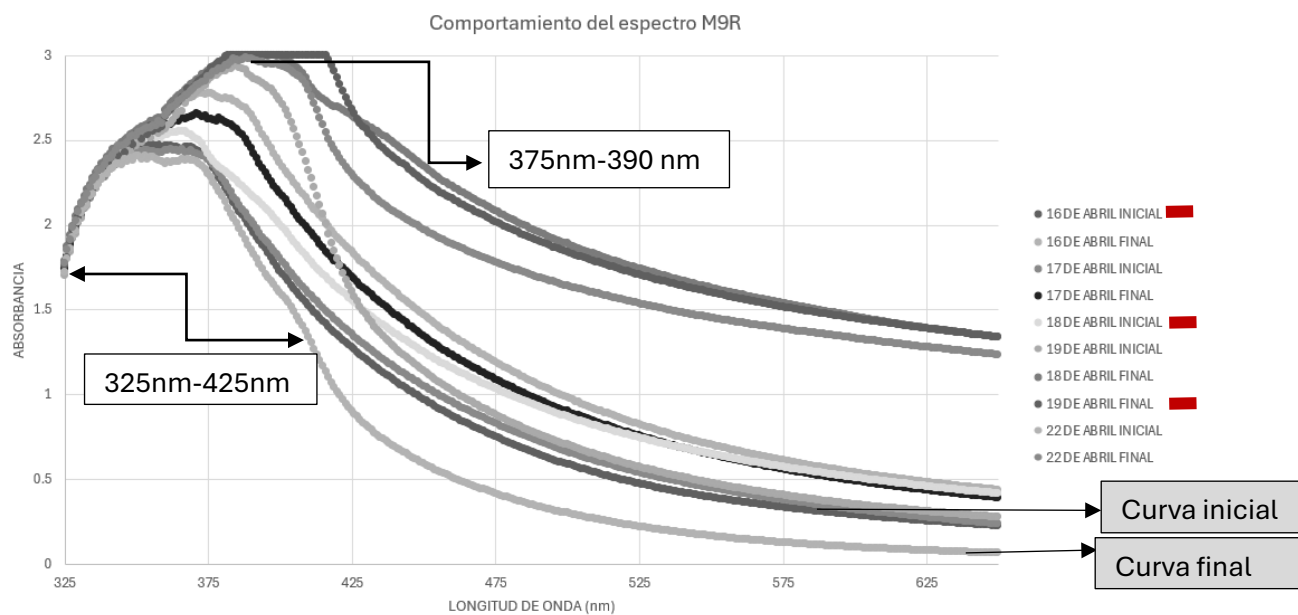


Figura 3.6 Identificación de picos característicos inóculo M9R (325 nm-640 nm)

■ Días en que se alimentó el sistema.

Se observó que los picos característicos en el inóculo M9 se encuentran en el siguiente rango:

- 380 nm-390 nm-> Melanoidinas
- 325 nm-420 nm-> Compuestos fenólicos y Melanoidinas

De acuerdo con lo anterior, en la Figura 3.5 se observó un aumento en las curvas de absorbancia inicialmente, pero a partir de las 288 horas las absorbancias comienzan a disminuir progresivamente, lo cual sugiere una reducción de la carga orgánica y pigmentada de la vinaza.

Por otro lado, se identificó que los picos característicos para inóculo M9R se encuentran en el siguiente rango:

- 375 nm-390 nm-> Melanoidinas
- 325 nm-425 nm-> Compuestos fenólicos y Melanoidinas

De acuerdo con lo anterior, en la Figura 3.6 se observa un aumento en las curvas de absorbancia inicialmente, pero a partir de las 72 h las absorbancias comienzan a disminuir progresivamente, lo cual nuevamente sugiere una reducción de la carga orgánica y pigmentada de la vinaza.

Además del análisis de picos, se evaluó la tasa de reducción de absorbancia (véase Figura 7). En este caso los inóculos seleccionados son del M1-M6 y M9.2, utilizando los valores obtenidos a las 24 h y 192 h de análisis a una longitud de onda de 450 nm.

