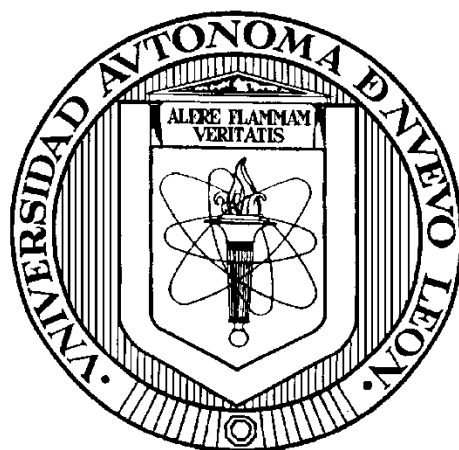


# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas

División de Estudios de Posgrado

Doctorado en Ciencias con Orientación en Procesos Sustentables



## MODELADO MATEMÁTICO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO POR *Clostridium beijerinckii*

Por

**JONATHAN VALENTÍN REYES**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** con orientación en procesos sustentables.

Agosto, 2018

# **Modelado matemático de la producción de biohidrógeno por *Clostridium beijerinckii***

AUTORIZACIÓN DE TESIS:

---

**DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES**  
**PRESIDENTE**

---

**D--**  
**SECRETARIO**

---

**DR. -**  
**VOCAL**

---

**DRA. MA. ARACELY HERNÁNDEZ RAMÍREZ.**  
**SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

# Modelado matemático de la producción de biohidrógeno por *Clostridium beijerinckii*

## Comité de evaluación

---

Dra. María Teresa Garza González  
**Revisor**

---

Dr. Felipe de Jesús Cerino Córdova  
**Revisor**

---

Dr. Pasiano Rivas García  
**Revisor**

---

Dr. Oscar Francisco Huerta Guevara  
**Revisor**

---

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia  
**Revisor**

## AGRADECIMIENTOS

Presento mis más sinceros y humildes agradecimientos a mi asesor, **Dr. Refugio Bernardo García Reyes**, por su constante apoyo durante el periodo de mi formación como profesionista, y a todos los años en que he tenido la oportunidad de aprender y adquirir su gran experiencia, además de la gran confianza y respeto que se generó durante el tiempo que ha sido mi asesor.

Mis agradecimientos a la **Dra. Alcione García González**, por su apoyo con material, equipo y disponibilidad a brindarme apoyo en lo que ocupaba con la finalidad de que culminara mis objetivos.

Un especial agradecimiento a mi comité de evaluación conformado por la **Dra. María Teresa Garza González, Dr. Felipe de Jesús Cerino Córdova, Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia, Dr. Pasiano Rivas García y Dr. Oscar Francisco Huerta Guevara**, gracias por propiciarme la base para formar a un nuevo investigador, espero en un futuro trabajar a la par con ustedes.

Expreso mis más grandes agradecimientos a la **Dra. María de los Ángeles García Hernández, Dra. Carina Agaep Sáenz Alanís y M.C. María de la Luz De León Garza**, por su apoyo, consejos y tiempo compartido durante mi estancia en el posgrado y que forjaron una gran amistad única e irrepetible.

Sin embargo, este proyecto fue en gran parte ayudado por personas que en su momento entregaron todo a que culminara mis objetivos, por lo que le debo un sumo agradecimiento a los colegas **Roberto Tadeo Vidales Zúñiga, Esteban Delabra Tamayo y Gustavo Mendoza Quezada**, gracias por aguantar las múltiples rutinas de trabajo y exigencias en el laboratorio.

Muchas gracias al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico para la realización de este proyecto

Y, sobre todo, aunque no hace falta mencionarlos, saben que siempre estoy y estaré agradecido con mis familiares y amigos que me brindaron apoyo en esos momentos críticos de mi vida.



## DEDICATORIA

*A mi familia y amigos por su apoyo y amor incondicional*

# RESUMEN

Jonathan Valentín Reyes

Fecha de graduación: Agosto, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: MODELADO MATEMÁTICO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO POR  
*Clostridium beijerinckii*

Número de páginas: 69

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias  
con orientación en Procesos Sustentables

Área de estudio: Procesos sustentables

**Propósito y método de estudio:** La actual demanda energética y el acelerado crecimiento industrial ha permitido el desarrollo de un nuevo enfoque técnico y económico en el uso de energías alternas renovables como nuevas fuentes sustentables al habitual consumo de combustibles fósiles. Los procesos biológicos anaerobios son una opción viable económicamente debido a la generación de bioenergéticos, asimismo contribuye a la disminución de emisión de GEI a la atmósfera terrestre. Sin embargo, estos procesos presentan varias limitaciones que impiden su implementación entre las que destacan la complejidad de los procesos bioquímicos, diversidad de microorganismos, así como limitaciones operacionales. Estas limitaciones han contribuido al desarrollo de modelos matemáticos robustos que puedan representar los múltiples fenómenos involucrados en los procesos anaerobios y, de esta manera, ser usados como una herramienta de diseño, operación y control de procesos. En los últimos años, el modelo de digestión anaerobia No.1 (ADM1) ha sido el modelo más estructurado y completo para describir los procesos de digestión anaerobia, y recientemente ha sido implementado para describir los procesos biológicos de fermentación oscura para la producción de biohidrógeno. En el presente proyecto, se realizó la modelación matemática del proceso de fermentación oscura basada en el modelo ADM1, el modelo fue validado usando datos experimentales usando una cepa pura de *C. beijerinckii*.

**Contribución y conclusiones:** Se evaluó la producción de biohidrógeno por fermentación oscura utilizando *Clostridium beijerinckii*, el cual mostró un rendimiento de 3.58 mol H<sub>2</sub>/mol de sustrato y ácido butírico, ácido acético y etanol como subproductos de la fermentación presentes en la fase líquida. Los datos experimentales de las pruebas BHP fueron usados para validar el modelo propuesto, mostrando una correlación aceptable ( $R^2 > 0.92$ ) entre los datos experimentales y los perfiles dinámicos de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y subproductos de la fermentación.

Firma del asesor:

Dr. Refugio Bernardo García Reyes

# Índice General

Contenido	Página
AUTORIZACIÓN DE TESIS .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIA .....	v
RESUMEN .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
NOMENCLATURA .....	xii
1. Introducción.....	1
1.1 Bioenergéticos como fuente de energía renovable .....	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 Digestión anaerobia .....	5
2.2 Fermentación oscura.....	14
2.3 Simulación de procesos biológicos anaerobios.....	15
2.3.1 Modelo de digestión anaerobia No. 1 (ADM1) .....	16
2.3.2 Consideraciones y limitaciones de ADM1 .....	23
2.3.3 Extensiones y aplicaciones de ADM1 .....	27
2.3.4 Implementación de ADM1 en la producción de hidrógeno.....	30
2.4 Acidificación de procesos biológicos anaerobios .....	30
3. Hipótesis .....	31
4. Aportación científica.....	32
5. Objetivos y metas .....	32
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares .....	32
6. Metodología experimental .....	34
6.1 Desarrollo de ADM1 .....	34
6.1.1 Procesos de naturaleza bioquímica .....	35
6.1.2 Procesos de naturaleza fisicoquímica .....	38
6.1.3 Procesos de transferencia de masa .....	39

6.2	Modificación del ADM1 para fermentación oscura .....	40
6.2.1	Procesos de naturaleza bioquímica .....	41
6.2.2	Procesos de naturaleza fisicoquímica.....	44
6.2.3	Procesos de transferencia de masa .....	44
6.3	Condiciones de cultivo de <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	46
6.4	Cinéticas de crecimiento microbiano .....	47
6.5	Pruebas de potencial bioquímico de hidrógeno (BPH) .....	47
6.6	Métodos analíticos .....	47
6.7	Disposición de residuos .....	48
7.	Resultados y discusión.....	49
7.1	Calibración del modelo ADM1.....	49
7.2	Cinéticas de crecimiento de <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	52
7.3	Simulación del proceso de fermentación oscura .....	53
8.	Conclusiones .....	61
9.	Referencias bibliográficas.....	63



# Índice de tablas

<b>Título</b>	<b>Encabezado de tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b>	Etapas consideradas en la digestión anaerobia.	6
<b>Tabla 2.</b>	Compuestos inorgánicos inhibitorios en el proceso de digestión anaerobia.	9
<b>Tabla 3.</b>	Ventajas y desventajas de un tratamiento anaerobio comparado con un proceso aerobio.	13
<b>Tabla 4.</b>	Reacciones de asociación-disociación involucradas en ADM1.	20
<b>Tabla 5.</b>	Valores de los parámetros de la transferencia líquido-gas.	23
<b>Tabla 6.</b>	Principales extensiones implementadas a ADM1.	28
<b>Tabla 7.</b>	Principales extensiones implementadas a ADM1.	29
<b>Tabla 8.</b>	Reacciones catabólicas implicadas en el modelo bioquímico de ADM1.	36
<b>Tabla 9.</b>	Reacciones catabólicas del modelo bioquímico de ADM1.	41
<b>Tabla 10.</b>	Reacciones catabólicas implicadas en el modelo bioquímico de ADM1.	42
<b>Tabla 11.</b>	Ecuaciones diferenciales de los procesos de transferencia de masa.	45
<b>Tabla 12.</b>	Valores de los parámetros estequiométricos modificados para ADM1.	53

# Índice de figuras

Título	Pie de figura	Página
<b>Figura 1.</b>	Esquema del proceso anaerobio de las etapas de hidrólisis, fermentación, y metanogénesis	7
<b>Figura 2.</b>	Procesos de conversión en digestión anaerobia consideradas por el ADM1. Las reacciones bioquímicas son irreversibles, mientras que las fisicoquímicas son reversibles. AA = Aminoácidos; MS = Monosacáridos; AAc = Ácido Acético; APr = Ácido Propiónico; ABu = Ácido Butírico; AVa = Ácido Valérico; AGCL = Ácidos Grasos de Cadena Larga; Ac <sup>-</sup> =Acetato; Pr <sup>-</sup> = Propionato; Bu <sup>-</sup> = Butirato; Va <sup>-</sup> = Valerato; AGCL <sup>-</sup> = Base conjugada del AGCL.	17
<b>Figura 3.</b>	Flujo de la demanda química de oxígeno (DQO) de materia orgánica compuesta por 10% de material inerte y 30% de cada fracción de carbohidratos, proteínas y lípidos. El APr (10%), ABu (12%) y AVa(7%) son agrupados por simplicidad. AA = Aminoácidos; MS = Monosacáridos; AAc = Ácido Acético; APr = Ácido Propiónico; ABu = Ácido Butírico; AVa = Ácido Valérico.	18
<b>Figura 4.</b>	Descripción los términos implícitos en las tasas bioquímicos de reacción.	38
<b>Figura 5.</b>	Evaluación del factor de inhibición por pH para bacterias acidogénicas usando diferentes funciones matemáticas: (●) Discontinua, (▲) Tangente hiperbólica, (■) Hill y (◆) Siegrist.	43

<b>Figura 6.</b>	a) Volumen acumulado de hidrógeno (mL), b) Consumo de sustrato (g DQO/L) y c) perfil dinámico del pH en los reactores en lotes (sin medio buffer). Los puntos representan los datos experimentales reportados por Gadamshetty et al. (experimento IPR22) y las líneas continuas son generadas por el presente modelo.	50
<b>Figura 7.</b>	Balance dinámico de masa del modelo de fermentación oscura.	52
<b>Figura 8.</b>	Cinética de crecimiento tipo Monod para la bacteria <i>C. beijerinckii</i> a diferentes concentraciones de dextrosa.	52
<b>Figura 9.</b>	(a) Cinética de crecimiento de la bacteria <i>C. beijerinckii</i> , los datos experimentales son medidos como absorbancia (eje izquierdo) y los simulados medidos en kg DQO/m <sup>3</sup> (eje derecho); (b) consumo de dextrosa. Los datos experimentales son mostrados como puntos y las líneas representan los datos simulados.	54
<b>Figura 10.</b>	(a) Volumen acumulado de hidrógeno a condiciones estándar (0°C, 1 atm) y (b) subproductos de la fermentación en la fase líquida: (●) alcohol etílico, (■) ácido butírico y (▽) ácido acético. Los datos experimentales son mostrados como puntos y las líneas representan los datos simulados.	57
<b>Figura 11.</b>	Volumen acumulado de hidrógeno producido por <i>C. beijerinckii</i> : (●) datos experimentales, modelo de Gompertz (líneas discontinuas) y el modelo propuesto (línea continua).	59

# Nomenclatura

---

<b>GEI</b>	Gases de Efecto Invernadero
<b>DA</b>	Digestión Anaerobia
<b>ADM1</b>	<i>Anaerobic Digestion Model No.1</i>
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno
<b>SV</b>	Sólidos Volátiles
<b>ST</b>	Sólidos Totales
<b>AGCL</b>	Ácidos Grasos de Cadena Larga
<b>AGV</b>	Ácidos Grasos Volátiles
<b>SENER</b>	Secretaría de Energía
<b>RSU</b>	Residuos Sólidos Urbanos
<b>TRS</b>	Tiempo de Retención de Sólidos
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>IWA</b>	<i>International Water Association</i>
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>RK4</b>	Runge Kutta de cuarto orden
<b>DNS</b>	Ácido dinitro salicílico
<b>FID</b>	Detector de Ionización de Flama
<b>TCD</b>	Detector de conductividad térmica

## Introducción

### 1.1 Bioenergéticos como fuente de energía renovable

El acelerado crecimiento industrial demanda una mayor cantidad de energía para cubrir sus necesidades. Por esta razón, los temas de energía renovable y eficiencia energética a nivel mundial han cobrado una mayor importancia. Estos temas son críticos no sólo para atender los continuos efectos del cambio climático, sino para crear nuevas tecnologías en el sector energético y cubrir la demanda de energía de la población e industrial de energía.

El desarrollo de nuevas políticas económicas y energéticas ha permitido el uso de tecnologías alternas impulsando la baja de costos para la producción energética. La implementación de energías renovables ha sido reconocida como una de las alternativas más prometedoras que permitirán superar los problemas del presente sistema energético basado en consumo de combustibles fósiles.

En el 2014, el gradual consumo de energía y el alza en los precios del petróleo incrementaron de manera sustancial la implementación de energías renovables, en términos de capacidad instalada y energía producida, superando las inversiones netas para plantas de energías de combustibles fósiles. En la actualidad, las tecnologías verdes y renovables se han convertido en las principales fuentes de energía proporcionando un estimado del 19.1% del consumo total de energía a nivel mundial en el 2013.

Aunque la incursión de diversas tecnologías sustentables de energía en el mercado ha experimentado una rápida expansión aún se encuentra en investigación y desarrollo el término de eficiencia energética para cumplir con el objetivo de generar energía sostenible. A pesar de que el consumo de energía continúa en crecimiento, las emisiones mundiales se han mantenido estables durante las últimas cuatro décadas, hecho que se ha atribuido principalmente a la incursión de tecnologías renovables en el ámbito energético<sup>1</sup>.

En términos de reducción de índices de contaminación, el desarrollo de la bioenergía ha contribuido a la diversificación energética y al mismo tiempo la mitigación de gases de efecto invernadero (GEI). En México, se estima que para el año 2030 la bioenergía podría abastecer hasta un 16% del consumo total de energía y permitir una reducción anual de emisiones de 110 megatoneladas de dióxido de carbono a la atmósfera<sup>2</sup>.

Los procesos biológicos anaerobios han sido reconocidos como una tecnología sustentable y viable económicamente debido a que estos procesos generan una gran variedad de energéticos importantes como metanol, etanol, butanol, metano e hidrógeno a partir de biomasa y materiales de desecho<sup>3</sup>, además durante el proceso también se generan subproductos líquidos y sólidos que pueden ser utilizados como fertilizantes orgánicos o materiales de valor agregado.

Entre los distintos bioenergéticos producidos durante los procesos anaerobios, el biogás (producto principal del proceso biológico de digestión anaerobia) ha tenido aplicaciones interesantes como combustible doméstico (poder calorífico de 4.5-5.6 Mcal/m<sup>3</sup>), generación de vapor y electricidad (poder de cogeneración de 6 kWh/m<sup>3</sup>)<sup>4</sup> debido a que está conformado principalmente por CH<sub>4</sub> (50%-70%) y CO<sub>2</sub> (30%-50%).

La secretaría de energía (SENER) considera que existe un potencial de 3,000 MW para generación de energía eléctrica con biogás proveniente de la recuperación y aprovechamiento del metano a partir de residuos animales, residuos sólidos urbanos (RSU) y tratamiento de aguas negras<sup>5</sup>.

Por otra parte, el hidrógeno ha sido identificado como una fuente prometedora de energía, alterna a los combustibles fósiles, el cual cuenta con una alta densidad energética (142 MJ/kg, 1 kg de hidrógeno equivale a 2.78 kg de gasolina) y eficiencias superiores al 80% para la co-generación de electricidad aunado al hecho de que el producto principal de su combustión es agua<sup>6</sup>. No obstante, el hidrógeno comercial es producido principalmente a través del reformado termocatalítico de compuestos orgánicos ricos en hidrógeno y de combustibles fósiles (96%), así como la electrólisis del agua, los cuales resultan ser procesos no sustentables debido al intenso consumo de energía y de la constante producción de GEI<sup>7</sup>.

En contraste, el hidrógeno puede ser producido a través de un proceso biológico anaerobio denominado fermentación oscura, la cual presenta ventajas importantes sobre los métodos convencionales entre las que destacan: disminución de emisiones de GEI y residuos orgánicos al ser usados como sustratos para mantener la actividad metabólica de los microorganismos generadores de hidrógeno<sup>8</sup>.

La incursión de métodos biológicos anaerobios en los sistemas de tratamientos de aguas permite disminuir la concentración de carga orgánica de los efluentes generando beneficios importantes como la producción de bioenergéticos.