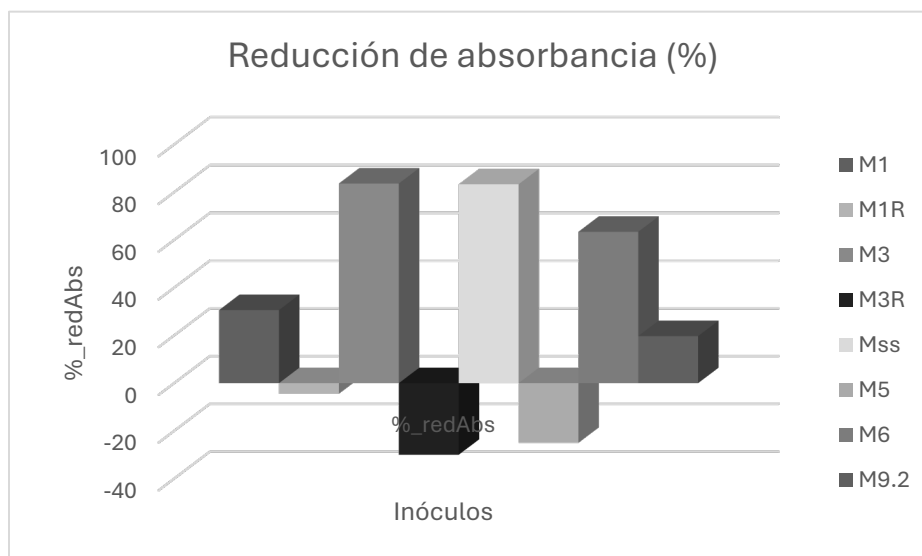


Figura 3.7 Reducción de absorbancia porcentual en inóculos M1-M9.2

De acuerdo con los resultados graficados, los inóculos M3 y Mss mostraron los mayores porcentajes de reducción, con valores superiores a 83%, lo que indica una mayor capacidad de disminución en la densidad óptica. Mencionando que este comportamiento puede atribuirse a la actividad metabólica del consorcio.

Por último, se calculó el rendimiento de cada inóculo (M1-M9.2), utilizando la ecuación 5 (véase capítulo II). Para este cálculo se tomó como número de células la tasa de acumulación de sólidos suspendidos (SS), lo que permitió estimar el rendimiento del sustrato degradado en función de la biomasa generada. Los resultados se presentan en la Tabla 3.8

Tabla 3.8 Determinación de rendimientos de sustrato degradado M1-M6 y M9.2.

Inóculo	$\frac{dC_{SS}}{dt} \approx \frac{\Delta C_{SS}}{\Delta t}$	$\frac{C_{abs}}{dt} \approx \frac{\Delta C_{abs}}{\Delta t}$	Rendimiento del proceso $Y_{abs/ss} \approx \frac{\left(-\frac{\Delta[abs]}{\Delta t}\right)}{\left(+\frac{\Delta C_{SS}}{\Delta t}\right)}$
M1	0.00119	0.00000	0.00000
M1R	0.00187	0.00029	-0.15267
M3	0.00080	-0.00657	8.21429
M3R	0.00144	0.00257	-1.78218
Mss	0.00997	-0.03357	3.36676

M5	0.00073	-0.00171	2.3529
M6	0.00103	-0.00171	1.6667
M9.2	0.00686	-0.01471	2.1458

En este caso se muestra que el inóculo M3 es el que presenta mayor rendimiento, pero debe excluirse del análisis de rendimiento, ya que su valor está sesgado por un exceso de KOH, que interfiere con la medición de absorbancia. Por lo tanto, Mss es el que presenta mayor reducción del rendimiento debido a que el análisis fue realizado con una dosis mínima de KOH.

Ya que el inóculo Mss es el más favorable se realizan las pruebas de electrocoagulación descritas en el objetivo 1. Para este punto las pruebas de electrocoagulación se realizaron a voltajes distintos (véase capítulo II). Posteriormente, se realizó un monitoreo de la absorbancia a 550 nm con el fin de evaluar la evolución de remoción, la cual es calculada de acuerdo con la ecuación 4.

En las Tablas 3.9 y 3.10 se muestran los resultados comparados a estos voltajes, siendo representados los resultados de remoción en la Figura 3.8.

Tabla 3.9 Monitoreo de pH y temperatura inóculo Mss.

Parámetro	Control (0V)	Control (1V)	Control (1.5 V)
pH inicial	3.6	3.6	3.6
pH final	7.7	7.34	6.58
Temperatura °C	25	25	25

Tabla 3.10 Degradación de la vinaza antes y después del tratamiento en el inóculo Mss.

Día	Control (0V)	Control (1 V)	Control (1.5 V)	Remoción (1V)	Remoción (1.5 V)
1	1.452	0.394	0.325	72.87	77.62
2	1.355	0.703	0.657	48.12	51.51
3	2.196	0.645	0.689	79.55	68.62
4	1.945	1.628	0.712	66.68	63.39
5	1.709	1.601	0.69	62.26	59.63

6	1.565	1.452	0.741	69.52	52.65
---	-------	-------	-------	-------	-------

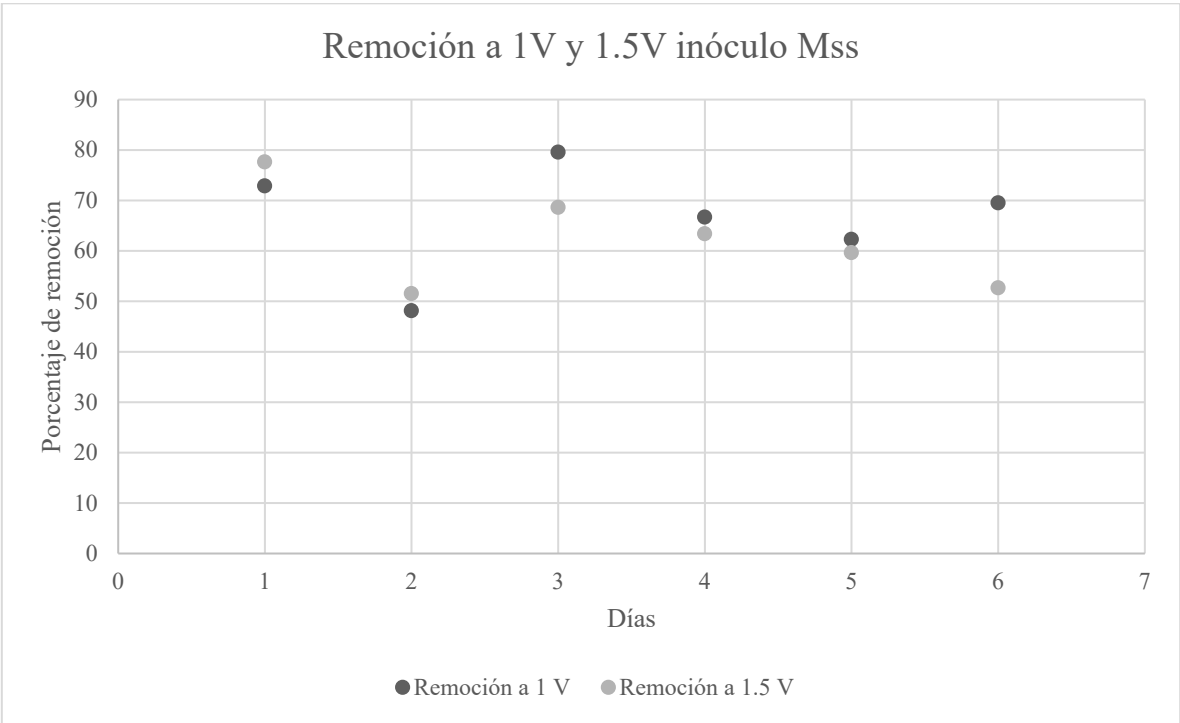


Figura 3.8 Remoción a 1 y 1.5 V en la muestra del inóculo Mss.

El gráfico representa el porcentaje de remoción en la vinaza diluida al 30%, medida a una absorbancia de 550 nm a voltajes de 1 V y 1.5 V.

Obtenemos como resultados una reducción de absorbancia desde el día 1, pero podemos observar que a 1.5 V hay una mayor remoción, ya que esta se encuentra entre 50% y 80% a diferencia de la de 1 V ya que la remoción a 550 nm fluctúa de 48% a 80%. Es por ello, que se comprueba que la electrocoagulación es efectiva para monitorear la remoción en el residual del mezcal conocido como vinaza y que la variación de resultados obtenidos se debe a diferencias en las mediciones realizadas durante las pruebas experimentales.

Capítulo 4 Conclusiones



“Nuestra tarea debe ser vivir libres, ampliando nuestro círculo de compasión para abarcar a todas las criaturas vivientes y la totalidad de la naturaleza y su belleza”
-Albert Einstein

Con base al primer objetivo, se realizaron las pruebas experimentales empleando distintos inóculos, determinándose que el de mayor rendimiento fue el Mss (lo que determina es el inóculo más favorable a degradar MO).

Sin embargo, inicialmente el inóculo con mayor crecimiento celular fue el M9.2 a las 168 h después su caracterización, lo que confirma la eficiencia del proceso de enriquecimiento de la fuente de carbono para favorecer la adaptación microbiana.

En relación con el segundo objetivo, la caracterización fenotípica permitió identificar que el inóculo Mss desarrolló agrupamientos celulares notorios desde las primeras 24 h, indicando un crecimiento más rápido. Entre las 48h y 72 h, se observó un aumento en la densidad celular, principalmente en los inóculos Mss y M1R. Posteriormente, a las 168 h, M1R y M9.2, evidenciaron agrupaciones densas, compatibles con la formación de biopelículas, probablemente como mecanismo de adaptación ante la reducción de nutrientes, especialmente de carbono y nitrógeno.

Respecto al tercer objetivo, la determinación de la viabilidad indicó que el inóculo con mejor velocidad de crecimiento fue M9.2 con una tasa de 3.5, mientras que Mss alcanzó la mayor acumulación de sólidos secos (0.1056 g). Estos datos nos permiten validar la capacidad de ambos inóculos para mantener un desarrollo microbiano eficiente en condiciones de enriquecimiento.

Finalmente, en el cumplimiento del cuarto objetivo, la evaluación espectrofotométrica evidenció que los inóculos Mss y M3 lograron reducciones de absorbancia superiores al 83%. Lo que demuestra una alta capacidad para la degradación de compuestos fenólicos y melanoidinas presentes en la vinaza. No obstante, M3 fue excluido del análisis debido a un sesgo generado por un exceso de KOH. Por lo tanto, Mss se establece como el consorcio más estable y eficiente en términos de remoción de color y MO.