Con relación a problemas de contaminación, el uso de biogás para generación de energía eléctrica mitiga emisiones GEI en un 80% con respecto a las emitidas por el uso de carbón y un 20% respecto a las emisiones generadas por el uso de gas natural; por otro lado, el uso de biogás para la generación de energía térmica disminuye un 60% las emisiones GEI en comparación a las generadas por el consumo de gas natural y un 40% de las emitidas por el uso de petróleo<sup>9</sup>.

El presente trabajo se enfoca en la simulación de los procesos involucrados en la fermentación oscura con el objetivo de simular y modelar la tasa de producción de bioenergéticos como iniciativa para el desarrollo de una herramienta digital en el análisis y control de procesos al usar esta tecnología alterna de energía renovable.



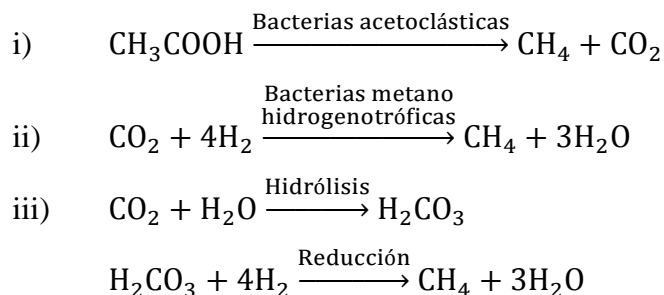
## Antecedentes

### 2.1 Digestión anaerobia

Los procesos de digestión anaerobia (DA) consisten en un conjunto de reacciones bioquímicas complejas llevadas a cabo por diversos tipos de microorganismos que requieren la ausencia de oxígeno para sobrevivir.

Durante este proceso anóxico, se produce un gas principalmente compuesto por metano y dióxido de carbono, denominado biogás<sup>10</sup>. La conversión global de la materia orgánica en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se divide en cuatro etapas fundamentales: hidrólisis, acidificación, acetogénesis y metanogénesis (Tabla 1). Cada una de las etapas de digestión anaerobia es mediada por diversos grupos de microorganismos que a su vez producen compuestos que son asimilados por consorcios diferentes siguiendo una compleja ruta metabólica hasta su completa degradación en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

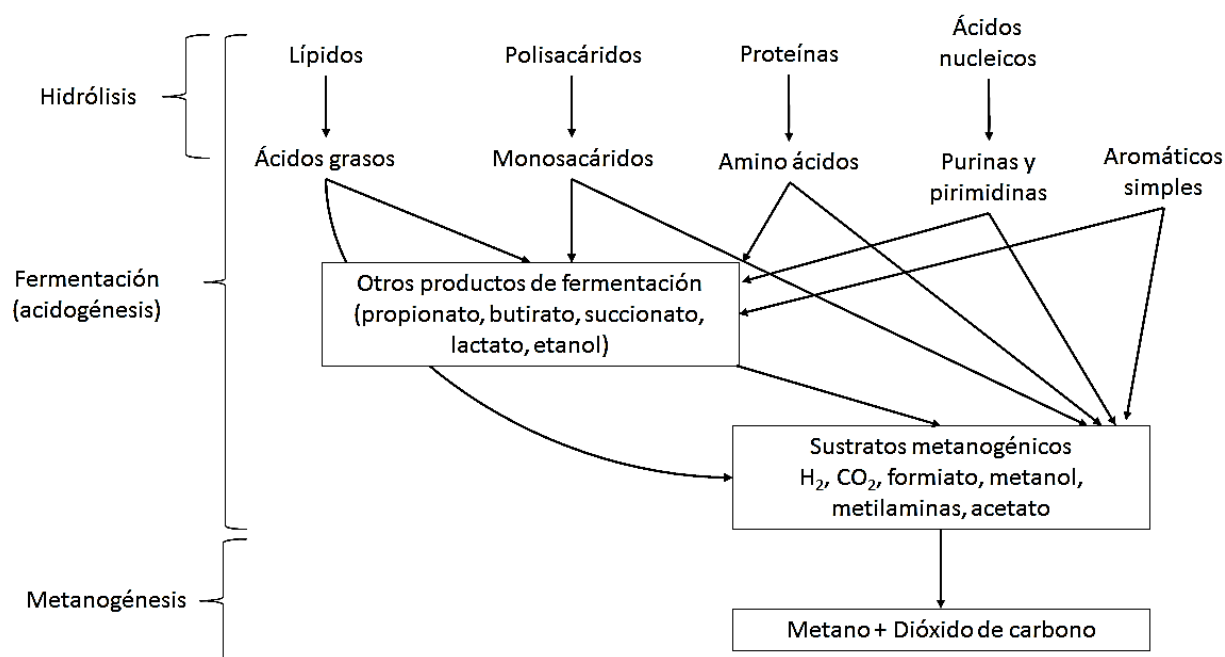
Las reacciones principales que participan en la metanogénesis incluyen:



**Tabla 1.** Etapas consideradas en la digestión anaerobia<sup>10</sup>.

<b>Etapas</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Características del proceso</b>	<b>Producto</b>
<i>Hidrólisis</i>	Macromoléculas (proteínas, polisacáridos, grasas) -Compuestos que componen la masa celular de microorganismos	Proceso lento, limita la velocidad global de la DA. Uso de enzimas microbianas ♦ Hidrolasas ♦ Liasas	Moléculas pequeñas solubles en agua (péptidos, sacáridos y ácidos grasos).
<i>Acidificación ó acidogénesis</i>	Moléculas hidrolizadas (productos de la hidrólisis enzimática)	Participan bacterias estrictamente anaerobias que se envenenan por la presencia de oxidantes como oxígeno o nitratos. $\text{pH} \leq 4$	Moléculas simples de bajo peso molecular ♦ Ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico) ♦ Alcoholes ♦ Aldehídos ♦ Gases ( $\text{CO}_2$ , $\text{H}_2$ , $\text{NH}_3$ )
<i>Acetogénesis</i>	Productos de la acidificación	Tercer etapa de la fermentación ácida, participan bacterias acetogénicas	Ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono
<i>Metanogénesis</i>	Productos de la fermentación ácida	Ocurren tres reacciones principales llevadas a cabo por: 1) Bacterias formadoras de metano (acetoclásticas) 2) Bacterias metano hidrogenotróficas 3) Proceso de hidrólisis-reducción $6.5 < \text{pH} < 8.2$ $\text{pH}$ óptimo de 7.0	♦ Dióxido de carbono y metano ♦ Energía (usada para la síntesis de colonias anarobias)

En la Figura 1 se muestra un esquema de las etapas teóricas del proceso de digestión anaerobia. En la primera etapa (hidrólisis), las cuatro macromoléculas fundamentales son hidrolizadas y llevadas a su forma monomérica para fungir como sustratos de la segunda etapa de DA. Durante la etapa de acidogénesis los compuestos hidrolizados son convertidos en moléculas simples de bajo peso molecular, los cuales comprenden ácidos grasos de cadena corta (AGCC), alcoholes, aldehídos y gases. Los productos de la acidificación son mediados por consorcios acetoclásticos en la etapa de acetogénesis para obtener sustratos importantes (ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono) de la última de etapa de digestión. De manera general las primeras tres etapas de DA se engloban en un sólo proceso denominado fermentación ácida. Finalmente, en la etapa de metanogénesis, el ácido acético y el dióxido de carbono son mediados por bacterias metanógeno acetoclásticas y bacterias hidrogenotróficas para generar metano como producto final.



**Figura 1.** Esquema del proceso anaerobio de las etapas de hidrólisis, fermentación, y metanogénesis<sup>11</sup>.

Todas las reacciones anteriores son exotérmicas y pueden utilizarse para generar ATP. En general, los sustratos usados por varias *Archaea* metanogénicas son: *i*) sustratos tipo CO<sub>2</sub>, *ii*) metílicos, y *iii*) acetotróficos. Diversos grupos de microorganismos participan durante el proceso de digestión anaerobia, este consorcio de microorganismos incluye bacterias facultativas y otras estrictamente anaerobias. Los microorganismos que producen metano como parte integral de su metabolismo se denominan metanógenos; la taxonomía de los *Archae* productores de metano está basado en características fenotípicas y filogenéticas, estructuralmente son células procariotas que poseen diversos tipos de paredes celulares que incluyen la pseudomureína (*Methanobacterium*), la metanocondroita (*Methanosarcina*), y las glicoproteínas (*Methanococcus* y *Methanoplanus*). Fisiológicamente, los metanógenos son anaerobios estrictos. La mayor parte de los metanógenos conocidos son mesófilos aunque también se han descritos extremófilos para la temperatura y salinidad<sup>12</sup>. Entre las bacterias más comunes encontradas en los procesos de digestión anaerobia destacan las siguientes<sup>12,13</sup>.

a) Bacterias que participan en el proceso de fermentación ácida (facultativas)

- *Clostridium spp*
- *Peptococcus anaerobus*
- *Bifidobacterium spp*
- *Desulfovibrio spp*
- *Lactobacillus*
- *Escherichia coli*
- *Syntrophomonas wolfei*
- *Syntrophobacter wolnii*
- *Syntrophus gentiane*

b) Bacterias metanogénicas (anaerobias estrictas)

- *Metanobacterium*
- *Metanobacillus*
- *Metanococcus*
- *Metanosarcina*

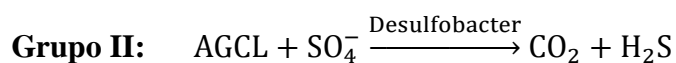
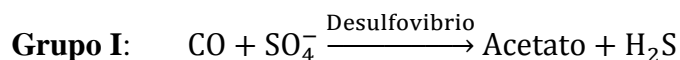
Los procesos de DA presentan algunas ventajas importantes en comparación con otros métodos de tratamientos biológicos. En los procesos anaerobios hay una reducción de alrededor de 6 a 8 veces el volumen del lodo producido en comparación con un tratamiento aerobio; por lo tanto, hay una reducción significativa en el costo de procesamiento y disposición del lodo generado.

Debido a que el proceso de DA puede manejar altas cargas orgánicas, el volumen y tamaño del digestor requerido para el tratamiento es mucho menor que en un reactor aerobio; sin embargo, una desventaja importante de la DA radica en los largos tiempos de inicio o arranque del proceso (meses para procesos anaerobios, días para aerobios), además la presencia de ciertas sustancias en altas concentraciones (Tabla 2) actúa como compuestos tóxicos para los microorganismos anaeróbicos inhibiendo su actividad microbiana.

**Tabla 2.** Compuestos inorgánicos inhibitorios en el proceso de digestión anaerobia<sup>14</sup>.

Sustancia	Concentración	Concentración
	moderadamente inhibitoria, mg/L	fuertemente inhibitoria, mg/L
Na <sup>+</sup>	3,500-5,500	8,000
K <sup>+</sup>	2,500-4,500	12,000
Ca <sup>2+</sup>	2,500-4,500	8,000
Mg <sup>2+</sup>	1,000-1,500	3,000
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,500-3,000	3,000
S <sup>2-</sup>	200	200
Cr(VI)	-	3.0 (soluble)
		200-250 (total)
Ni <sup>2+</sup>	-	30.0 (total)
Zn <sup>2+</sup>	-	1.0 (soluble)

La presencia de compuestos que contienen azufre (sulfatos, sulfitos, tiosulfatos) provoca efectos adversos sobre el proceso de DA. Bacterias sulfato-reductoras usan ácidos orgánicos como fuente de carbono y compuestos con azufre como aceptores de electrones para producir ácido sulfhídrico. Los procesos de sulfato reducción son, por lo general, llevadas a cabo por dos grupos distintos de microorganismos de acuerdo a las siguientes reacciones:



El ácido sulfhídrico presenta mal olor, es corrosivo y tiene efecto tóxico inhibitorio en los grupos de microorganismos (0.003-0.006 M  $\text{S}^{2-}$ ; 0.002-0.003 M  $\text{H}_2\text{S}$ ). Este producto ácido puede ser también generado en la degradación de proteínas, obteniendo a la vez mercaptanos como productos secundarios. La presencia de  $\text{H}_2\text{S}$  en altas concentraciones tiene un importante efecto negativo en el tratamiento anaerobio, debido a que las bacterias sulfato-reductoras (estos microorganismos requieren 0.67 g DQO /g  $\text{SO}_4^-$  reducido) compiten con las bacterias metanogénicas por la DQO, en la cual participan organismos hidrogenotróficos, acidogénicos y acetoclásticos, obteniendo como resultado un decremento de hasta el 50% en la cantidad de gas metano producido. Por otra parte, bajas concentraciones de sulfuro (< 20 mg/L) son requeridos para un óptimo de la actividad metanogénica<sup>13</sup>.

La generación de ácido sulfhídrico no sólo repercute en el decremento de la actividad metanogénica, exposiciones prolongadas del cuerpo humano a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}$  puede dañar las glándulas del olfato, y en caso severo perder el sentido del olfato.

En procesos industriales, la presencia de este ácido provoca corrosión generando el efecto conocido como *crown rot*. La toxicidad por amoníaco es otro factor importante a considerar durante la digestión anaerobia, especialmente en el tratamiento de aguas con concentraciones altas de proteínas y/o aminoácidos, los cuales pueden ser degradados para producir el ion amonio. La presencia de  $\text{NH}_3$  en altas concentraciones (100 mg/L) es considerado tóxico para bacterias metanogénicas.

Por otra parte, dependiendo de las características del sustrato y del valor del tiempo de retención de sólidos, los valores típicos de requerimientos de nutrientes para mantener un consorcio metabólicamente activo son: nitrógeno (10-13 g/100 g biomasa), fósforo (2-2.6 g/100 g biomasa) y azufre (1-2 g/100 g biomasa). Además, el costo de adición de nutrientes es mucho menor para un proceso anaeróbico debido a la menor cantidad de biomasa producida. También es necesaria la presencia de metales traza para estimular la actividad metanogénica, los requerimientos sugeridos son hierro, cobalto, níquel y zinc en 0.02, 0.004, 0.003 y 0.02 mg/g de acetato producido, respectivamente.

El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento de microorganismos, si la cantidad de nitrógeno es baja, habrá una menor cantidad de colonias microbianas resultando en una menor tasa de conversión del carbón disponible. Por el contrario, si la cantidad de nitrógeno se encuentra en exceso provoca inhibición de los microorganismos por toxicidad debido a la formación de amonio. Para una buena digestión se ha reportado que la proporción C/N debe ser alrededor de 25-30:1 en el sustrato<sup>10</sup>.

Las bacterias metanogénicas presentan una mayor eficiencia en un intervalo de pH entre 6.5-8.2, con un óptimo metabólico en pH 7.0; sin embargo, un máximo rendimiento de producción de biogás oscila en un pH de 6.5 a 7.5. El pH del proceso anaerobio se ve afectado por la concentración de ácidos grasos volátiles y bicarbonatos, así como la presencia de CO<sub>2</sub>. Con frecuencia, para mantener un pH constante se agrega soluciones de NaHCO<sub>3</sub> al inicio del proceso de digestión, o se mantiene una relación adecuada entre la concentración de ácidos grasos volátiles y bicarbonatos. Un alto contenido de CO<sub>2</sub> (30-50%) en el biogás producido en tratamiento anaerobio, requiere una alcalinidad de 2000-4000 mg/L como CaCO<sub>3</sub> para mantener un pH constante cerca de la neutralidad; no obstante, el nivel de alcalinidad puede ser aportado por la degradación de proteínas y aminoácidos, principalmente de efluentes de mataderos y carnicerías.

La temperatura presenta un efecto importante en la actividad metabólica de la conversión de ácido acético a metano, equilibrio de ionización, solubilidad de sustratos y grasas, así como biodisponibilidad de hierro. Una digestión anaerobia a altas temperaturas (condiciones termofílicas) afecta la actividad de metanógenos hidrogenotróficos y enriquecen las colonias de bacterias productoras de hidrógeno y esporas<sup>10</sup>.

En contraste, un tratamiento anaerobio a bajas temperaturas requiere un mayor tiempo de retención de sólidos, mayor volumen de digestor y bajas cargas orgánicas de DQO, apareciendo como etapa limitante la degradación ácidos grasos de cadena larga (AGCL). En la Tabla 3, se muestran resumidas las ventajas y desventajas que presentan los tratamientos anaerobios en comparación con los procesos aerobios.



**Tabla 3.** Ventajas y desventajas de un tratamiento anaerobio comparado con un proceso aerobio<sup>13</sup>.

Ventajas	Desventajas
Menor consumo de energía requerido.	Largos periodos de inicio para desarrollar la biomasa necesaria.
Menor producción de lodos.	Altos requerimientos de alcalinidad.
Menores requerimientos de nutrientes.	Requiere un tratamiento adicional aerobio para cumplir con los requerimientos de la descarga.
Producción de metano (fuente de energía potencial, produce alrededor de 4 veces la energía requerida por un proceso aerobio).	No es posible la remoción de nitrógeno y fósforo.
Menor volumen de reactor requerido.	Más sensible al efecto adverso de la temperatura (bajas temperaturas). Muy susceptible al efecto tóxico de sustancias.
Con aclimatación óptima, no presenta efectos ante variaciones constantes en carga orgánica.	Producción potencial de olores y gases corrosivos.

Generalmente, concentraciones de DQO mayores a 1500-2000 mg/L son necesarios para producir suficientes cantidades de metano para calentar el agua residual sin una fuente externa de combustible. Por otro lado, un tratamiento aerobio es preferido cuando la DQO es menor a 1300 mg/L. Los valores comunes de tiempo de retención de sólidos (TRS) oscilan alrededor de 20-50 días para los tratamientos anaerobios a 30°C, y mucho mayor TRS para temperaturas menores.