Concluyendo que el enriquecimiento de la fuente de carbono simple y rica en nutrientes favorece a la generación de un consorcio microbiano, capaz de degradar MO y mejorar la eficiencia de un tratamiento biológico de la vinaza, contribuyendo a la disminución del impacto ambiental asociado a su descarga.

Anexo A.

Tabla 1.A. *Composición de la vinaza.* Zelaya et al., (2021), Leal et al., (2003), (Villalobos Castillejos, 2009), (Arenas Montaña, 2017), Aviña et al., (2023), (Caputo, 2020), (Miqueleto Fernandes, 2015), (CONADESUCA, 2016).

Parámetros	Unidad	Cantidad
<i>Potasio</i>	mg/l	1542 a 3961
<i>Cloruro</i>	mg/l	209 a 3550
<i>Magnesio</i>	mg/l	343 a 669
<i>Calcio</i>	mg/l	292 a 641
<i>Sodio</i>	mg/l	27 a 57
<i>Fósforo</i>	mg/kg	0.02 a 25.48
<i>Nitrógeno</i>	mg/l	5.561 a 495
<i>Hierro</i>	mg/l	1.09 a 32
<i>Manganeso</i>	mg/kg	24
<i>Zinc</i>	mg/kg	3.10 a 75
<i>Cobre</i>	mg/kg	2.35 a 8
<i>Cloruro</i>	mg/kg	117
<i>Etanol</i>	g/l	2.2
<i>Butanol</i>	g/l	2
<i>Azúcares</i>	mg/l	2 a 58
<i>Sulfatos</i>	mg/l	14.43 a 842
<i>Fosfatos</i>	mg/l	1.705 a 30
<i>Cenizas</i>	%	6.39
<i>Materia Orgánica</i>	mg/l	2.2 a 3.9
<i>Nitritos</i>	mg/l	3.7 ± 0.6
<i>Amonio</i>	mg/l	456.3 ± 8.4
<i>Nitratos</i>	mg/l	499 ± 13.53
<i>Arsénico</i>	mg/l	<1.0 ± 0
<i>Cromo</i>	mg/l	<1.0 ± 0
<i>Níquel</i>	mg/l	<1.0 ± 0
<i>Ácido isoamílico</i>	g/l	1.3
<i>Fósforo</i>	mg/kg	<0.02
<i>Melanoidinas</i>	mg/l	24.36 ± 0.125
<i>Sólidos totales</i>	mg/l	28,000 a 133,833 ± 577-1,485
<i>Azúcares totales</i>	(%)	1.2 ± 0.9

Bibliografía

- Del Gobbo, L., Pérez Iglesias, J., Américo Almeida, C., Beatriz Villegas, L., & Leticia Colin, V. (2023). Conversion of sugarcane vinasse into biomass of *Aspergillus* sp. V1 and its potential application as a fish feed ingredient. *Process Safety and Environmental Protection*, 177, 391-399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.06.086>
- A.F.R., S., Y.L. , B., K., K., & M.C.S. , A. (2021). Resource recovery from sugarcane vinasse by anaerobic digestion-A review. *Journal of Environmental Management*, 295, 1-19. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479721011993>
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., & Granström , K. (2019). A review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. *Processes*, 2-19.
- Arenas Montaña, V. (2017). *Resistencia de hongos micorrízicos*. Guadalajara, Jalisco: CIATEJ. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/377/1/Valeria%20Arenas.pdf>
- Aristizábal Alzate , C. (2015). Caracterización físico-química de una vinaza resultante de la producción de alcohol de una industria licorera, a partir del aprovechamiento de la caña de azúcar. 6(2), 36-41. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6007731>
- Aviña Ruelas , A., Domínguez Calleros, P., Ordaz Díaz , L., Prieto Ruíz, J., Carrillo Parra, A., & Bailón Salas , A. (2023). Propiedades fisicoquímicas, contenido de fenoles y melanoidinas en una vinaza de sotol de nombre de dios, Durango, México. 4(3), 1417-1432. <https://ojs.southfloridapublishing.com/ojs/index.php/jdev/article/view/2639/2061>
- Aviña Ruelas, A., Domínguez Calleros, P., Ordaz Díaz, L., & Prieto Ruíz , J. (2023). Propiedades fisicoquímicas, contenido de fenoles y melanoidinas en una vinaza de sotol de nombre de dios, Durango, México. *ResearchGate*, 4(3), 1417-1432. https://www.researchgate.net/publication/371843053_Propiedades_fisicoquimicas_contenido_de_fenoles_y_melanoidinas_en_una_vinaza_de_sotol_de_nombre_de_dios_Durango_Mexico
- Beltrán , F., Álvarez , P., Rodríguez , E., Garcia , A., & Rivas , J. (2001). Treatment of high strength distillery wastewater (cherry stillage) by integrated aerobic biological oxidation and ozonation. *Biotechnol Prog*, 3(17), 7-462. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11386866/>
- Brito , L. (sf). Aspectos básicos sobre el manejo y preservación de los cultivos celulares. <https://share.google/z5bRDZw85khy2pUGR>
- Burton , F., Stensel , D., & Tchobanoglous , G. (2014). *Wastewater engineering: treatment and resource recovery*. (5a ed.). Nueva York : McGraw Hill.

- C. Battisti, A., Dos Santos, H. M., S. Alberton, J., Gomes, L. M., K. Raupp, L., R Graciano, M., E. De Oliveira, P., Da Silva Junior, J., & E. Dias, R. C. (2019). Leachate and vinasse used in a biological process combined with Fenton's reaction: a green method for treatment of textile effluents. *Earth Sciences, An. Acad. Bras. Ciênc.*, 19(4).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181156>
- Cajo, L., Nizama , L., & Carreño , C. (2011). Efecto de la concentración del inóculo y la melaza como suplemento de la vinaza de destilería para la producción de biomasa de *Candida utilis* nativa. 2, 65-72. <https://share.google/0F9vSskK1k5fG9y8c>
- Camacho , N., & Torres Sáenz , R. (2010). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas *Pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol. 23(1), 41-46. <https://share.google/lwdvquUL9KtyZpg0C>
- Camacho, R. I., Duharte, L. L., & Leyva Osoria, A. (2018). Caracterización Químico-Física de vinazas de destilerías. *Ciencia en su PC*, 1(2), 1-13.
<https://www.redalyc.org/journal/1813/181358410001/html/#:~:text=En%20el%20proceso%20de%20obtenci%C3%B3n,sobre%20la%20flora%20y%20fauna.>
- Caputo, M. (2020). *Estudio de la composición orgánica de la vinaza*. Buenos Aires: SEDICI.
https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/111902/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Christofoletti , C., Escher , J., Correia, J., Urbano Marinho , J., & Fontanetti , C. (2013). Sugarcane vinasse: Enviromental implications of its use: a review. *Waste Management*, 33, 2752-2761.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X1300408X>
- CIATEJ. (2014). *Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense*. Produce de Guerrero.
<https://ciatej.mx/dyd/manualmezcalguerrerense.pdf>
- CONADESUCA. (2016). *Vinazas: Alternativas de uso*. MÉXICO: CONADESUCA.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/171932/Nota_Informativa_Septiembre_Vinazas.pdf
- Constanza Corrales Ramírez , L., & Caycedo Lozano, L. (2019). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. 18(33), 73-100.
<https://doi.org/https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Contreras M, E., Bertola C, N., Glannuzzi , L., & Zaritzky , N. (2001). Un método alternativo para la determinación de biomasa en cultivos puros y sistemas de barros activados.
<https://share.google/diFyCEAjh7Zy4O6j6>
- Corrales , L., Ávila de Navia, S., & Estupiñan , S. (2013). *Bacteriología teoría y práctica*.
- Corrales Ramírez , L., & Caycedo Lozano , L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. 18(33), 73-100.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702020000100073

- Cortéz, L. (1992). Principais subprodutos da agroindústria canaveira e sua valorização. *Revista Brasileira de Energia*, 2(2), 1-17.
<https://sbpe.org.br/index.php/rbe/article/download/45/45/>
- CRM. (00 de Febrero de 2019). El Mezcal. La cultura líquida de México. *Oaxaca Juárez*, pág. 1.
- Cuello , C., Flores , B., Rivera , J., & Rodríguez , J. (2018). Quantitative Characterization of Nonstructural Carbohydrates of Mezcal Agave (Agave salmiana Otto ex Salm-Dick). 56(14). <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf800158p>
- Dávila Rincón, J., Machuca Martínez, F., & Marrianga Cabrales, N. (2019). Caracterización físico-química de vinazas de destilerías. *Rev Cub Quim*, 31(2).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212019000200246
- Del Gobbo, L. M., Pérez Iglesias, J. M., Américo Almeida, C., Beatriz Villegas, L., & Leticia Colín, V. (2019). Conversion of sugarcane vinasse into biomass of *Aspergillus* sp. V1 and its potential application as a fish feed ingredient. *Process Safety and Environmental Protection*(177), 391-399. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.06.086>
- Díaz , M., Madejón , E., López, F., López , F., & Cabrera , F. (2002). Composting of vinasse and cotton gin waste by using two different systems. *Resources, Conservatio and Recycling*, 34(4), 235-248.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921344901001094>
- Díaz , S., Garzón, M., & Moreno , I. (2020). Tratamiento de vinazas de mezcal: revisión de procesos y propuesta de tren de tratamiento. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 11(28), 216-220.
<https://rlac.buap.mx/sites/default/files/11%20%2828%29-49.pdf>
- Echeverriborda , G., Mesa, F., Chalar, G., Kruk , C., & Piccini, C. (2022). Experiencia de aplicación de microorganismos efectivos nativos (MEN) para el tratamiento de aguas residuales. (24).
<https://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/view/623/1383#:~:text=Microorganismos%20efectivos:%20el%20biopreparado%20La%20tecnolog%C3%ADa%20de,un%20consorcio%20de%20microorganismos%20de%20origen%20natural.>
- Espinosa Ayala, G., Rivas Morales , C., Arévalo Niño , Oranday Cárdenas , A., Cruz Vega , D., Castro Garza , J., & Carranza Rosales , P. (2007). Diseño de un medio de cultivo para células de mamífero utilizando fuentes de nitrógeno y vitaminas. 6(3).
<https://share.google/g0L8cHc1P6FW6jOwn>
- Fernández, A. (2012). El agua: un recurso esencial. *Química Viva*, 147-170.
<https://www.redalyc.org/pdf/863/86325090002.pdf>
- Fernández, C., Martínez , J., Morán , A., & Gómez , X. (2016). Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. *ION*, 47-62.