Se pueden obtener relaciones de la producción de metano en función de la demanda de oxígeno degradada considerando presión atmosférica en el cabezal del digestor y por lo tanto condiciones de idealidad en la fase gas además del consumo de DQO por mol de metano estimando valores de 0.35 L/g DQO a 0°C, 0.40 L/g DQO a 35°C, valores que dependen de la temperatura de operación del reactor anaerobio. Es importante mencionar que un tratamiento anaerobio puede ser seguido por uno aerobio con el objetivo de pulir el efluente y utilizar los beneficios de ambos procesos.

## 2.2 Fermentación oscura

El proceso biológico de fermentación oscura desarrolla todo el complejo metabólico involucrado durante la digestión anaerobia, la diferencia radica en la ausencia de consorcios microbianos que son capaces asimilar los sustratos disponibles en el medio para llevar a cabo la metanogénesis, por lo que se obtienen sólo alcoholes, ácidos grasos volátiles e hidrógeno como productos finales de la fermentación.

Diversos tipos de microorganismos como bacterias fotosintéticas, cianobacterias, algas y bacterias fermentadoras son comúnmente utilizados para la producción biológica de hidrógeno. Las bacterias fermentadoras incluyen anaerobios estrictos (*Clostridium*, metilotrofos, arqueobacterias), anaerobios facultativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) e incluso microorganismos aerobios (*Alcaligenes*, *Bacillus*)<sup>15</sup>.

Las especies de *Clostridium* son las bacterias predominantes que se encuentran presentes después del pretratamiento térmico de lodos activados, estos microorganismos son clásicos productores de ácidos, usualmente fermentan glucosa hacia butirato, acetato, dióxido de carbono e hidrógeno molecular.

*Clostridium beijerinckii* es un microorganismo comúnmente usado en la producción de butanol, y recientemente ha sido reconocido como un productor eficiente de hidrógeno a partir de glucosa y sucrosa así como sustratos más complejos provenientes de efluentes de la industria alimentaria y química (farmacéutica y pesticidas); sin embargo, pocos estudios han sido realizados con el objetivo de revelar el mecanismo y características de estas bacterias fermentadoras para mejorar el rendimiento y producción de hidrógeno<sup>16</sup>.

### **2.3 Simulación de procesos biológicos anaerobios**

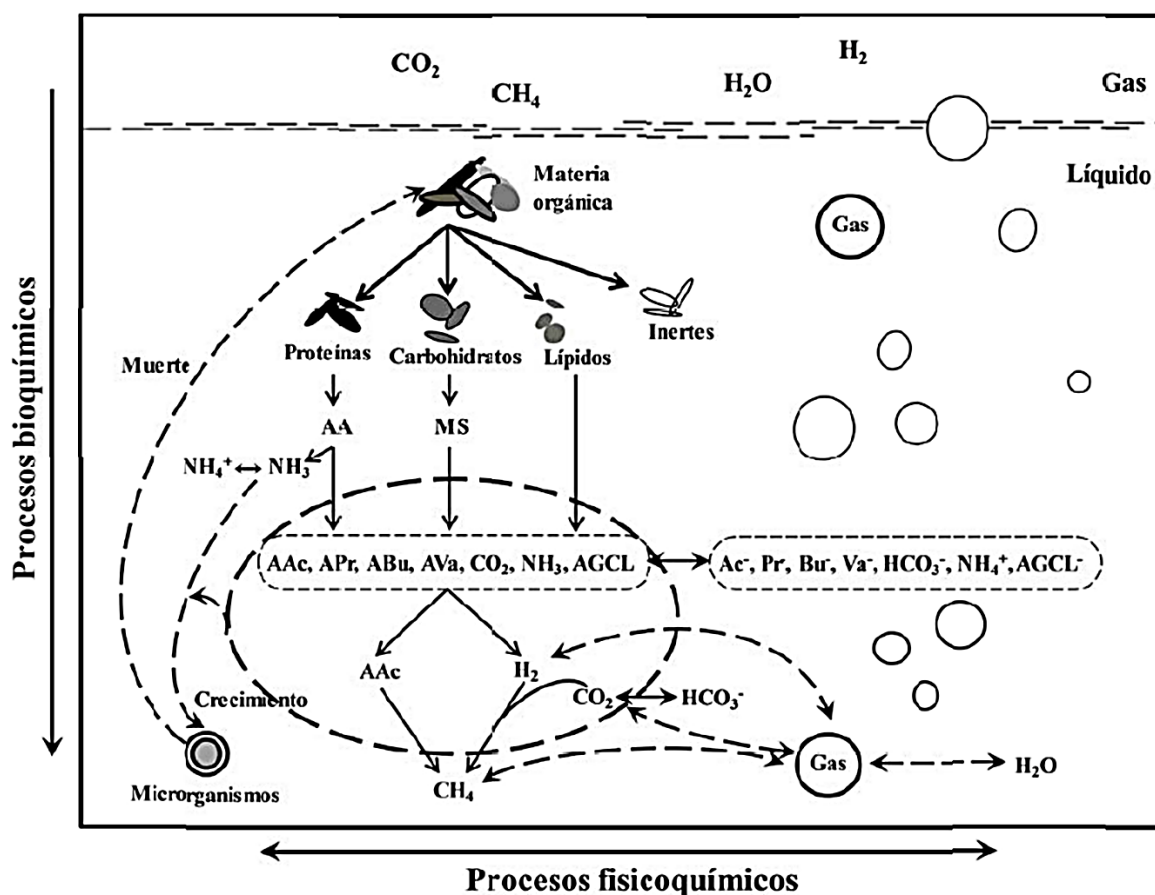
Los estudios experimentales sobre procesos biológicos anaerobios presentan complicaciones por distintas razones, entre las que destacan la complejidad y variedad de sustratos, identificación de consorcios de microorganismos, costos de seguimiento de productos de degradación, así como largos tiempos de inicio y de retención de sólidos. El creciente uso de las tecnologías avanzadas en procesos anaerobios requiere el desarrollo de modelos robustos que puedan representar las variaciones de los parámetros fisicoquímicos del sistema sobre las especies químicas y microbianas. En los últimos años los modelos matemáticos han sido una herramienta de diseño, operación y control de procesos, los cuales han permitido un ahorro significativo en tiempo y costos en la aplicación de tecnologías complejas como la digestión anaerobia y la fermentación oscura, estimulando paralelamente el aumento en la demanda de modelos matemáticos<sup>17,18</sup>.

Diversos modelos mecanísticos han sido desarrollados con el objetivo de elucidar la producción de bioenergéticos gaseosos, la naturaleza científica del proceso biológico se representa a través de ecuaciones matemáticas, determinando parámetros específicos que pueden ayudar a optimizar el proceso anaerobio<sup>19</sup>.

Una de las expresiones matemáticas más usados para representar la producción de biometano y biohidrógeno ha sido el modelo de tres parámetros (tiempo de adaptación, producción máxima de hidrógeno y tasa de producción de hidrógeno) de Gompertz, la cual es una aproximación empírica que ha mostrado altos coeficientes de correlación ( $R^2 > 0.90$ ) entre el ajuste del modelo y los datos experimentales; no obstante, su naturaleza lo hace específico a las condiciones experimentales y, por esta razón, no puede ser usado como modelo predictivo<sup>20</sup>. Algunos otros estudios han utilizado expresiones cinéticas convencionales como las ecuaciones de Monod y Luedeking-Piret, la comprensión de dichas ecuaciones toma importancia sólo cuando son integradas en estructuras de modelos que incorporen múltiples procesos biológicos que representen el completo proceso anaerobio<sup>21</sup>.

### **2.3.1 Modelo de digestión anaerobia No. 1 (ADM1)**

El grupo de trabajo de modelado matemático de procesos de DA de la Asociación Internacional del Agua (IWA), formado en 1997 para el desarrollo de modelos de aplicación general, desarrolló el Modelo de Digestión Anaerobia No.1 (ADM1, por sus siglas en inglés). Este modelo mecanístico representa procesos de naturaleza bioquímica (estructurado en etapas de desintegración, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis), de naturaleza fisicoquímica y de transferencia de masa entre las fases líquida y gaseosa. La Figura 2 esquematiza la manera en que el ADM1 aborda los principales fenómenos relacionados a la digestión anaerobia de la materia orgánica<sup>19</sup>.

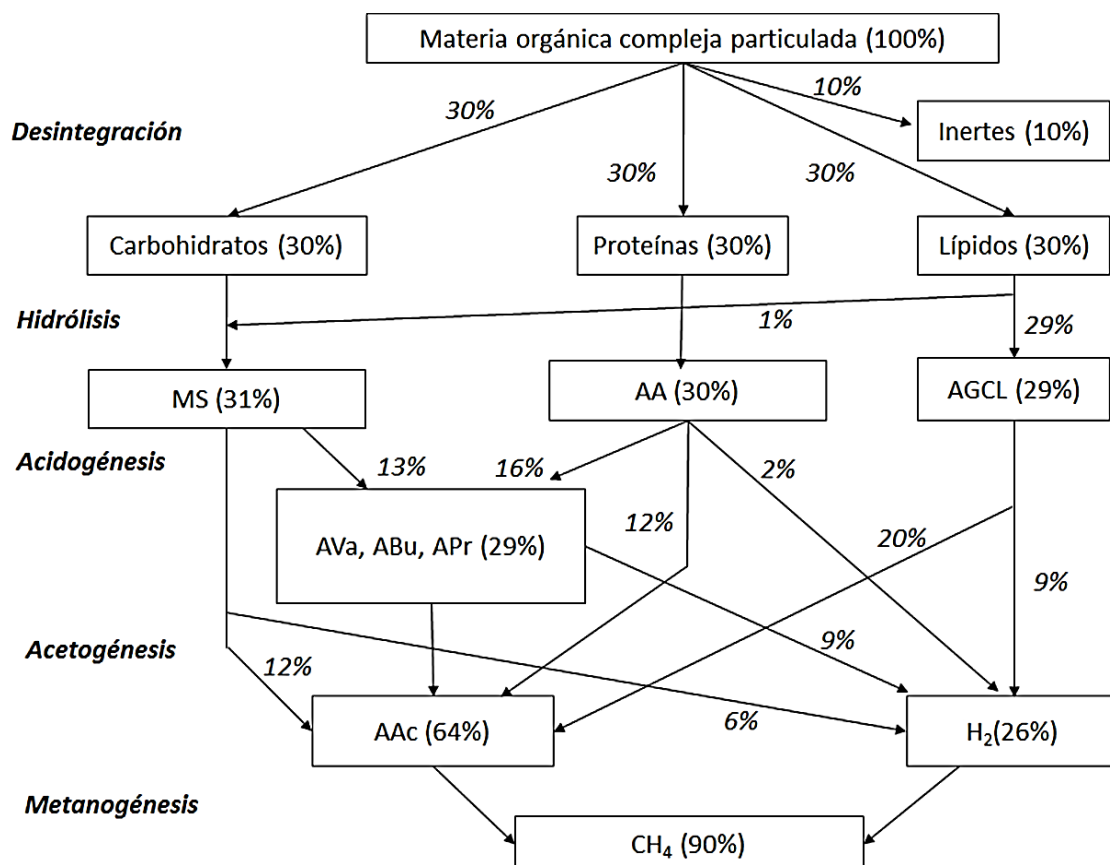


**Figura 2.** Procesos de conversión en digestión anaerobia consideradas por el ADM1. Las reacciones bioquímicas son irreversibles, mientras que las fisicoquímicas son reversibles. AA = Aminoácidos; MS = Monosacáridos; AAc = Ácido acético; APr = Ácido propiónico; ABu = Ácido butírico; AVa = Ácido valérico; AGCL = Ácidos grasos de cadena larga; Ac<sup>-</sup> = Acetato; Pr<sup>-</sup> = Propionato; Bur<sup>-</sup> = Butirato; Va<sup>-</sup> = Valerato; AGCL<sup>-</sup> = Base conjugada del AGCL. (Ilustración adaptada de Bastone *et al.*<sup>19)</sup>)

### 2.3.1.1 Procesos de naturaleza bioquímica

Durante el proceso de digestión anaerobia, la materia orgánica es degradada a través de múltiples reacciones que son normalmente catalizadas por enzimas intra o extracelulares. El ADM1 involucra este conjunto complejo de reacciones bioquímicas, excluyendo balances de energía y mecanismos de transporte.

El medio líquido en donde se llevan a cabo los procesos bioquímicos es considerado como una fase homogénea, isotérmica y solución ideal. La Figura 3 indica el flujo que la materia orgánica sigue hasta su descomposición en  $\text{CH}_4$ . Este proceso está dividido en 5 etapas principales que comprenden desde la desintegración hasta la metanogénesis.



**Figura 3.** Flujo de la demanda química de oxígeno (DQO) de materia orgánica compuesta por 10% de material inerte y 30% de cada fracción de carbohidratos, proteínas y lípidos. El APr (10%), ABu (12%) y AVa(7%) son agrupados por simplicidad. AA = Aminoácidos; MS = Monosacáridos; AAC = Ácido acético; APr = Ácido propiónico; ABu = Ácido butírico; AVa = Ácido valérico. (Representación adaptada de Bastone *et al.*)<sup>19</sup>

La primera etapa propuesta en el ADM1 comprende una desintegración (propiciada por enzimas extracelulares) en la cual la materia orgánica compleja y la biomasa muerta son disgregadas en macromoléculas (carbohidratos, proteínas, lípidos) y material inerte. En la segunda etapa, estas macromoléculas son hidrolizadas en sus fracciones monoméricas de aminoácidos, monosacáridos y AGCL, representados con las moléculas modelo de alanina y glicina, glucosa y ácido palmítico, respectivamente; tales procesos son modelados mediante cinéticas de primer orden. Las dos etapas anteriores (desintegración e hidrólisis enzimática) son mediadas a través de procesos extracelulares.

Durante la etapa de acidogénesis, tres consorcios diferentes de microorganismos degradan los monómeros formados durante la hidrólisis a ácidos grasos volátiles (AGVs) usando ácido valérico, butírico, propiónico y acético como los principales ácidos formados durante esta etapa de digestión, además de la producción de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . A continuación, en la etapa de acetogénesis, distintos grupos de microorganismos utilizan como sustratos los AGVs y los AGCL para generar como productos principales ácido acético,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . Finalmente, el ácido acético es transformado por metanógenos acetoclásticos a  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , y de forma paralela el  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  diluidos en la fase líquida del digestor son consumidas por un conjunto de metanógenos hidrogenotróficos para producir  $\text{CH}_4$  en menor proporción.

Los consorcios de microorganismos presentes en la DA llevan a cabo diversos procesos intracelulares para la asimilación de compuestos solubles resultando en el crecimiento y decaimiento de la biomasa.

Cinéticas de consumo de sustrato de pseudo primero orden (tipo Monod) son usadas para representar las reacciones intracelulares de la fermentación ácida y metanogénesis. Las concentraciones de carbono y nitrógeno inorgánico son modeladas mediante balances dinámicos de masa en función del resto de las especies presentes en la fase líquida y gas del digestor<sup>18</sup>.

Por otra parte, el ADM1 considera siete consorcios diferentes de microorganismos que participan en la digestión de compuestos solubles y presenta efectos de inhibición del crecimiento de los diferentes consorcios al incluir funciones de inhibición para los factores de  $H_2$  y  $NH_3$  diluidos en la fase líquida, pH, nitrógeno limitante e inhibición por competencia de sustratos.

### 2.3.1.2 Procesos de naturaleza fisicoquímica

Los procesos fisicoquímicos son representados en el ADM1 como reacciones líquido-líquido reversibles. En la Tabla 4, se muestran las reacciones de asociación-disociación de AGCL, AGVs y gases solubles ( $CO_2$  y  $NH_3$ ) que son consideradas durante el proceso de DA.

**Tabla 4.** Reacciones de asociación-disociación involucradas en ADM1<sup>19</sup>.

Reacciones de asociación-disociación	pKa *	$\Delta H^\circ (J \text{ mol}^{-1})$
$CH_3(CH_2)_3COOH \leftrightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + H^+$	4.86	-
$CH_3(CH_2)_2COOH \leftrightarrow CH_3(CH_2)_2COO^- + H^+$	4.82	-
$CH_3CH_2COOH \leftrightarrow CH_3CH_2COO^- + H^+$	4.88	-
$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+$	4.76	-
$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$	6.35	7646
$NH_4^+ \leftrightarrow NH_3 + H^+$	9.25	51965
$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$	14.00	55900

\*Valores de pKa reportados a 298 K y 1 atm de presión



El fundamento del modelo fisicoquímico del ADM1 está basado en un balance global de cargas, partiendo de la condición de electroneutralidad, el cual se complementa haciendo uso de las relaciones de equilibrio de cada reacción de disociación y balances molares por especie. Este modelo proporciona información para evaluar las concentraciones de todas las especies ionizadas en solución, alcalinidad y pH durante el proceso de DA.

Cambios en la temperatura de operación del digestor presenta una influencia fundamental en el sistema fisicoquímico, principalmente debido a los cambios en las constantes de equilibrio. El efecto global sobre el sistema debido a cambios en los parámetros fisicoquímicos con la temperatura es generalmente más importante que el causado por cambios en los parámetros bioquímicos. El ADM1 utiliza la ecuación de van't Hoff (Ecuación 1) para describir la variación de las constantes de equilibrio con la temperatura.

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (1)$$

Donde  $K_1$  representa la constante de equilibrio conocida a la temperatura de referencia  $T_1$  (K);  $K_2$  es la constante de equilibrio a evaluar a la temperatura de operación  $T_2$  (K);  $\Delta H^\circ$  es el calor de reacción a temperatura y presión estándar;  $R$  es la constante de los gases,  $8.324 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

### 2.3.1.3 Procesos de transferencia de masa

La dilución de los gases  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e  $\text{H}_2$  en la fase líquida son considerados como intermediarios significantes de la digestión anaerobia que presentan un efecto adverso importante sobre los procesos biológicos.

Las fases líquido y gas del digestor están en contacto hasta que un estado estable es alcanzado. Cuando la fase líquida está relativamente diluida, la ley de Henry puede usarse para describir las relaciones de equilibrio.