<https://www.researchgate.net/publication/305416427> *Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogas e hidrogeno Revisión bibliográfica*

Franco May , D., & Mancilla Montelongo , M. (2023). El espectro invisible: una fuente de luz en la investigación científica de productos naturales. *16*(2).

<https://share.google/Cm6NETDFkToguXMym>

Fuess , L., & Garcia , M. (2014). Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, *145*, 210-229.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479714003351>

Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. (s.f.). *Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento*. Valencia: Riunet.

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez%20-%20Estimacion%20de%20la%20Densidad%20Celular.pdf>

Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. (sf). *Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento*. Valencia: Riunet.

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez%20-%20Estimacion%20de%20la%20Densidad%20Celular.pdf>

Gamboa , E., Mijangos , C., Pérez , B., Domínguez , M., & Hernández , A. (2011). Vinasses: characyerization and treatments . *Waste Manag*, 1235-1250.

García , H., Rodiles C., C., López Rueda, V., & Gutiérrez H, R. (s.f.). *Adaptación de consorcio de microorganismos nativos para el tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica*. Tapachula: SMBB.

https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VII/CARTEL/CVII-3.pdf

González Meléndez , R., Elizalde Cuevas , B., Cortés Cruz , M., & Orduña Sánchez , M. (2020).

Las tinciones básicas en el Laboratorio en Microbiología: Un enfoque gráfico. México: FES. <https://share.google/YanGJhXUS4oCp3UL4>

Gschaedler Mathis, A., Gallardo Valdez, J., & Villanueva Rodríguez , S. (sf). El proceso de elaboración del Mezcal en el estado de Michoacán.

<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/758/1/El%20proceso%20de%20elaboraci%C3%B3n%20del%20mezcal.pdf>

Guerra P, M., & Castro F. , J. (2020). Evaluación de viabilidad de microorganismos. En *Conformación de colecciones de cultivos microbianos* (págs. 139-153). Chillán, Chile.

<https://share.google/g9cujes3QTDRCF3vp>

Hernández Monzón , A., Madernás Sánchez, D., Pérez Argüelles , R., Trujillo Pérez , G., González Góngara , I., & Díaz Abreu , J. (2019). Desarrollo de una bebida elaborada con harina de arroz y ajonjolí (*Sesamum Indicum*) y fermentada con cultivos probióticos. *39*(1). <https://www.redalyc.org/journal/4455/445558836007/html/>

- Hernández Pérez , L., Chávez Quiroz , K., Medina Juárez , L., & Gómez Meza , N. (2013). Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de cafe verde y procesado de las especies. *15*(1), 51-56. <https://share.google/B7erncYR2lzSIFWSB>
- Lafratta, M., Thorpe, R., Ouki , S., Shana, A., Germain, E., Willcocks , M., & Lee, J. (2021). Development and validation of a dynamic first order kinetics model of a periodically operated well-mixed vessel for anaerobic digestion. *ELSEVIER*, *426*, 1-17. <https://sciencedirect.bibliotecabuap.elogim.com/science/article/pii/S1385894721033131#b0315>
- Leal G, I., Chirinos, E., Leal, M., Morán , H., & Barrera , W. (2003). Caracterización fisicoquímica de la vinaza del Agave cocui y su posible uso agroindustrial. *Multiciencias*, *3*(2), 1-12. <https://www.redalyc.org/pdf/904/90430202.pdf>
- Leber, A. (2016). *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (4a. ed.). Washington, DC.: ASM press. <https://doi.org/>: <https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch3.2.1>
- López Nava , G., Martínez Flores, J., Cavazos Arroyo , J., & Mayett Moreno Yesica. (2014). La cadena de suministro del mezcal del estado de Zacatecas. Situación actual y perspectivas de desarrollo. *59*(2). <https://www.redalyc.org/pdf/395/39530479010.pdf>
- Ma, Q., Yi, J., Tang , Y., Geng , Z., Zhang, C., Sun , W., Liu, Z., Xiong, W., Wu, H., & Xie, X. (2024). Co-utilization of carbon sources in microorganisms for the bioproduction of chemicals. *73*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975024000740>
- Mastranzo, E. M. (2023). Caracterización de los Subproductos Obtenidos a Partir del Tratamiento Fisicoquímico de Vinaza Resultante de la producción de Mezcal. Puebla. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/7668d327-941e-4ef2-9fd2-db7c3bce15a3/content>
- Mezcaloteca. (2021). Destilación en ollas de barro.
- Mezcalunion. (2025). *Mezcal Unión*. Mezcal Unión . <https://mu.diego.mx/>
- Miqueleto Fernandes, A. (2015). Tecnologías Utilizadas en el Tratamiento y Disposición de la Vinaza. *Cengicana*, 159-202. <https://cengicana.org/files/20150828053607189.pdf>
- Montaño , M., Bissoto, R., de Souza, R., Cárdenas , V., & Bastos, R. (2019). Growth of *Desmodesmus subspicatus* green microalgae and nutrient removal from sugarcane vinasse clarified by electrocoagulation using aluminum or iron electrodes. *Dyna*, 225-232. <https://doi.org/><https://doi.org/10.15446/dyna.v86n211.72379>
- Montiel Rosales , A. (2022). Post-Industrial Use of sugarcane Ethanol Vinasse: A Systematic Review. *Sustainability*, *14*(18). <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/18/11635>
- Mora Z., A., Chávez H, C., Fonseca, G., Cabra A, J., & Carmona Salgado, Y. (2005). Desarrollo de un inóculo microbiano empleando lodos activados para la remoción de ácido sulfhídrico (H₂S) mediante biofiltración. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *VII*(2), 26-34. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77670205.pdf>

- Muloiwa , M., Nyende Byakika , S., & Dinka , M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. 33, 141-150.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1026918520300391>
- Nogales , L. (2017). *Mezcología*. Recuperado el 10 de 09 de 2025, de Mezcología .
<https://mezcologia.mx/mezcal-ancestral/>
- NORMEX, S. M. (2019). NMX-V-013-NORMEX-2019. México.
<https://platiica.economia.gob.mx/normalizacion/nmx-v-013-normex-2019/>
- Ojeda Armaignac , E., & Hing Cortón , R. (2010). *Estudio del proceso de electrocoagulación de la vinaza empleando electrodos de aluminio* (Vol. XX). Cuba: Tecnología Química.
<https://share.google/QskUXshiMADcccdH8Y>
- Padhila de Souza , R., Ferrari Lima, A., Pezoti, O., Sluzarski, O., Fernandes Machado , N., & Gimenes , M. (2016). Photodegradation of sugarcane vinasse: evaluation of the effect of vinasse pre-treatment and the crystalline phase of TiO₂. (38), 217-226.
<https://www.redalyc.org/journal/3032/303245370011/>
- Padilha de Souza , R., Ferrari Lima , A., & Pezoti , O. (2015). Photodegradation of sugarcane vinasse: evaluation of the effect of vinasse pre-treatment and the crystalline phase of TiO₂. <https://share.google/7eeAlWke3eRb6TkFC>
- Parsaee, M., Mostafa , K., & Keikhosro, K. (2019). A review of gas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy*, 117-125.
<https://pdf.sciencedirectassets.com/271477/1-s2.0-S0961953419X00021/1-s2.0-S0961953419300431/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjECoaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIQDGkPnRwqdLO%2BqgCnV7aa8dHJy5Zi24qk4bp3z4%2BGf5MglGhV56QH6kT9tC2le3ML549C%2BjTW0ShcSydQUsc>
- Patrón Esquivel, C. A. (2015). *Alimentos y bebidas de los pueblos indígenas de México 2*. México: Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas.
<https://www.inpi.gob.mx/investigacion/mezcal-alimentos-bebidas-pueblos-indigenas.pdf>
- Pérez, S. D. (2021). Residuos de agave en el proceso de producción de mezcal artesanal en el valle de tehuacán-cuicatlán. Cuernavaca.
<https://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/2316/SUPEDI01T.pdf>
- Ramírez S. , J., Parra V., J., & Álvarez Aldana, A. (s.f.). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Portal de revistas*, 1-8.
- Ramos, L. R., & Silva, E. L. (2018). Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *ScienceDirect*, 43, 13081-13089. <https://pdf.sciencedirectassets.com/271472/1-s2.0-S0360319918X00263/1-s2.0-S0360319918315854/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjED8aCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQCUPanl%2FU3hOduhGHR>