La transferencia de masa en la interfase líquido-gas es modelada en base a la teoría de la doble película de Whitman<sup>22</sup> (Ecuación 2), la cual es función de los coeficientes dinámicos de transferencia de masa gas-líquido, de las constantes de equilibrio de la ley de Henry y de las concentraciones del gas en la interfase del líquido y en el seno del gas.

$$\rho_{T,i} = K_L a (S_i - K_H p_{\text{gas},i}) \quad (2)$$

Donde  $S_i$  representa la concentración del gas  $i$  en la fase líquida (M);  $p_{\text{gas},i}$  es la presión parcial del gas  $i$  en el cabezal del digestor (bar);  $K_H$  es la constante de equilibrio de la ley de Henry (M/bar);  $K_L a$  es el coeficiente global de transferencia de masa gas-líquido ( $d^{-1}$ );  $\rho_{T,i}$  es la tasa de transferencia de masa del gas  $i$  (M/d).

La película líquida es la etapa que controla la transferencia de los gases, los cuales presentan valores de difusividad muy similares (Tabla 5); por esta razón se asume que los gases deben tener un valor de  $K_L a$  similar en orden de magnitud, por lo que ADM1 recomienda usar el mismo valor para los tres gases. La ecuación de van't Hoff (Ecuación 1) es usada para la variación de los parámetros de transferencia con la temperatura. La transferencia de masa en la interfase se da una vez que la concentración de los gases diluidos en la fase líquida llega al límite de saturación, comenzando a formar burbujas en el seno del líquido, las cuales migran hacia la fase gaseosa.

**Tabla 5.** Valores de los parámetros de la transferencia líquido-gas<sup>19</sup>.

Gas	$K_H$ (298 K) $M_{liq} \text{bar}^{-1}$	$\Delta H^\circ$ (J mol <sup>-1</sup> )	Difusividad (298 K) $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \times 10^9$
H <sub>2</sub>	0.00078	-4180	4.65
CH <sub>4</sub>	0.0014	-14240	1.57
CO <sub>2</sub>	0.035	-19400	1.98

El ADM1 es la estructura mayormente utilizada en la actualidad para la explicación del fenómeno de DA a partir del modelado matemático siendo implementado y validado en diversos casos de estudio. El desarrollo de ADM1 está respaldado por un amplio conocimiento científico en el tema de DA, el cual reúne un conjunto importante de parámetros cinéticos, estequiométricos y fisicoquímicos propuestos. No obstante, ha sufrido modificaciones, para adaptarse a particularidades en diferentes aplicaciones.

### 2.3.2 Consideraciones y limitaciones de ADM1

Diversas limitaciones han sido identificadas en el modelado de procesos de digestión anaerobia. Respecto a las bases fundamentales de ADM1, las principales limitaciones involucran (i) simulación y validación de modelos que regulen la producción AGVs a partir de la glucosa; (ii) certeza en valores de parámetros bioquímicos y de transferencia de masa; y (iii) falta de información experimental y conocimiento teórico en procesos relacionados a la digestión anaerobia (sulfato reducción, precipitación química, etc.)<sup>23</sup>.

La acidogénesis de la glucosa puede resultar en la generación de productos alternos de la fermentación además de los ácidos orgánicos, los subproductos de mayor consideración en digestión anaerobia son lactato y etanol<sup>12</sup>.

El lactato presenta una estequiometría similar a la glucosa, por lo que su omisión no presenta problemas en la estructura bioquímica del ADM1, además el lactato es rápidamente degradado durante la fermentación ácida. Sin embargo, el ácido láctico tiene un bajo valor de pKa (3.08), el cual exhibe efectos adversos sobre el pH<sup>24,25</sup>.

Por otra parte, el etanol es generado como producto alternativo al acetato a bajos valores de pH (pH<5.0), la ausencia del etanol en la estructura de ADM1 puede provocar una deficiente predicción en la concentración de ácidos orgánicos y en el valor del pH; sin embargo, reactores metanogénicos con baja carga orgánica no se ven afectados por la omisión de lactato y etanol, debido a que son rápidamente degradados a ácidos orgánicos y acetato, respectivamente<sup>8,26</sup>. No obstante, ambos compuestos deben ser considerados cuando se empleen sistemas con un alto contenido de glucosa acidogénica, condiciones de concentración variable y en digestiones con pH menores a 5.

Por otra parte, durante la digestión de lodos activados de plantas de tratamientos de aguas residuales domésticas, se requiere la consideración del análisis del contenido de fósforo con el fin de depurar los balances de masa, debido a la retención y liberación de fósforo en la biomasa. Sin embargo, la principal dificultad de la inclusión del fósforo en el ADM1, no es sólo la inclusión de procesos y reacciones individuales, sino también el amplio número de procesos en los que este elemento participa (equilibrio ácido-base, procesos bioquímicos, formación de complejos, precipitación química, etc.)<sup>27,28</sup>.

Cuando compuestos oxidados que contienen azufre están presentes en los digestores anaerobios, son cinética y termodinámicamente favorecidos a ser reducidos y formar sulfuros, H<sub>2</sub> y formiato.

Las bacterias sulfato reductoras pueden obtener los electrones directamente de la oxidación de ácidos orgánicos o  $H_2$ . Además, los ácidos orgánicos son usados como fuente de carbón, y como resultado, los microorganismos reductores de compuestos de azufre compiten con la mayoría de los otros consorcios de microorganismos presentes en la DA. La mayor complicación que presenta el azufre en procesos anaerobios es la formación de  $H_2S$ , el cual resulta ser tóxico e inhibitorio para todos los consorcios microbianos a concentraciones de 0.002–0.003 M. El ADM1 no incluye procesos de sulfato reducción debido a la complejidad de los múltiples procesos en los que participan los compuestos de azufre. La modificación del modelo bioquímico, fisicoquímico y de transferencia de masa del ADM1 para incluir sulfato reducción debe realizarse a concentraciones de  $S^{2-} > 0.002$  M, así como la consideración de las diversas fuentes de electrones y consorcios de microorganismos capaces de reducir sulfatos<sup>29,30</sup>.

Otra limitación importante fue reportada por Kleerebezem y van Loosdrecht<sup>31</sup> respecto a la estequiometría basada sólo en las reacciones catabólicas. Las reacciones anabólicas obtienen DQO del sustrato, pero en los casos de carbón limitante, el consorcio microbiano obtiene carbono del  $CO_2$ . Este comportamiento no es realista para muchos microorganismos (excepto bacterias hidrogenotróficas), especialmente aquellos que no producen bicarbonatos (*e.g.* microorganismos capaces de oxidar butirato). En general, debido al bajo rendimiento de la biomasa, y a que muchas de las reacciones producen  $CO_2$  durante el catabolismo, el efecto global de la estequiometría es pequeño. Sin embargo, cuando ADM1 deba ser usado como base para evaluar productos metabólicos es importante la modificación estequiométrica para la inclusión del anabolismo.

Una forma de respiración anaeróbica no considerada en ADM1 comprende la reducción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a óxidos de nitrógeno tales como  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2$ . Debido a que la producción de compuestos gaseosos de nitrógeno permite el decremento de nitrógeno en la fase líquida, el proceso es denominado denitrificación. Los denitrificadores organotróficos (procariotas facultativos) pueden usar una amplia variedad de sustratos orgánicos como fuentes de carbón y electrones, e incluso degradar compuestos tóxicos como benceno y fenol.

De forma general, la nitrato reducción presenta cuatro efectos importantes (i) el consumo de electrones equivalentes durante los procesos de nitrato reducción provoca un decremento global en la producción de metano; (ii) decremento en la calidad de biogás debido a una mayor producción de  $\text{N}_2$  y  $\text{CO}_2$ ; (iii) inhibición competitiva por sustrato; y (iv) inhibición de metanogénesis por óxidos de nitrógeno<sup>32,33</sup>. Debido a las complejas interacciones simbióticas y sintróficas de los organismos involucrados en la reducción de nitratos, se ha evitado su inclusión en el ADM1.

Por otro lado, los lípidos son uno de los principales constituyentes de la materia orgánica presente en aguas domésticas residuales, efluentes de mataderos y molinos de aceite, así como en residuos agroindustriales. La importancia de este tipo de efluentes y residuos radica principalmente en la hidrólisis enzimática de los lípidos generando AGCL, los cuales presentan mecanismos de inhibición del consorcio microbiano a través del ausente crecimiento por inhibición competitiva en la síntesis de AGCL en la estructura de nuevas bacterias, mínimo transporte de electrones involucrados en la regeneración de ATP o en el transporte esencial de nutrientes en la célula, así como adhesión a la pared celular de la bacterias restringiendo el paso de nutrientes esenciales.

No obstante, así como la inhibición ocurre, surge la adaptación del consorcio microbiano al remover AGCL tan rápido como se produce en la hidrólisis. La inhibición por AGCL presenta un impacto importante cuando se usan como sustratos efluentes ricos en proteínas; sin embargo, no es incluido en el ADM1 debido a su complejidad y su poca frecuencia en digestores anaerobios<sup>34,35</sup>.

La formación de una fase sólida es un proceso complejo que depende en primera instancia tanto de la cinética como la termodinámica. La precipitación de sólidos de importancia potencial en digestores anaerobios incluye carbonato de calcio, fosfato de calcio, sulfuros metálicos y complejos de manganeso y fosfato. De los cuales, el precipitado más importante es  $\text{CaCO}_3$  debido a las cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en efluentes de las industrias de pulpa y papel. Las razones principales por la que se excluyen cinéticas de precipitación en ADM1 fueron la complejidad de los procesos, la amplia variedad de cationes precipitantes y, por lo tanto, un amplio número de productos sólidos, además de que los sistemas con altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son relativamente limitados<sup>36-38</sup>.

### 2.3.3 Extensiones y aplicaciones de ADM1

Desde su publicación, la estructura de ADM1 ha sufrido diversas modificaciones con el fin de definir extensiones matemáticas a los modelos bioquímico, fisicoquímico y de transferencia de masa que incluyan algunas de sus limitaciones más representativas. Las extensiones más comúnmente estudiadas e implementadas son sulfato reducción, descripción del comportamiento del fósforo y precipitación química<sup>23</sup>. En las Tablas 6 y 7 se muestran algunas de las innovaciones que se han realizado a la estructura de ADM1 para su empleo en efluentes industriales específicos.

**Tabla 6.** Principales extensiones implementadas a ADM1.

Extensión	Descripción de la modificación y resultados	Autor
<i>Precipitación de CaCO<sub>3</sub></i>	Extensión realizada para la precipitación de Ca <sup>2+</sup> . Se realizaron simulaciones utilizando el software Aquasim 2.0 para analizar el efecto de dosificar HCl como medida de control de pH y evitar precipitación de CaCO <sub>3</sub> en un reactor UASB alimentado con efluentes de la industria de pulpa y papel. Los resultados de la simulación indicaron que la dosificación de ácido no resulta económica en el control de pH, ni presenta un efecto real importante en la precipitación de CaCO <sub>3</sub> .	Batstone & Keller <sup>39</sup>
	Incorporación de cuatro grupos de microorganismos que oxidan butirato/valerato, propionato, acetato e hidrógeno usando sulfatos como aceptores de electrones para producir H <sub>2</sub> S. Además, se incluyen funciones de inhibición, equilibrio ácido-base y ecuaciones de remoción para el gas producto. El modelo mostró simulaciones efectivas en el comportamiento de los datos experimentales de un digestor UASB con concentraciones de alimentación de sulfatos menores a 6 g de azufre/L.	Fedorovich <i>et al.</i> <sup>29</sup>
<i>Reducción de sulfatos</i>	Estudios detallados del proceso de sulfato reducción involucrado en procesos de DA, además se fundamenta su implementación de modelos como ADM1, así como opciones alternas a este modelo. Reportando que el modelo más detallado para representar la reducción de sulfatos en la digestión anaerobia es el propuesto por Fedorovich <i>et al.</i>	Barrera <i>et al.</i> <sup>40</sup>
	Estudios de la reducción de sulfatos en la digestión anaerobia de vinaza de caña. Los resultados de la simulación muestran un 10-30% de precisión con respecto a los datos experimentales, mostrando desviaciones importantes en el comportamiento de la metanogénesis y sulfatogénesis a tiempos de retención mayores a 70 d.	Barrera <i>et al.</i> <sup>30</sup>



**Tabla 7.** Principales extensiones implementadas a ADM1.

Extensión	Descripción de la modificación y resultados	Autor
<i>Reducción de nitratos</i>	Estudios del efecto de óxidos de nitrógeno y azufre en la metanogénesis con énfasis en el transporte de electrones y mecanismos de denitrificación. La estructura de ADM1 fue modificada con la inclusión de ecuaciones que involucran la reducción de nitratos a nitrito, óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) y nitrógeno gas; además se incluyen grupos de microorganismos denitrificadores e inhibición no competitiva por la concentración de $\text{NO}_x$ . El análisis de las simulaciones realizadas mostró que los $\text{NO}_x$ inhiben las interacciones entre los procesos de fermentación, metanogénesis y denitrificación, y tal efecto no puede ser atribuido sólo a la estequiometría y cinéticas propuestas.	Tugtas <sup>32</sup>
<i>Compuestos fenólicos</i>	Análisis de la digestión anaerobia de compuestos fenólicos y homólogos presentes en aguas residuales de la industria de la molienda de oliva. El modelo ADM1 fue modificado con la incursión de tres variables que representan la concentración de fenol soluble, particulado y microorganismos degradadores de compuestos fenólicos. Las ecuaciones que representan procesos extracelulares son representadas por cinéticas de primer orden, mientras que el crecimiento microbiano fue adaptado a la ecuación de Haldane. Además, se incluyen equilibrios ácido-base que afectan al pH, así como función de inhibición por fenol para los consorcios metanogénicos. Las simulaciones representaron con precisión los datos experimentales a concentraciones menores a 2-5 g DQO/l (TRH < 24 d) y 1-2 g DQO/l (TRH < 36 d), a concentraciones y TRH mayores se observan discrepancias importantes principalmente en la estimación del pH y producción de flujo volumétrico del biogás.	Fezzani & Cheikh <sup>41</sup>
<i>Diversidad microbiana</i>	Estudio de la influencia de la comunidad microbiana en los procesos de DA. El ADM1 fue modificado incluyendo 10 especies diferentes de microorganismos por cada grupo degradador (7), generando 63 variables de estado adicionales al modelo original (24 variables dinámicas). Las simulaciones realizadas fueron validadas con datos experimentales obtenidos de la DA de efluentes de la destilación del vino en un reactor de flujo ascendente de manto fijo (UASB).	Ramírez <i>et al.</i> <sup>42</sup>

Aplicaciones recientes de ADM1 involucran su uso en simulaciones para la estimación de biogás producido en la digestión de residuos agroindustriales como maíz, remolacha de caña, hierba, algas, etc.<sup>24,43,44</sup>. Por otra parte, ADM1 ha sido implementado como herramienta innovadora en la producción del biohidrógeno generado por procesos anaeróbicos, dichas implementaciones involucran el estudio de mecanismos bioquímicos alternos para la producción selectiva de hidrógeno, en este ámbito, pocos estudios han sido realizados debido a naturaleza compleja de los procesos bioquímicos así como problemas de almacenamiento del biohidrógeno producido<sup>24,43-47</sup>.

#### **2.3.4 Implementación de ADM1 en la producción de hidrógeno**

Recientemente, se ha demostrado la utilidad del ADM1 para describir el proceso de fermentación oscura para la producción de biohidrógeno<sup>48</sup>. No obstante, la mayoría de las modificaciones realizadas al ADM1 para representar este tipo de proceso se enfocan sólo en la parte bioquímica para representar la producción de hidrógeno, considerando algunos efectos de inhibición por pH, excluyendo su interacción con los procesos fisicoquímicos y de transferencia de masa<sup>8,49</sup>.

### **2.4 Acidificación de procesos biológicos anaerobios**

Los procesos de digestión anaerobia y fermentación oscura generan ácidos grasos como productos del metabolismo de algunos consorcios microbianos. La constante asimilación de los sustratos disponibles en el medio por los microorganismos anaerobios provoca la continua formación de ácidos grasos, estos ácidos son sustratos de otros grupos microbianos en la digestión anaerobia y productos finales en la fermentación oscura.

El principal problema con la formación de los ácidos grasos se encuentra relacionada con la acumulación de dichos ácidos en la fase líquida provocando un decremento significativo en el pH del medio. La acidificación de procesos anaerobios es un efecto común que ya ha sido reportado por diversos investigadores, principalmente cuando se usan carbohidratos como principal fuente de carbono<sup>7,20,50</sup>. La importancia de la acidificación del medio repercute principalmente a la inhibición de algunos consorcios microbianos en la digestión anaerobia y la nula actividad metabólica en los procesos de fermentación oscura, se ha reportado que cuando la concentración de ácidos grasos se encuentra entre 2000 y 6000 mg/L se puede referir al término toxicidad por ácidos grasos<sup>51</sup>.

Diversos métodos han sido empleados con el fin de evitar de acidificación en procesos anaerobios entre los que destacan el uso de co-sustratos ricos en proteínas o compuestos nitrogenados, adición de sustancias alcalinas como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio y bicarbonato de sodio así como modificación del medio con compuestos amortiguadores “buffer”<sup>51–57</sup>. Sin embargo, escasa es la literatura acerca del aporte de alcalinidad en la simulación y modelado matemático de procesos anaerobios.

### 3. Hipótesis

El modelo matemático propuesto es capaz de predecir el volumen y la tasa de producción de hidrógeno generado en un proceso de fermentación oscura utilizando *Clostridium beijerinckii* como microorganismo anaerobio.

## 4. Aportación científica

Desarrollo de una nueva herramienta digital que describa los fenómenos involucrados en el proceso de fermentación oscura. Esta herramienta incluirá las interacciones de los procesos fisicoquímicos y de transferencia de masa con la etapa bioquímica del proceso de fermentación oscura con el objetivo de mejorar el entendimiento y análisis del proceso anaerobio asimismo permitirá la predicción de la producción biohidrógeno y subproductos generados como parámetros para el análisis, gestión y control de procesos.