OSrK9e9TUwA6UcBKTqTmFyPZGcQIhAMW6h5PJ5%2FE4m1g%2FjeAZJql8zpzkgT6x4p
vIHL

- Rodríguez , P., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Mediagraphic*, 16(2), 166-167. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rodríguez Cortés , A. (2016). Fermentación Anaerobia de la vinaza mezcalera para la obtención de productos de calor industrial. Puebla.
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/cae19f03-ae69-43b9-af87-6c4c8fd4577f/content>
- Rodríguez, A., & De la Cerna , C. (2017). El mezcal, su producción y tratamiento de residuos. *Alianzas y Tendencias*, 2(8), 4-10. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9211>
- Rojo, M., Talia, P., Lerena , M., Gómez Rodríguez , F., López Arroyo, F., Combina , M., Ponsone Gonzalez , M., Becerra, L., Mercado , L., & Arranz Martín , V. (2023). Evaluation of different nitrogen sources on growth and fermentation performance for enhancing ethanol production by wine yeasts. *Cell Press*, 9(12).
[https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(23\)09816-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS240584402309816X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(23)09816-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS240584402309816X%3Fshowall%3Dtrue)
- Ruiz, F. T. (s.f.). Mezcal Fermentation. 1.
https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/simposios/simposio_bebidas_mexicanas/FRANCISCO_RUIZ.pdf
- Sami, M., Ikeda, M., & Yobuuchi, S. (1994). Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. 78(3).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0922338X94902925>
- Sandle, T. (2021). Assessing gram-stain error rates within the pharmaceutical microbiology laboratory. *EJPPS*, 25(3). <https://www.ejpps.online/post/vol25-1-assessing-gram-stain-error-rates-within-the-pharmaceutical-microbiology>
- Santos , S., Rosa , P., Sakamoto , I., Varesche , M., & Silva , E. (2014). Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *ScienceDirect*, 30, 1-12.
https://www.academia.edu/101475350/Hydrogen_production_from_diluted_and_raw_sugarcane_vinasse_under_thermophilic_anaerobic_conditions
- Sanz Cervera, S. (2011). *Prácticas de Microbiología*. Universidad de La Rioja.
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/libro/100835.pdf>
- SCFI, S. d. (2016). *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*.
https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- SEMARNAT. (1997). *NOM-005-SEMARNAT-1997*. México.
<https://platiica.economia.gob.mx/normalizacion/nom-005-semarnat-1997/>

- SRE. (2011). *Monografía del Mezcal*.
<https://embamex.sre.gob.mx/belice/images/stories/docs/mezcal.pdf>
- SSA1, C. C. (2009). *NORMA Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios*.
<https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
- Torres , M., Malinar, V., Pajot Hipolito, F., Castellanos , L., & Nieto Peñalver, C. (2019). *Vinaza como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos con potencial biotecnológico*. Asociación Argentina de Microbiología.
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/181959>
- UnADM. (2011). *Microbiología y taxonomía microbiana*.
https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/03/BMTM/unidad_02/descargables/BMTM_U2_Contenido.pdf
- Vega Soto , C., Pérez Bravo , F., & Mariotti Celis , M. (2023). Cantidad, estabilidad y digestibilidad de hidratos de carbono tras el proceso de extrusión: Impacto sobre el índice glicémico de harinas de consumo habitual en Chile. *Revista Chilena de nutrición* , 50(2), 233-241.
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182023000200233&lng=es.](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182023000200233&lng=es)
- Villalobos Castillejos, F. (2009). *Disminución de la materia orgánica*. Huajuapán de León, Oaxaca: JUPITER . http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10960.pdf
- Virrueta Alatorre, J., & Ortega Guzmán , D. (2023). *Cámara de Neubauer*. Guanajuato: Veranos UGTO. http://www.veranos.ugto.mx/wp-content/uploads/2023/09/Infografia-3_Ca%CC%81mara-de-Neubauer_Gustavo-Nin%CC%83o_Tannia-Razo.pdf
- Wall, J., Harwood, C., & Demain, A. (2008). Optimizing Mixed-Culture Bioprocessing To Convert Wastes into Bioenergy. *Bioenergy*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555815547.ch15>
- Wei-Chin, K., Yee-Shian , W., Soon-An, O., Nabilah Aminah, L., Sung-Ting , S., Audrey , C., & Kim-Mun, E. (2022). Photocatalytic Degradation of Sugarcane Vinasse Using ZnO Photocatalyst: Operating Parameters, Kinetic Studies, Phytotoxicity Assessments, and Reusability. *Int J Environ Res*, 16(3), 3-13.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s41742-021-00382-6>
- Zara , G., Marilena , B., Mannazzu , I., Fancello, F., & Zara , S. (2020). Biopelícula de levadura en el ámbito alimentario: incidencia y control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 36(134). [https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-020-02911-5#:~:text=Conclusiones,alimentarias%20y%20el%20medio%20ambiente.](https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-020-02911-5#:~:text=Conclusiones,alimentarias%20y%20el%20medio%20ambiente)
- Zelaya Benavidez, E., Martínez Gutiérrez, G., Escamirosa Tinoco, C., & Morales , I. (31 de Octubre de 2021). Vinazas de mezcal y su efecto biofertilizante en el rendimiento de hortalizas. *SCIELO*, 8(3). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-90282021000300004&script=sci_abstract

- Zúñiga Cerón , V., & Gandini Ayerbe, M. (2013). Caracterización ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol . *SCIELO*, 80(177). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532013000100015
- Zúñiga Cerón, V., & Gandini Ayerbe, M. A. (2013). Caracterizaación ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol. *Revistas Unal*. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/download/27518/43731?inline=1>