## 5. Objetivos y metas

### 5.1 Objetivo general

Desarrollar el modelo de fermentación oscura basado en ADM1 para la simular la producción biohidrógeno utilizando *Clostridium beijerinckii* como microorganismo anaerobio.

### 5.2 Objetivos particulares

- 1) Desarrollar e implementar el modelo basado en ADM1 para el proceso anaerobio de fermentación oscura.
- 2) Calibrar el modelo propuesto para estimar la producción de biohidrógeno usando datos reportados en literatura.
- 3) Determinar las constantes biocinéticas del proceso de fermentación oscura para mejorar la predicción de la producción de biohidrógeno por *Clostridium beijerinckii*.

- 4) Realizar experimentos de potencial de producción de biohidrógeno (BHP) usando un sustrato de fácil asimilación (hexosa).
- 5) Validar el modelo propuesto para estimar la producción de biohidrógeno usando datos experimentales obtenidos.

### Metodología experimental

#### 6.1 Desarrollo de ADM1

El desarrollo matemático de las ecuaciones que comprende el ADM1 se encuentra detallado en el marco teórico publicado por Rosen y Jeppsson<sup>58</sup>; las múltiples reacciones de proceso bioquímico son representadas por ecuaciones diferenciales ordinarias que describen el balance dinámico de cada una de las reacciones bioquímicas involucradas en el proceso de DA; el modelo fisicoquímico puede ser definido por ecuaciones diferenciales ordinarias de cada una de las especies disociadas o por una ecuación algebraica no lineal derivada del uso de las relaciones de equilibrio, por lo cual la solución de las ecuaciones que describen el modelo fisicoquímico depende del perfil de concentración de los sustratos solubles.

No obstante, los factores de inhibición de crecimiento de los microorganismos dependen de la información proporcionada por el modelo fisicoquímico. Al mismo tiempo, el modelo de transferencia de masa definido por ecuaciones diferenciales ordinarias representa la concentración de cada gas presente en el cabezal del digestor. Debido a esto, la solución de los modelos bioquímico, fisicoquímico, así como de transferencia de masa debe ser simultánea, lo cual aumenta el grado de complejidad numérica de la solución del ADM1.

### 6.1.1 Procesos de naturaleza bioquímica

La representación matemática del proceso bioquímico es generada en base a las reacciones catabólicas (Tabla 8) que comprende la descomposición de la materia orgánica dividido en cinco etapas principales que involucran desde la desintegración hasta la metanogénesis. La fase líquida del digestor, donde suceden todos los procesos bioquímicos, es considerada homogénea, isotérmica y como una solución ideal.

El balance de masa para cada especie en el digestor (componentes particulados, compuestos solubles y degradadores) en la fase líquida se representa con las ecuaciones 3 y 4. Ésta última ecuación es la forma matemática general para cada una de las ecuaciones diferenciales que representan el comportamiento dinámico de las especies en el digestor, donde  $S_i$  o  $X_i$  es la concentración de las especies (solubles o partículas, respectivamente) en la fase líquida a la entrada (in) y salida (out) del digestor,  $q$  representa el flujo volumétrico de entrada y salida al digestor debido a que no existe acumulación de especies en el digestor,  $V_{liq}$  es el volumen de la fase líquida,  $\rho_j$  son las diferentes tasas cinéticas específicas desarrolladas por mecanismos biológicos los cuales son afectadas de manera diferente por factores de inhibición y  $v_{i,j}$  son los coeficientes estequiométricos de las reacciones de catabolismo y anabolismo.

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Concentración} \\ \text{de la especie en} \\ \text{el digestor} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} \text{Flujo de entrada} \\ \text{de la especie} \\ \text{al digestor} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{Flujo de salida} \\ \text{de la especie} \\ \text{al digestor} \end{array} \right] \pm \left[ \begin{array}{c} \text{Generación/consumo} \\ \text{de la especie} \\ \text{en el digestor} \end{array} \right] \quad (3)$$

$$\frac{d(S \text{ o } X)_i}{dt} = \frac{q(S \text{ o } X)_{i,in}}{V_{liq}} - \frac{q(S \text{ o } X)_{i,out}}{V_{liq}} \pm \left( \sum_{j=1-19}^n \rho_j v_{i,j} \right) \quad (4)$$

**Tabla 8.** Reacciones catabólicas implicadas en el modelo bioquímico de ADM1<sup>18</sup>.

---

**Reacción de desintegración**

Materia orgánica → Carbohidratos + Proteínas + Lípidos + Inertes

**Reacciones de hidrólisis**

Carbohidratos → C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

Proteínas → R – CH(NH<sub>2</sub>)COOH

Lípidos → CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH

**Reacciones de acidogénesis**

*Glucosa*

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + 2H<sub>2</sub>O → 2CH<sub>3</sub>COOH + 2CO<sub>2</sub> + 4H<sub>2</sub> + 4ATP

3C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> → 4CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH + 2CH<sub>3</sub>COOH + 2CO<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O + 4/3ATP

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> → CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH + 2CO<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub> + 4ATP

*Aminoácidos*

CH<sub>3</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH + 2CH<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)COOH + 2H<sub>2</sub>O → 3CH<sub>3</sub>COOH + 2CO<sub>2</sub> + 3NH<sub>3</sub> + 1/3ATP

CH<sub>3</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH + 2CH<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)COOH + 0.61H<sub>2</sub>O → 0.923CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH + 2.385CO<sub>2</sub> + 3NH<sub>3</sub>

*Ácido palmítico*

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COOH + 14H<sub>2</sub>O → 8CH<sub>3</sub>COOH + 14H<sub>2</sub> + 14/6ATP

*Ácido valérico*

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH + 2H<sub>2</sub>O → CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH + CH<sub>3</sub>COOH + 2H<sub>2</sub> + 7/8ATP

**Reacciones de acetogénesis**

*Ácido butírico*

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH + 2H<sub>2</sub>O → 2CH<sub>3</sub>COOH + 2H<sub>2</sub> + 3/4ATP

*Ácido propiónico*

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH + 2H<sub>2</sub>O → CH<sub>3</sub>COOH + CO<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub> + 1/2ATP

**Reacciones de metanogénesis**

CH<sub>3</sub>COOH → CH<sub>4</sub> + CO<sub>2</sub> + 1/4ATP

4H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> → CH<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O + 1/4ATP

---



La ecuación 5 muestra un ejemplo de la ecuación diferencial que modela el comportamiento dinámico de hidrógeno soluble para un sistema en lotes durante la DA. Como se observa en las reacciones catabólicas (Tabla 8), el hidrógeno es formado como producto de varias reacciones durante la acidogénesis y acetogénesis; no obstante, también es un sustrato para bacterias hidrogenotróficas además de participar en los procesos de transferencia de masa cuando la fase líquida ha alcanzado sus límites de saturación.

$$\begin{aligned} \frac{dS_{H_2}}{dt} = & (1 - Y_{su})f_{H_2,su}K_{m,su} \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} X_{su} I_{pH} I_{IN,lim} + (1 - Y_{aa})f_{H_2,aa}K_{m,aa} \frac{S_{aa}}{K_{s,aa} + S_{aa}} X_{aa} I_{pH} I_{IN,lim} \quad (5) \\ & + 0.30(1 - Y_{fa})K_{m,fa} \frac{S_{fa}}{K_{s,fa} + S_{fa}} X_{fa} I_{pH} I_{IN,lim} I_{H_2} + 0.15(1 - Y_{c4})K_{m,c4} \frac{S_{va}}{K_{s,c4} + S_{va}} X_{c4} \frac{S_{va}}{S_{bu} + S_{va}} I_{pH} I_{IN,lim} \\ & + 0.20(1 - Y_{c4})K_{m,c4} \frac{S_{bu}}{K_{s,c4} + S_{bu}} X_{c4} \frac{S_{bu}}{S_{bu} + S_{va}} I_{pH} I_{IN,lim} I_{H_2} + 0.43(1 - Y_{pro})K_{m,pro} \frac{S_{pro}}{K_{s,pro} + S_{pro}} X_{pro} I_{pH,H_2} \\ & - K_{m,h_2} \frac{S_{H_2}}{K_{s,H_2} + S_{H_2}} X_{H_2} I_{pH} I_{IN,lim} - K_L a (S_{H_2} - 16K_{H,H_2} p_{gas,H_2}) \end{aligned}$$

En la Figura 4, se discute la naturaleza del primer término que conforma la ecuación dinámica del hidrógeno soluble (Ecuación 5); la expresión matemática enmarcada con el recuadro de menor tamaño representa la producción de bacterias acidogénicas al usar glucosa como sustrato, dichas bacterias son modeladas por cinéticas de crecimiento tipo Monod, además su crecimiento está limitado por funciones de inhibición de pH,  $H_2$  y  $NH_3$  diluidos en la fase líquida, así como nitrógeno limitante ( $I_{pH}$ ,  $I_{H_2}$ ,  $I_{NH_3}$  e  $I_{IN}$ , respectivamente). El término siguiente ( $1/Y_{su}$ ) acota la ecuación a la glucosa que debe ser consumida para llevar a cabo las múltiples reacciones catabólicas y de síntesis o anabolismo. Posteriormente, se delimita la ecuación sólo al consumo de glucosa que es convertida (catabolismo) en múltiples productos, para finalmente especificar con el término  $f_{H_2,su}$  cuanta glucosa se convierte exclusivamente en hidrógeno.

$$\frac{dS_{H_2}}{dt} = f_{H_2, su} (1 - Y_{su}) \frac{1}{Y_{su}} \frac{\mu_{max} S_{su}}{K_{s, su} + S_{su}} X_{su} I_{pH} I_{IN, lim} + \dots$$

Producción de bacterias acidogénicas

---

Consumo de glucosa en catabolismo y anabolismo

---

Glucosa consumida que se convierte a productos químicos (catabolismo)

---

Glucosa consumida que se convierte exclusivamente en hidrógeno

**Figura 4.** Descripción de los términos implícitos en las tasas bioquímicas de reacción.

### 6.1.2 Procesos de naturaleza fisicoquímica

La implementación de las ecuaciones que describen el comportamiento ácido-base de los procesos de naturaleza fisicoquímica que incluye el ADM1 depende de si es formulada y resuelta como ecuaciones diferenciales o como un conjunto de ecuaciones algebraicas, ambos planteamientos están basadas en un balance global de masa (Ecuación 6) y la condición de electroneutralidad.

$$\sum S_{C^+} - \sum S_{A^-} = 0 \quad (6)$$

Donde  $\sum S_{C^+}$  representa la concentración total de cationes y  $\sum S_{A^-}$  es la concentración total de aniones. Al efectuar el balance global de cargas en el catabolismo propuesto por ADM1 (Ecuación 7) es necesario utilizar factores para los ácidos orgánicos con el objetivo de obtener dimensiones homogéneas en la ecuación.

$$S_{Cat^+} + S_{NH_4^+} + S_{H^+} - S_{HCO_3^-} - \frac{S_{Ac^-}}{64} - \frac{S_{Pr^-}}{112} - \frac{S_{Bu^-}}{160} - \frac{S_{Va^-}}{208} - S_{OH^-} - S_{An^-} = 0 \quad (7)$$

En el balance global se consideran los términos  $S_{\text{Cat}^+}$  y  $S_{\text{An}^-}$  que indican la concentración de iones como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , dichos términos son incluidos para representar la concentración de los co-iones de las especies salinas de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ , los cuales por lo general son alimentados como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NaHCO}_3$ . Cuando un sistema de solución algebraico es usado para la ecuación del balance global de cargas es necesario el uso de las relaciones de equilibrio y de los balances molares por especie, dicho balance se transforma en una ecuación no lineal (Ecuación 8) que permanece únicamente en función de la concentración de protones ( $S_{\text{H}^+}$ ).

$$f(S_{\text{H}^+}) = \left[ S_{\text{Cat}^+} + \frac{S_{\text{H}^+} S_{\text{IN}}}{K_{\text{a,NH}_4^+} + S_{\text{H}^+}} \right] - \left[ \frac{K_{\text{a,Sva}} S_{\text{Va,total}}}{K_{\text{a,Sva}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{208} + \frac{K_{\text{a,SBu}} S_{\text{Bu,total}}}{K_{\text{a,SBu}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{160} + \frac{K_{\text{a,SPro}} S_{\text{Pro,total}}}{K_{\text{a,SPro}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{112} + \frac{K_{\text{a,SAc}} S_{\text{Ac,total}}}{K_{\text{a,SAc}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{64} + \frac{K_{\text{a,CO}_2} S_{\text{IC}}}{K_{\text{a,CO}_2} + S_{\text{H}^+}} + \frac{K_{\text{w}}}{S_{\text{H}^+}} + S_{\text{An}^-} \right] \quad (8)$$

### 6.1.3 Procesos de transferencia de masa

Gases solubles como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e  $\text{H}_2$  presentan resistencia a la transferencia de masa principalmente en la fase líquida, cuando la concentración de estos gases supera los límites de saturación en la fase acuosa comienza la formación de finas burbujas que emergen hacia la fase gaseosa del digestor. La teoría de la doble película de Whitman es usada para describir este fenómeno. El balance de masa global en fase gaseosa (Ecuación 9) está determinado por la diferencia entre el gas que emerge de la fase líquida (teoría de Whitman) y el gas que abandona el digestor. Donde el gas que abandona el digestor está en función del caudal de gases que abandonan el digestor, representado por la Ecuación 10, y se formula a partir de la consideración de que en el gas prevalece la condición de idealidad, así como temperatura y volumen constante.

De esta forma, la ecuación diferencial que representa la concentración dinámica de cada gas en el digestor está representada por la Ecuación 11. Este modelo permite obtener información de la concentración de CO<sub>2</sub> para evaluar las ecuaciones del modelo fisicoquímico involucradas en el equilibrio del carbonato, además la concentración de H<sub>2</sub> es usada para calcular el término de inhibición del crecimiento de los microorganismos. Asimismo, la información de este modelo sirve para cuantificar el caudal del biogás y su concentración.

$$\left( \begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{del gas } i \end{array} \right) = \left( \begin{array}{c} \text{Gas } i \text{ proveniente} \\ \text{desde la fase líquida} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{c} \text{Gas } i \text{ que abandona} \\ \text{el digestor} \end{array} \right) \quad (9)$$

$$q_{\text{gas}} = \frac{RT}{P_{\text{sist}} - P_{\text{H}_2\text{O}}} V_{\text{liq}} (\rho_{\text{T,H}_2} + \rho_{\text{T,H}_2} + \rho_{\text{T,H}_2}) \quad (10)$$

$$\frac{d(g_i)}{dt} = \rho_{\text{T},i} \frac{V_{\text{liq}}}{V_{\text{gas}}} - g_i \frac{q_{\text{gas}}}{V_{\text{gas}}} \quad (11)$$

## 6.2 Modificación del ADM1 para fermentación oscura

A continuación se describe la adaptación del ADM1 al proceso de fermentación oscura basada en el fundamento y marco teórico del modelo original que se encuentra publicado por Batstone *et al.*<sup>19</sup>, así como también por Rosen y Jeppsson<sup>58</sup>; las reacciones de proceso bioquímico están basadas en los productos reportados en diferentes publicaciones utilizando *Clostridium beijerenckii*. Debido a esto, la solución de los modelos bioquímicos, fisicoquímico, así como de transferencia de masa debe ser simultánea, lo cual aumenta el grado de complejidad numérica de la solución del ADM1.

### 6.2.1 Procesos de naturaleza bioquímica

Las principales reacciones catabólicas que se llevan a cabo en el fermentador son mostradas en la Tabla 9, donde se consideran desde la etapa de desintegración a la acidogénesis. La fase líquida del digestor, donde suceden todos los procesos bioquímicos, es considerada homogénea, isotérmica y como una solución ideal.

**Tabla 9.** Reacciones catabólicas del modelo bioquímico de ADM1<sup>8,46,48</sup>.

Producto	Reacciones de acidogénesis de la glucosa
Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 + 4ATP$
Propionato	$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O + 4/3ATP$
Butirato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 + 4ATP$
Lactato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 2ATP$
Etanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$

El balance de masa para cada especie en el digestor (compuestos solubles y degradador) en la fase líquida se representa con las ecuaciones 3 y 4. Ésta última ecuación es la forma matemática general para cada una de las ecuaciones diferenciales que representan el comportamiento dinámico de las especies en el digestor, donde  $S_i$  representa la concentración de las especies solubles en el digestor y  $X_{su}$  es la concentración de *Clostridium beijerinckii*, las variables restantes mantienen la misma nomenclatura asignada en la sección 5.1.1. Las expresiones matemáticas descritas en la Tabla 10, son las ecuaciones que representan la concentración de las especies del modelo bioquímico en la fase líquida.

**Tabla 10.** Reacciones catabólicas implicadas en el modelo bioquímico de ADM1.

- 
- Glucosa*
- (12)  $\frac{dS_{su}}{dt} = -K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Ácido láctico*
- (13)  $\frac{dS_{lac}}{dt} = (1 - Y_{su}) \cdot f_{lac,su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Etanol*
- (14)  $\frac{dS_{EtOH}}{dt} = (1 - Y_{su}) \cdot f_{EtOH,su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Ácido butírico*
- (15)  $\frac{dS_{bu}}{dt} = (1 - Y_{su}) \cdot f_{bu,su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Ácido propiónico*
- (16)  $\frac{dS_{pro}}{dt} = (1 - Y_{su}) \cdot f_{pro,su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Ácido acético*
- (17)  $\frac{dS_{ac}}{dt} = (1 - Y_{su}) \cdot f_{ac,su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Hidrógeno*
- (18)  $\frac{dS_{h2}}{dt} = (1 - Y_{su}) \cdot f_{h2,su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Carbono inorgánico*
- (19)  $\frac{dS_{IC}}{dt} = -K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot [-C_{su} + (1 - Y_{su})f_{bu,su} \cdot C_{bu} + (1 - Y_{su})f_{ac,su} \cdot C_{ac} + (1 - Y_{su})f_{bu,su} \cdot C_{bu} + (1 - Y_{su})f_{lac,su} \cdot C_{lac} + (1 - Y_{su})f_{EtOH,su} \cdot C_{EtOH} + Y_{su} \cdot C_{bac}] \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim} - K_{LA} \cdot (S_{CO_2} - K_{H,CO_2}p_{gas,CO_2})$
- Nitrógeno inorgánico*
- (20)  $\frac{dS_{IN}}{dt} = -Y_{su} \cdot N_{bac} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
- Clostridium beijerinckii*
- (21)  $\frac{dX_{su}}{dt} = Y_{su} \cdot K_{m,su} \cdot \frac{S_{su}}{K_{s,su} + S_{su}} \cdot X_{su} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN,lim}$
-

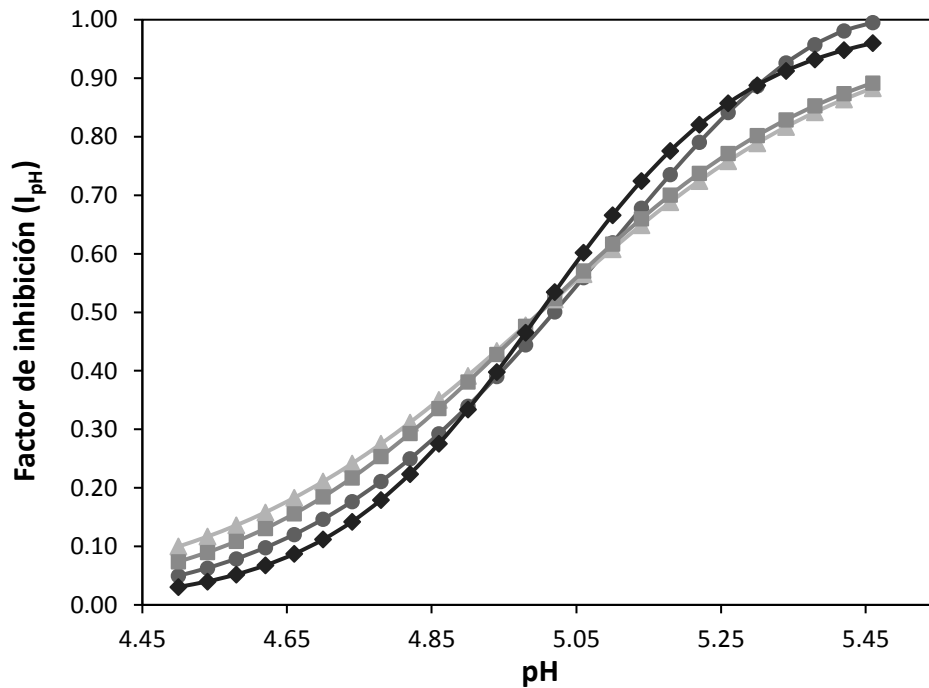
Donde las funciones  $I_{pH}$  y  $I_{IN,lim}$  representan inhibición por pH e inhibición por nitrógeno limitante, respectivamente. La función de inhibición basada en la concentración de protones (Ecuaciones 23-25) reportada por Siegrist *et al.* (2002)<sup>59</sup> fue seleccionada como la expresión matemática que mejor describe el proceso inhibitorio por pH para bacterias acidogénicas tal y como es mostrado en la Figura 5.

$$I_{IN,lim} = \frac{1}{1 + K_{S,SIN}/S_{IN}} \quad (22)$$

$$I_{pH} = \frac{K_{pH}^n}{S_{H^+}^n + K_{pH}^n} \quad (23)$$

$$K_{pH} = 10^{-\frac{pH_{LL} + pH_{UL}}{2.0}} \quad (24)$$

$$n = \frac{3.0}{pH_{UL} - pH_{LL}} \quad (25)$$



**Figura 5.** Evaluación del factor de inhibición por pH para bacterias acidogénicas usando diferentes funciones matemáticas: (●) Discontinua, (▲) Tangente hiperbólica, (■) Hill y (◆) Siegrist.

### 6.2.2 Procesos de naturaleza fisicoquímica

La implementación de las ecuaciones que describen el comportamiento ácido-base de los procesos de naturaleza fisicoquímica depende del balance global de masa (Ecuación 6) y la condición de electroneutralidad. Al efectuar el balance global de cargas en de las especies ionizadas (Ecuación 26) es necesario utilizar factores de conversión para los ácidos orgánicos con el objetivo de obtener dimensiones homogéneas en la ecuación.

$$S_{\text{Cat}^+} + S_{\text{NH}_4^+} + S_{\text{H}^+} - S_{\text{HCO}_3^-} - \frac{S_{\text{Ac}^-}}{64} - \frac{S_{\text{Pr}^-}}{112} - \frac{S_{\text{Bu}^-}}{160} - \frac{S_{\text{EtO}^-}}{96} - \frac{S_{\text{Iac}^-}}{96} - S_{\text{OH}^-} - S_{\text{An}^-} = 0 \quad (26)$$

La solución de la ecuación del balance global de cargas implementa el uso de las relaciones de equilibrio y los balances molares por especie, dicho balance se transforma en una ecuación no lineal (Ecuación 27) que permanece únicamente en función de la concentración de protones ( $S_{\text{H}^+}$ ).

$$f(S_{\text{H}^+}) = \left[ S_{\text{Cat}^+} + \frac{S_{\text{H}^+} S_{\text{IN}}}{K_{\text{a,NH}_4^+} + S_{\text{H}^+}} \right] - \left[ \frac{K_{\text{a,S}_{\text{EtOH}}} S_{\text{EtOH,total}}}{K_{\text{a,S}_{\text{EtOH}}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{96} + \frac{K_{\text{a,S}_{\text{Bu}}} S_{\text{Bu,total}}}{K_{\text{a,S}_{\text{Bu}}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{160} + \frac{K_{\text{a,S}_{\text{Pro}}} S_{\text{Pro,total}}}{K_{\text{a,S}_{\text{Pro}}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{112} + \frac{K_{\text{a,S}_{\text{Ac}}} S_{\text{Ac,total}}}{K_{\text{a,S}_{\text{Ac}}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{64} + \frac{K_{\text{a,S}_{\text{Iac}}} S_{\text{Iac,total}}}{K_{\text{a,S}_{\text{Iac}}} + S_{\text{H}^+}} \frac{1}{96} + \frac{K_{\text{a,CO}_2} S_{\text{IC}}}{K_{\text{a,CO}_2} + S_{\text{H}^+}} + \frac{K_{\text{w}}}{S_{\text{H}^+}} + S_{\text{An}^-} \right] \quad (27)$$

### 6.2.3 Procesos de transferencia de masa

Hidrógeno y dióxido de carbono son los gases solubles considerados en el proceso de fermentación oscura. La teoría de la doble película de Whitman es usada para describir la migración de burbujas de gases solubles de la fase líquida a la fase gaseosa del digestor. El balance de masa global en fase gaseosa (Ecuación 9) está determinado por la diferencia entre el gas que emerge de la fase líquida y el gas que abandona el digestor.



De manera similar a lo establecido en los procesos de transferencia de masa en la digestión anaerobia, las ecuaciones 9-11 representan la producción de biohidrógeno y dióxido de carbono durante la fermentación oscura. En la Tabla 11 se muestran las ecuaciones diferenciales que representan el comportamiento dinámico de los gases H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, este último relacionado con el modelo fisicoquímico.

**Tabla 11.** Ecuaciones diferenciales de los procesos de transferencia de masa.

---

*Dióxido de carbono*

$$(28) \quad \frac{dS_{\text{gas},\text{CO}_2}}{dt} = -S_{\text{gas},\text{CO}_2} \cdot \frac{q_{\text{gas}}}{V_{\text{gas}}} + \rho_{T,\text{CO}_2} \cdot \frac{V_{\text{LIQ}}}{V_{\text{GAS}}}$$

$$p_{\text{gas},\text{CO}_2} = S_{\text{gas},\text{CO}_2} \cdot RT$$

$$\rho_{T,\text{CO}_2} = K_L a \cdot (S_{\text{CO}_2} - K_{\text{H},\text{CO}_2} p_{\text{gas},\text{CO}_2})$$

*Hidrógeno*

$$(29) \quad \frac{dS_{\text{gas},\text{H}_2}}{dt} = -S_{\text{gas},\text{H}_2} \cdot \frac{q_{\text{gas}}}{V_{\text{gas}}} + \rho_{T,\text{H}_2} \cdot \frac{V_{\text{LIQ}}}{V_{\text{GAS}}}$$

$$p_{\text{gas},\text{H}_2} = S_{\text{gas},\text{H}_2} \cdot \frac{RT}{16}$$

$$\rho_{T,\text{H}_2} = K_L a \cdot (S_{\text{H}_2} - K_{\text{H},\text{H}_2} p_{\text{gas},\text{H}_2})$$

$$(30) \quad q_{\text{gas}} = \frac{RT}{P_{\text{gas}} - P_{\text{gas},\text{H}_2\text{O}}} \cdot V_{\text{LIQ}} \cdot \left( \rho_{T,\text{CO}_2} + \frac{\rho_{T,\text{H}_2}}{16} \right)$$


---

La solución de las ecuaciones diferenciales parciales generadas (en los procesos de digestión anaerobia y fermentación oscura) del modelo bioquímico y de transferencia de masa es obtenida con la implementación del método numérico de Runge-Kutta de cuarto orden (RK4) con un tamaño de paso en el tiempo de  $1 \times 10^{-5}$  s; la ecuación no lineal resultado del modelo fisicoquímico fue resuelto mediante el método de bisección. Ambos métodos numéricos fueron empleados de forma simultánea en un algoritmo de solución programado en FORTRAN. Los resultados de la simulación fueron muestreados cada 0.5 días y transferidos a una hoja de cálculo en Microsoft Excel®.

### 6.3 Condiciones de cultivo de *Clostridium beijerinckii*

El cultivo de *C. beijerinckii* fue a través de la revitalización de esporas congeladas. Se prepararon botellas serológicas que contenían un 60% del volumen de la botella de medio de triptona (3 g/L), dextrosa (2 g/L) y extracto de levadura (1 g/L). Las botellas fueron cerradas con un tapón de goma y arillo de aluminio para posteriormente intercambiar la atmósfera interna de la botella con una mezcla de gases de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80% N<sub>2</sub>) durante 5 min. Una vez intercambiada la atmósfera interna, las botellas serológicas fueron esterilizadas en una autoclave a 121°C por 15 minutos y se dejaron enfriar a hasta alcanzar temperatura ambiente. Se agregaron después esporas de *C. beijerinckii* en una relación de 0.05 mL de esporas por cada 6 mL de medio. Las botellas fueron puestas en una incubadora a 37°C con agitación orbital a 120 rpm durante 24 horas.

Después de la revitalización del microorganismo, una alícuota fue transferida bajo condiciones asépticas a un medio P2 modificado basado en los trabajos publicados por Ye *et al.*<sup>60,61</sup>. El medio P2 modificado fue preparado con la siguiente composición (g/L): solución buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.0), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2)), solución de elementos traza (1 mL/L<sub>buffer</sub>) la cual está compuesta como se describe a continuación: MgSO<sub>4</sub>(20), MnSO<sub>4</sub>(1), NaCl (1), FeSO<sub>4</sub>(1). Por último, se agrega 1 mL/L<sub>buffer</sub> de solución vitamínica (ácido 4-aminobenzoico (1), biotina (0.1), tiamina (1)). El pH inicial del medio fue 6.8. El medio fue purgado con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> por 10 minutos (fase líquida y cabezal de las botellas serológicas) para mantener condiciones anóxicas estrictas y, posteriormente, llevado a autoclave a 121°C durante 15 min.

## 6.4 Cinéticas de crecimiento microbiano

Una alícuota de *C. beijerinckii* fue transferida a botellas serológicas que contenían medio P2 y dextrosa como fuente de carbono. La concentración de dextrosa varió de 1 a 5 g/L con el objetivo de determinar los parámetros de la ecuación de Monod. Se realizaron muestreos a intervalos de tiempos seleccionados, estas muestras fueron acidificadas con una solución de ácido fosfórico al 5% v/v y guardadas a 5°C para su posterior análisis. El crecimiento celular fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm.

## 6.5 Pruebas de potencial bioquímico de hidrógeno (BPH)

Colonias de *C. beijerinckii* revitalizadas fueron transferidas a reactores anaerobios de 1 L (63% de volumen de trabajo) que contenían medio P2 y 3 g/L de dextrosa como fuente de carbono. Los reactores anaerobios fueron sellados con tapón de goma y arillo metálico para intercambiar la atmósfera interna por una mezcla de gases de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> durante 5 min. Posteriormente, las botellas fueron esterilizadas en autoclave a 121°C por 15 min. Las pruebas fueron realizadas a 37°C en una incubadora orbital con una velocidad de agitación de 120 rpm. Se tomaron alícuotas de la fase líquida y gaseosa a intervalos regulares de tiempo, y fueron acidificadas con ácido fosfórico al 5% v/v en una proporción de 1:6, considerando el factor de dilución, las muestras fueron guardadas a 4°C. Todos los experimentos se llevaron de forma independiente por triplicado.

## 6.6 Métodos analíticos

**Fase líquida.** La concentración de azúcares reductores fue determinada espectrofotométricamente a 575 nm usando el método de ácido di-nitro salicílico (DNS). La concentración de *C. beijerinckii* fue medida por densidad óptica a 600 nm (UV-Vis, Thermo

Scientific Genesis 10S). Los subproductos líquidos de la fermentación fueron determinados por cromatografía de gases (GC, Thermo Scientific Trace 1310) de acuerdo al siguiente procedimiento: 5  $\mu$ L de una muestra acidificada fue inyectada al cromatógrafo, el puerto de inyección fue establecido a 250°C, operado en modo “Split” con una relación de Split de 25 bajo un flujo constante de 1.5 mL/min de nitrógeno como gas acarreador, el horno fue calentado en tres etapas; en la primer etapa, el horno se mantuvo a 120°C por un minuto, posteriormente fue calentado a 20°C/min hasta alcanzar una temperatura de 140°C y mantener esa temperatura por un minuto y , finalmente, el horno fue calentado a 40°C/min hasta alcanzar 240°C y mantener esa temperatura por 30 segundos. El análisis se realizó con un detector de ionización de flama (FID) a 250°C con un flujo de 175, 17.5 y 20 mL/min de los gases aire, hidrógeno y nitrógeno, respectivamente.

**Fase gas:** El volumen de biogás e hidrógeno producido fue medido usando el método de desplazamiento de agua con una trampa de NaOH 5 M para el dióxido de carbono. La concentración de hidrógeno fue analizada por cromatografía de gases a las siguientes condiciones: la temperatura del horno se mantiene a 50°C durante 3 minutos, alimentando la muestra a 150°C en modo split (relación de split: 20) bajo un flujo constante de 1.5 mL/min de nitrógeno como gas acarreador, y usando un detector de conductividad térmica a 150°C (GC, Thermo Scientific Trace 1310). El TCD fue operado con polaridad negativa usando 1.5 mL/min de gas acarreador como referencia.

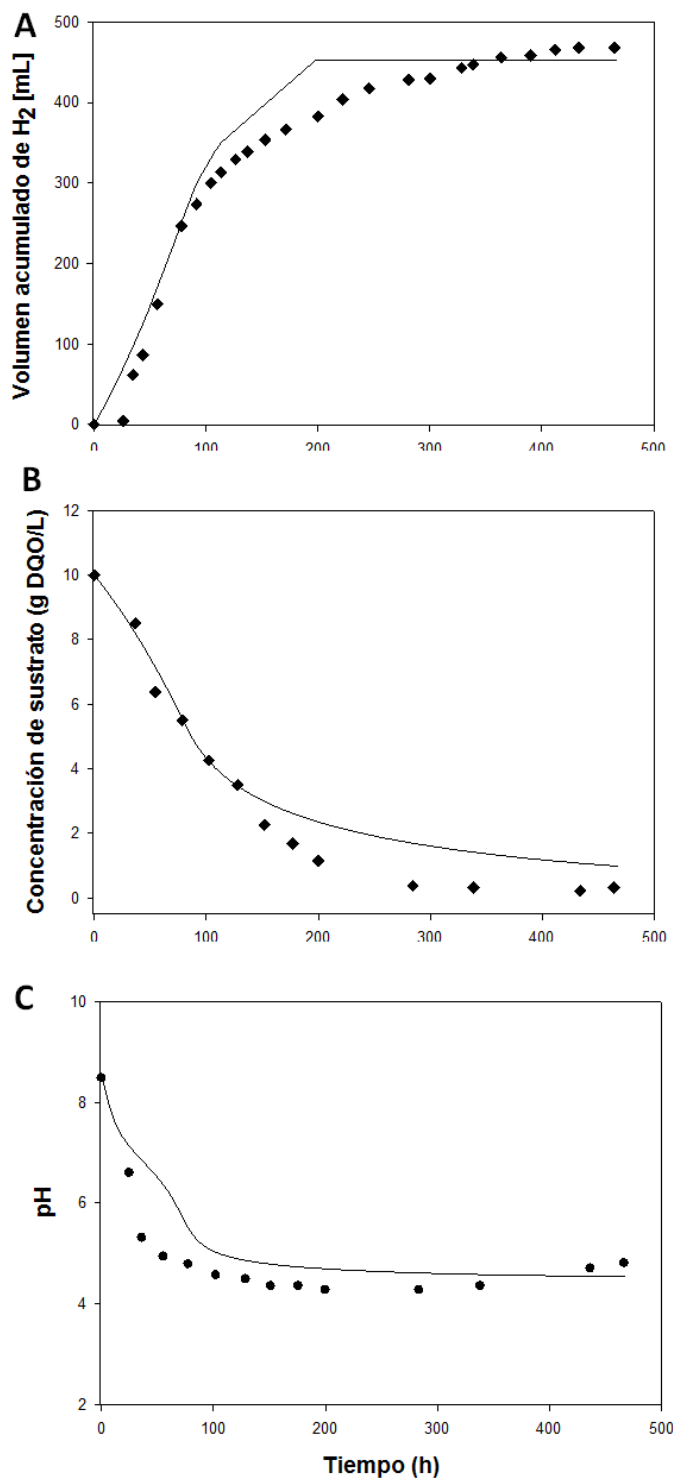
## 6.7 Disposición de residuos

Todos los residuos generados en este proyecto fueron dispuestos será de acuerdo al manejo integral de residuos y aspectos normativos de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

### Resultados y discusión

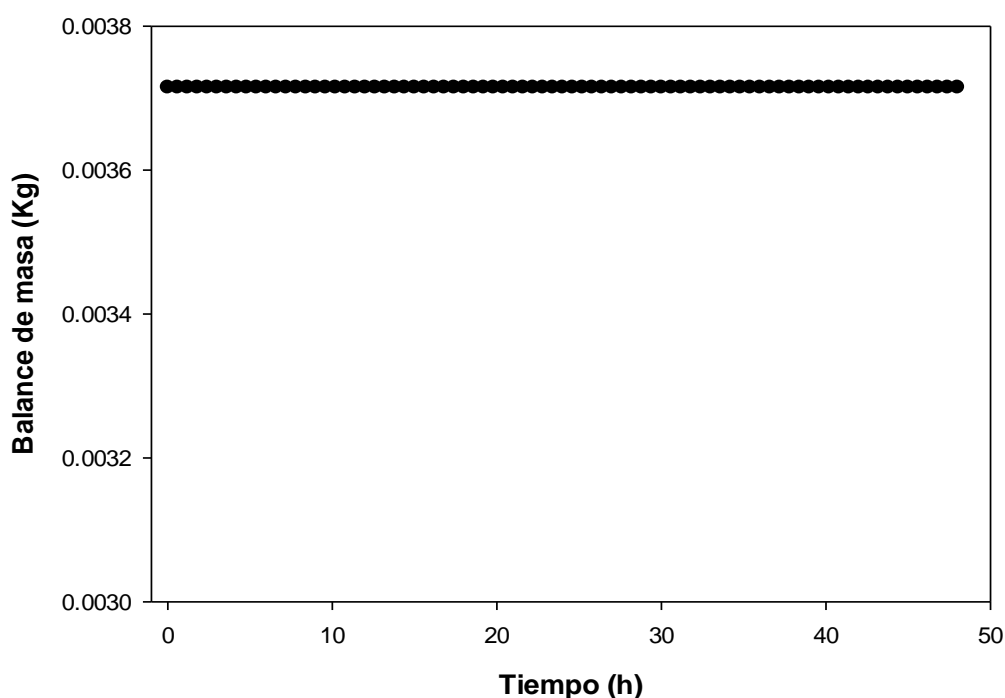
#### 7.1 Calibración del modelo ADM1

Previo a realizar las pruebas de fermentación oscura se realizó una etapa de calibración del modelo desarrollado con el fin de depurar errores en el algoritmo de programación. Diversos artículos científicos fueron revisados y analizados con el objetivo de reunir la mayor cantidad de información acerca de las reacciones químicas y bioquímicas, rutas metabólicas, condiciones de operación y variables de entrada a simulaciones, entre otras variables involucradas en los procesos de fermentación oscura. El artículo publicado por Gadhamshetty *et al.*<sup>8</sup> fue seleccionado para realizar la calibración del modelo propuesto debido a que reporta la producción de biohidrógeno usando tres consorcios microbianos distintos además de variar dos fuentes de sustrato (glucosa y sucrosa) aunado a los datos experimentales sobre la producción de hidrógeno, consumo de sustrato y perfil de pH (Figura 6 ). Estos datos experimentales son de vital importancia para elucidar los tres procesos que presenta el modelo (procesos bioquímicos, fisicoquímicos y de transferencia de masa) de fermentación oscura. De acuerdo con la información reportada por Gadhamshetty *et al.* solamente fueron simulada las condiciones de todos los reactores sin medio buffer debido a las limitaciones del modelo acerca del efecto de sales amortiguadoras de pH en el modelo fisicoquímico.



**Figura 6.** A) Volumen acumulado de hidrógeno (mL), B) Consumo de sustrato (g DQO/L) y C) perfil dinámico del pH en los reactores en lotes (sin medio buffer). Los puntos representan los datos experimentales reportados por Gadamshetty *et al.* (experimento IPR22) y las líneas continuas son generadas por el presente modelo.

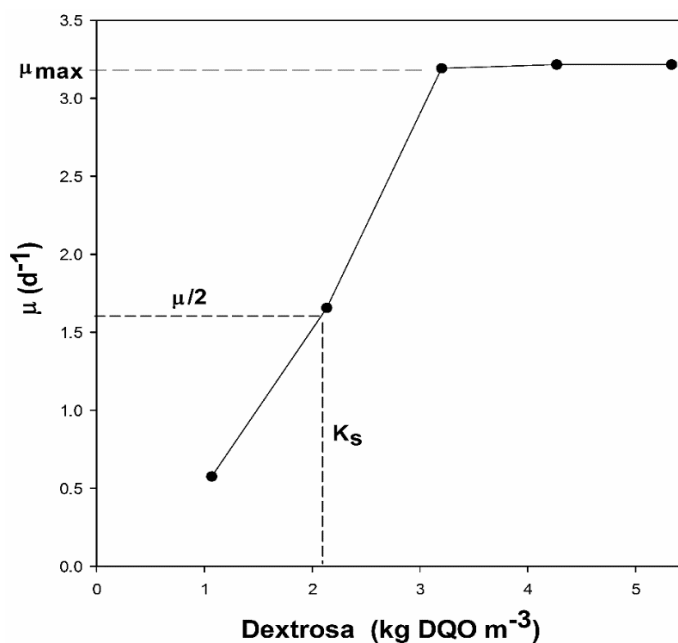
Los resultados obtenidos de las simulaciones realizadas muestran que el modelo es capaz de describir el comportamiento de los datos experimentales ( $R^2 > 0.92$ ) aún y cuando la mayoría de los valores de las variables del modelo tienen valores tomados como estándar o default del modelo de Batstone *et al.* Durante la simulación, sólo algunos valores de ciertas variables fueron cambiadas de acuerdo a lo reportado en el artículo, las cuales incluyen la constante de la tasa de decaimiento ( $k_{dec} = 0.05 \text{ d}^{-1}$ ), rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{su} = 0.1$ ), máxima tasa de consumo de Monod ( $k_{msu} = 2.2$ ) y constante de saturación media ( $k_{ssu} = 0.04 \text{ kg COD m}^3 \text{d}^{-1}$ ), variables relacionadas con el consumo de azúcar. Además, con el fin de observar la consistencia del modelo, se muestra un balance dinámico (Figura 7) de masa durante el tiempo de digestión anaerobia.



**Figura 7.** Balance dinámico de masa del modelo de fermentación oscura.

## 7.2 Cinéticas de crecimiento de *Clostridium beijerinckii*

El crecimiento celular del microorganismo anaerobio seleccionado fue probado a diferentes concentraciones de sustrato para obtener información acerca de su curva de crecimiento (fases de adaptación, crecimiento exponencial y decaimiento). Se determinó la tasa de crecimiento específico a diferentes concentraciones de dextrosa, Figura 8, para obtener algunos parámetros cinéticos como el valor de la constante de saturación media ( $K_s = 2.1 \text{ kg DQO m}^{-3}$ ) y la máxima tasa de crecimiento específico ( $\mu_{\max} = 3.2 \text{ d}^{-1}$ ) de la ecuación de Monod. La bacteria *C. beijerinckii* mostró una fase de adaptación o lag de 14 horas, seguido de un crecimiento exponencial durante 10 h, alcanzando una fase estacionaria por 30 min y, finalmente mostrar un lento decaimiento. Estos resultados acerca de los parámetros bioquímicos son similares a los reportados por Lin *et al.*<sup>49</sup> en su investigación acerca de la producción de hidrogeno con el género *Clostridium* usando glucosa como sustrato.



**Figura 8.** Cinética de crecimiento tipo Monod para la bacteria *C. beijerinckii* a diferentes concentraciones de dextrosa.



### 7.3 Simulación del proceso de fermentación oscura

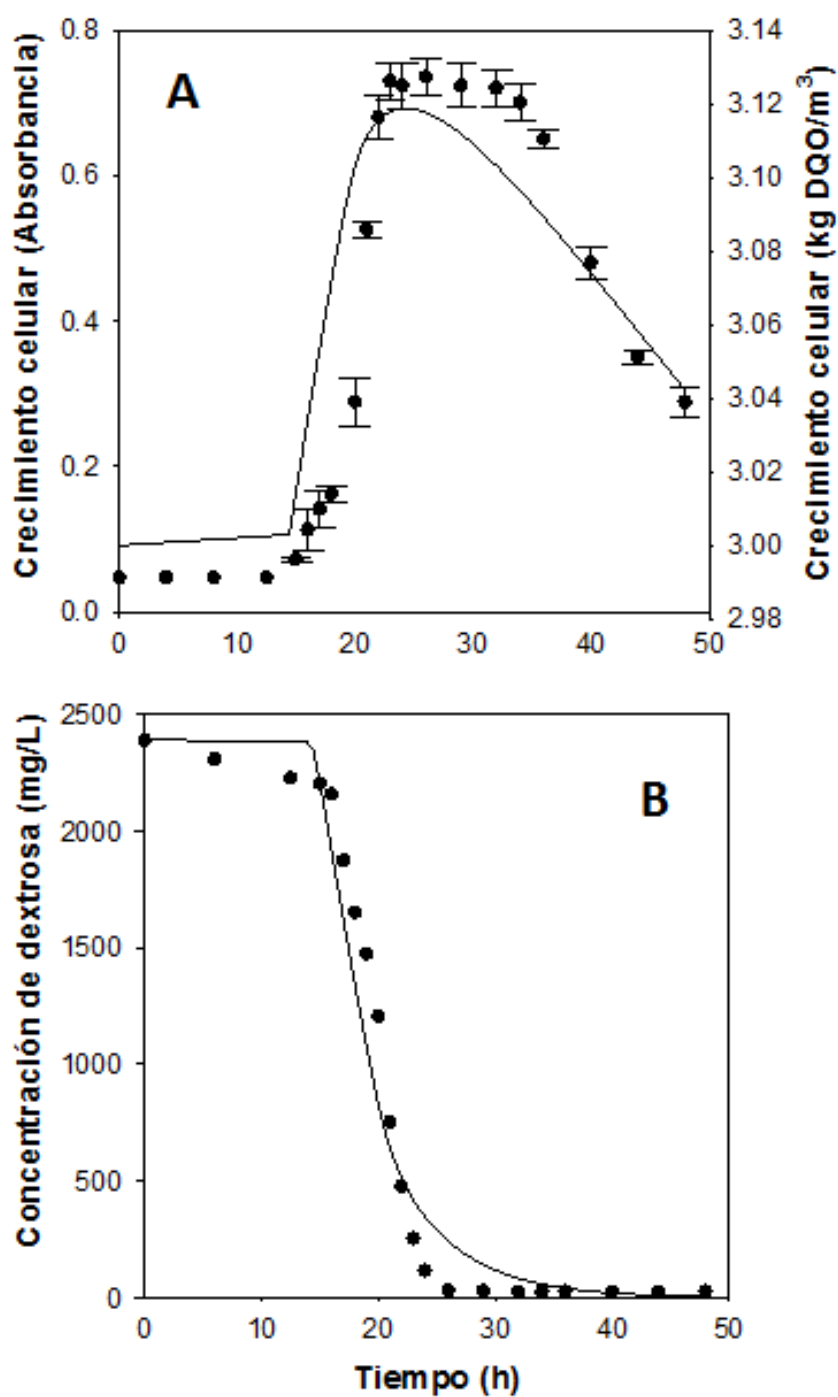
Posterior al proceso de calibración del modelo propuesto, se realizaron pruebas de producción potencial de biohidrógeno (BHP) para reunir información experimental acerca de las variables que describen el modelo que representa la fermentación oscura, además estos datos experimentales fueron usados para validar el modelo. Las Figuras 9-11 muestran el comportamiento de las variables monitoreadas durante las pruebas BHP y las variables de entrada al modelo son presentadas en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Valores de los parámetros estequiométricos modificados para ADM1.

Especie	Variable	Concentración	Unidades
Dextrosa	$S_{su}$	2.6	$\text{kg m}^{-3}$
Lactato	$S_{lac}$	0	$\text{kg m}^{-3}$
Etanol	$S_{EtOH}$	0	$\text{kg m}^{-3}$
Ácido butírico	$S_{bu}$	0	$\text{kg m}^{-3}$
Ácido propiónico	$S_{pro}$	0	$\text{kg m}^{-3}$
Ácido acético	$S_{ac}$	0	$\text{kg m}^{-3}$
<i>C. beijerinckii</i>	$X_{su}$	0.6	Abs

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, sin embargo, se omitieron las barras de error en algunas gráficas (Figuras 9B, 10 y 11) debido a que el error fue menor 0.5 desviaciones estándar, considerado como un error despreciable o no significativo. La densidad óptica mostró la mayor desviación durante su determinación experimental por lo cual sus barras de error se muestran en el gráfico correspondiente.

Los datos experimentales del crecimiento celular de *C. beijerinckii* (Figura 9A) son reportados como absorbancia, mientras que los datos obtenidos por la simulación fueron graficados como  $\text{kg DQO m}^{-3}$  debido a la falta de un factor de conversión entre la absorbancia y DQO.



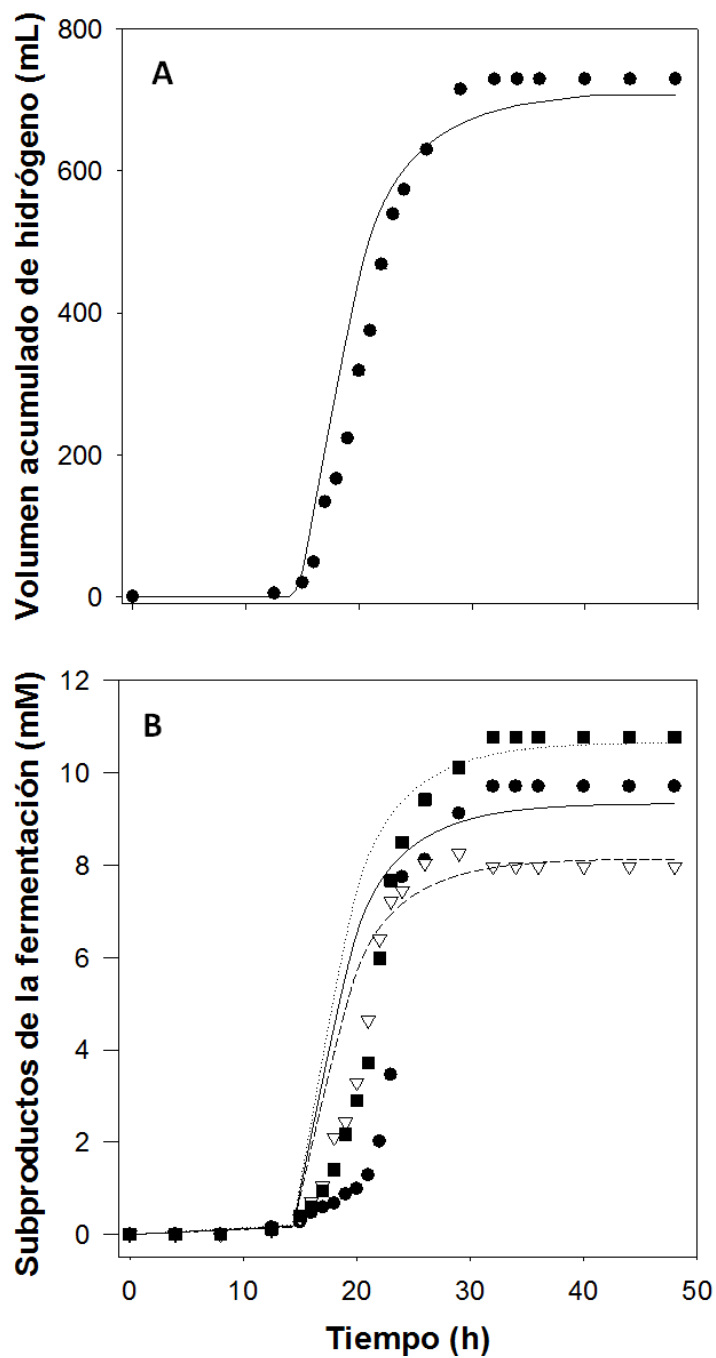
**Figura 9.** (A) Cinética de crecimiento de la bacteria *C. beijerinckii*, los datos experimentales son medidos como absorbancia (eje izquierdo) y los simulados medidos en kg DQO/m<sup>3</sup> (eje derecho); (B) consumo de dextrosa. Los datos experimentales son mostrados como puntos y las líneas representan los datos simulados.

Sin embargo, una concentración inicial de  $3 \text{ kg DQO m}^{-3}$  para el microorganismo anaerobio fue seleccionado para alcanzar un comportamiento similar entre los datos experimentales y los obtenidos por la simulación de los perfiles del crecimiento celular, consumo de dextrosa, tasa de producción de hidrógeno y subproductos de fermentación. Los valores de parámetros bioquímicos para bacterias acidogénicas fueron tomadas de lo reportado en el modelo original (ADM1) para realizar las simulaciones de fermentación oscura. Sin embargo, valores de algunos parámetros ( $\mu$ ,  $K_s$ ,  $\text{pH}_{UL}$  and  $\text{pH}_{LL}$ ) fueron cambiados basados en los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento.

Durante la fase de adaptación (Figura 9A) se observa un lento consumo de dextrosa (Figura 9B) debido a que el microorganismo regula sus actividades metabólicas para adaptarse a las condiciones del medio o fase líquida. Después de la adaptación del microorganismo, la bacteria empieza su crecimiento exponencial, fase en la cual se observa un rápido consumo de dextrosa alcanzando un 95% de consumo a las 24 h, y un 98% a las 48 h. El lento consumo de sustrato entre las 24 y 48 h es atribuido a las condiciones ácidas ( $\text{pH} < 5.4$ ) de la fase líquida, así como a la baja concentración tanto de carbón inorgánico como dextrosa. La simulación realizada con el modelo propuesto predice con resultados aceptables el perfil dinámico del sustrato obteniendo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.96 entre los datos experimentales y los simulados. Se encontraron ligeras desviaciones con respecto a los datos experimentales después de las 20 horas de fermentación, este comportamiento podría sugerir que las funciones de inhibición tienen un efecto importante en el desempeño del microorganismo, debido a que el valor de pH disminuye la capacidad de la bacteria para continuar con sus actividades metabólicas.

En la Figura 10A se muestra el volumen acumulado de hidrógeno reportado en condiciones estándar (0°C y 1 atm). Durante la fase de adaptación de la curva de crecimiento (Figura 9A), no se detectó producción de hidrógeno. Después de 14 h de iniciar las pruebas BHP, se observó una producción exponencial de hidrógeno (Figura 10A) debido al rápido crecimiento de la bacteria (9A) que asimila el 95% del sustrato disponible (9B) generando hidrógeno y dióxido de carbono como los productos principales de la fase gaseosa. Resultados similares sobre el perfil de consumo de sustrato y volumen acumulativo de hidrógeno fueron reportados por Taguchi *et al.*<sup>62</sup> and Lo *et al.*<sup>63</sup> usando hexosas como sustrato para microorganismos anaerobios.

La bacteria anaerobia del presente proyecto (*C. beijerinckii*) es una gran productora de hidrógeno con un rendimiento de 3.58 mol de H<sub>2</sub>/mol de sustrato, sin embargo, es muy sensible a pH ácidos (pH < 5.0) y muestra baja producción de hidrógeno (incluso ausencia de actividad metabólica) a pH menores a 4.5. La simulación de la producción de hidrógeno por el modelo propuesto en el presente proyecto mostró una buena correlación entre los datos predichos y los experimentales ( $R^2=0.97$ ). Los resultados de la simulación (curva de crecimiento microbiano y producción de hidrógeno) sugieren que el modelo está bien estructurado, y que puede predecir escenarios de fermentación oscura una vez que las variables de operación son conocidas. Diferentes investigadores<sup>64–66</sup> han reportado un rendimiento de hidrógeno en un intervalo de 1.1 a 3.4 mol de H<sub>2</sub>/mol de sustrato usando residuos agroindustriales, hexosas y aguas residuales como sustrato para microorganismos fermentativos.

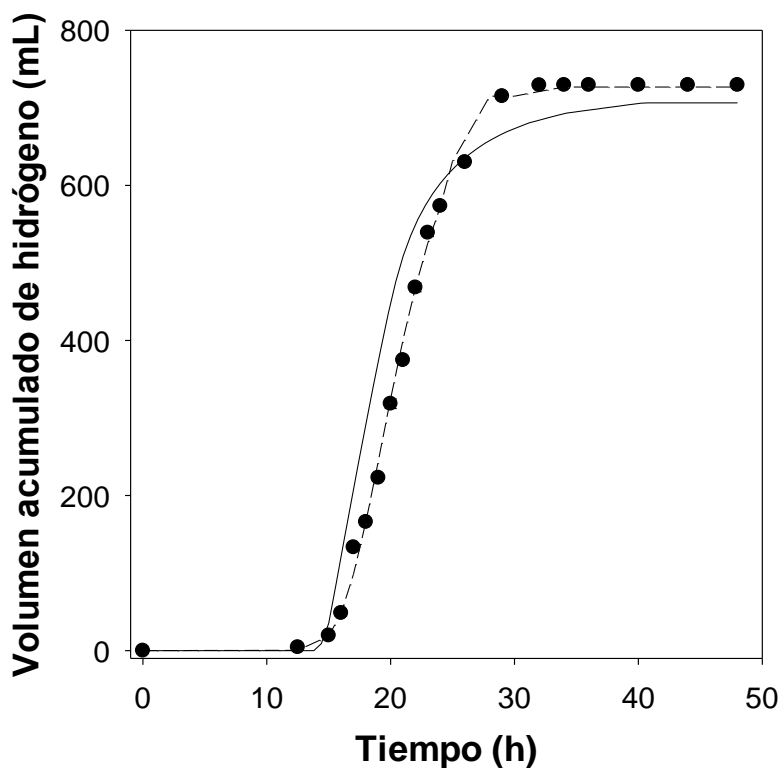


**Figura 10.** (A) Volumen acumulado de hidrógeno a condiciones estándar ( $0^{\circ}\text{C}$ , 1 atm) y (B) subproductos de la fermentación en la fase líquida: (●) alcohol etílico, (■) ácido butírico y (▽) ácido acético. Los datos experimentales son mostrados como puntos y las líneas representan los datos simulados.

Los principales subproductos de fermentación generados por *C. beijerinckii* fueron ácido butírico, etanol y ácido acético (Figura 10B) en una relación molar (mol de subproducto por mol de dextrosa) de 1.21, 1.09 y 0.89, respectivamente. Estos resultados son consistentes con algunos reportados en literatura<sup>67-69</sup> sobre *Clostridium* sp. los cuales son productores de butanol y ácido acético. La bacteria anaerobia seleccionada para llevar a cabo las pruebas BHP no sólo es una productora potencial de hidrógeno, sino que además genera subproductos de fermentación en la fase líquida que pueden ser usados como materia prima en procesos químicos, posterior de un proceso de separación y purificación de cada componente de la mezcla líquida. Por otra parte, estos subproductos de fermentación pueden ser usados como sustratos en el proceso de digestión anaerobia para bacterias metanogénicas. La predicción de los subproductos de la fermentación es mostrada en la Figura 10B, el comportamiento de los gráficos muestran tendencias muy similares a los datos experimentales obtenidos en este proyecto.

Algunos investigadores<sup>15,20,59</sup> reportaron un buen ajuste ( $R^2 > 0.95$ ) entre los datos experimentales y la simulación de la producción de hidrógeno; sin embargo, los modelos matemáticos expuestos están basados en expresiones empíricas. Por ejemplo, la ecuación de Gompertz modificada relaciona tres parámetros de ajuste a los datos experimentales los cuales son estimados mediante el método de mínimos cuadrados. En la Figura 11 se muestra la comparación entre el modelo de Gompertz y el modelo propuesto en este proyecto basado en ADM1 junto con los datos experimentales. Los parámetros de la ecuación de Gompertz fueron el tiempo de adaptación (15.98 h), potencial máximo de producción (727 mL) y tasa de producción de hidrógeno (220 mL/h), este modelo mostró una buena correlación con respecto a los datos experimentales ( $R^2 = 0.99$ ).

Aunque la ecuación de Gompertz puede representar los datos experimentales con una mejor correlación que el modelo predictivo propuesto basado en ADM1 ( $R^2=0.97$ ), la ecuación de Gompertz es un modelo descriptivo y no considera los procesos de naturaleza bioquímica, fisicoquímica y transferencia de masa del proceso de fermentación oscura debido a que sólo es un modelo de ajuste. Por otro lado, la curva de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y subproductos de fermentación no pueden ser descritos por la ecuación de Gompertz. Otros investigadores<sup>46,48,70</sup> reportaron modelos más estructurados los cuales consideran procesos bioquímicos descritos por expresiones cinéticas de primer orden y ecuaciones matemáticas tipo Monod.



**Figura 11.** Volumen acumulado de hidrógeno producido por *C. beijerinckii*: (●) datos experimentales, modelo de Gompertz (líneas discontinuas) y el modelo propuesto (línea continua).

Sin embargo, aunque sus publicaciones muestran resultados aceptables (asociados con el consumo de sustrato y producción de hidrógeno), no hay evidencia acerca del análisis de factores de inhibición, procesos de transferencia de masa y subproductos de la fase líquida. Por otra parte, aunque el modelo propuesto fue capaz de predecir la máxima concentración y comportamiento en la parte estacionaria del perfil de concentración de cada subproducto de fermentación, hay importantes desviaciones durante la fase exponencial (14 a 22 h) de la curva de crecimiento microbiano. Estas diferencias entre los datos experimentales y los datos simulados pueden ser atribuidas a tres importantes consideraciones. La primera consideración incluye la ausencia del conjunto de valores correctos de los parámetros bioquímicos relacionados con el *C. beijerinckii*. El segundo punto considera que las ecuaciones del perfil dinámico para el sustrato y subproductos de fermentación tienen la misma estructura matemática (ecuación tipo Monod), pero no la misma velocidad de asimilación, por lo que es necesario un factor adicional que relacione el concepto de velocidad con cada subproducto de fermentación. Y, por último, la tercera consideración está relacionada con el modelo fisicoquímico y el efecto del medio buffer sobre el crecimiento celular y neutralización de la fase acuosa.



### Conclusiones

El modelo propuesto en esta investigación, basado en la estructura de ADM1 es capaz de predecir el comportamiento dinámico de los procesos biológicos, fisicoquímicos y de transferencia de masa de la fermentación oscura.

El microorganismo *C. beijerinckii* es una bacteria anaerobia estricta que presenta una fase de adaptación al medio P2 de 14 horas, posteriormente mantiene un crecimiento exponencial durante 10 h, alcanzando una fase estacionaria por un periodo de 30 min, y empezar un lento decaimiento.

Las cinéticas de crecimiento de *C. beijerinckii* permitieron la obtención de los parámetros de la ecuación de Monod determinado el valor de la constante de saturación media ( $K_s = 2.1 \text{ kg COD m}^{-3}$ ) y la tasa de crecimiento máximo específico ( $\mu_{\max} = 3.2 \text{ d}^{-1}$ ), además de mostrar un intervalo de pH adecuado ( $4.5 < \text{pH} < 6.5$ ) para mantener sus funciones metabólicas.

La bacteria anaerobia seleccionada es muy sensible a condiciones ácidas del medio, mostrando incluso ausencia de actividad metabólica a  $\text{pH} < 4.5$ , por lo que es necesario un aporte adicional de alcalinidad para mantener condiciones de pH adecuados en el medio líquido.

*Clostridium beijerinckii* es capaz de producir hidrógeno con un rendimiento de 3.58 mol/mol de sustrato, además de producir ácido butírico, etanol y ácido acético en una relación molar (mol de producto/mol de dextrosa) de 1.21, 1.09 y 0.89, respectivamente.

Las pruebas de potencial bioquímico de producción de hidrógeno facilitaron la validación del modelo propuesto para la fermentación oscura. Los resultados de las simulaciones realizadas predijeron satisfactoriamente, con un coeficiente de correlación mayor que 0.92, los perfiles de consumo de sustrato, crecimiento microbiano y producción de biohidrógeno.

Las simulaciones realizadas muestran una buena correlación entre los datos experimentales y las tendencias de los perfiles de los subproductos de la fermentación en la fase líquida; sin embargo, aunque muestran similitudes en las magnitudes de las concentraciones máximas de cada especie así como tendencias de la fase estacionaria, se muestran ligeras desviaciones durante la fase exponencial del crecimiento del microorganismo. Dichas desviaciones pueden ser atribuidas a la falta de los valores de los parámetros bioquímicos de la bacteria estudiada, a la falta de un factor cinético específico para cada especie de la fase líquida adicional a la estructura de las ecuaciones tipo Monod, y de la inclusión del efecto del medio buffer o aporte adicional con carbonatos en el modelo fisicoquímico.

# Referencias bibliográficas

1. Sawin JL. *Renewables 2015. Global Status Report*. Paris, France: REN21 Secretariat; 2015.
2. Maser Cerutti O, Coralli F, Bustamante CG, et al. *La Bioenergía En México. Situación Actual y Perspectivas*. México; 2011.
3. Wang J, Wan W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*. 2008;33(20):5392-5397. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.010.
4. Cristobal J, Sandoval M. Secretaria de energía. Lista de combustibles que se considerarán para identificar a los usuarios con un padrón de alto consumo. *D Of*. 2013;4:4-20.
5. SENER. *Estrategia Nacional de Energía 2013-2027*. México; 2013.
6. AeH2. Tecnologías de hidrógeno y pilas de combustible. 2016.
7. Skonieczny MT, Yargeau V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *Int J Hydrogen Energy*. 2009;34(8):3288-3294. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.01.044.
8. Gadhamshetty V, Arudchelvam Y, Nirmalakhandan N, Johnson DC. Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *Int J Hydrogen Energy*. 2010;35(2):479-490. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.11.007.
9. Shubert, R., Schellnhuber, H.J., Buchmann, N., Griefhammer, R., Kulesa, M., Messner, D., Rhmstorf, S., Schmid J. *Future Bioenergy and Sustainable Land Use*. Berlin: Earthscan; 2009. doi:10.4324/9781849774505.
10. Dhamodharan K, Kalamdhad AS. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. *J Environ Chem Eng*. 2014;2(3):1821-1830. doi:10.1016/j.jece.2014.07.024.
11. Mccarty PL, Smith DP. Anaerobic Waste-Water Treatment. *Environ Sci Technol*. 1986;20(12):1200-1206. doi:10.1021/es00154a002.

12. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker J. *Brock. Biology of Microorganisms*. 10th ed. San Francisco, CA: Pearson, Prentice Hall; 2003.  
[http://www.pearsonhighered.com/educator/academic/product/0,,0130662712-TOC,00%2Ben-USS\\_01DBC.html#sthash.b0XBqOFT.dpuf](http://www.pearsonhighered.com/educator/academic/product/0,,0130662712-TOC,00%2Ben-USS_01DBC.html#sthash.b0XBqOFT.dpuf).
13. Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel HD. *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*. Fourth. Singapore: Mc Graw Hill; 2004.
14. Parkin GF, Owen WF. Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges. *J Environ Eng*. 1986;112(5):867-920. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1986)112:5(867).
15. Pan CM, Fan YT, Zhao P, Hou HW. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *Int J Hydrogen Energy*. 2008;33(20):5383-5391. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.037.
16. Zhao X, Xing D, Fu N, Liu B, Ren N. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. *Bioresour Technol*. 2011;102(18):8432-8436. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.086.
17. Angelidaki I, Ellegaard L, Ahring BK. A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnol Bioeng*. 1999;63(3):363-372. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<363::AID-BIT13>3.0.CO;2-Z.
18. Rivas-García, Pasiano; Estrada-Baltazar, Alejandro; Botello-Álvarez JE. Evaluación ambiental y modelado matemático de los procesos de digestión de residuos en la producción lechera en el Estado de Guanajuato. 2014.
19. Batstone, D.J.; Keller, J.; Angelidaki, I.; Kalyzhnyi, S.; Pavlostathis, S.G.; Rozzi, A.; Sanders, W.T.; Siegrist, H.; Vavilin VA. *Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1)*. London: IWA Publishing; 2002.
20. Khanal SK, Chen WH, Li L, Sung S. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy*. 2004;29(11):1123-1131. doi:10.1016/j.ijhydene.2003.11.002.
21. Mu Y, Wang G, Yu HQ. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour Technol*. 2006;97(11):1302-1307. doi:10.1016/j.biortech.2005.05.014.

22. Whitman WG. The Two-Film Theory of Gas Absorption. *Chem Metall Eng.* 1924;29(4):146-148.
23. Batstone DJ, Keller J, Steyer JP. A review of ADM1 extensions, applications, and analysis: 2002-2005. *Water Sci Technol.* 2006;54(4):1-10. doi:10.2166/wst.2006.520.
24. Antonopoulou G, Gavala HN, Skiadas I V., Lyberatos G. ADM1-based modeling of methane production from acidified sweet sorghum extract in a two stage process. *Bioresour Technol.* 2012;106(1):10-19. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.088.
25. Skiadas I V, Gavala HN, Lyberatos G. Modelling of the periodic anaerobic baffled reactor (PABR) based on the retaining factor concept. *Water Res.* 2000;34(15):3725-3736. doi:10.1016/S0043-1354(00)00137-8.
26. Schausberger P, Bösch P, Friedl A. Modeling and simulation of coupled ethanol and biogas production. *Clean Technol Environ Policy.* 2010;12(2):163-170. doi:10.1007/s10098-009-0242-3.
27. Zhang Y, Piccard S, Zhou W. Improved ADM1 model for anaerobic digestion process considering physico-chemical reactions. *Bioresour Technol.* 2015;196:279-289. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.065.
28. Wild D, Kisliakova a., Siegrist H. Prediction of recycle phosphorus loads from anaerobic digestion. *Water Res.* 1997;31(9):2300-2308. doi:10.1016/S0043-1354(97)00059-6.
29. Federovich V., Lens P. KS. Extension of Anaerobic Digestion Model No . 1. *Appl Biochem Biotechnol.* 2003;109:33-45.
30. Barrera EL, Spanjers H, Solon K, Amerlinck Y, Nopens I, Dewulf J. Modeling the anaerobic digestion of cane-molasses vinasse: Extension of the Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) with sulfate reduction for a very high strength and sulfate rich wastewater. *Water Res.* 2015;71:42-54. doi:10.1016/j.watres.2014.12.026.
31. Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM. Critical analysis of some concepts proposed in ADM1. *Water Sci Technol.* 2006;54(4):51. doi:10.2166/wst.2006.525.
32. Tugtas AE. Effect of Nitrate Reduction on the Methanogenic Fermentation: Process Interactions and Modeling. 2007;(October).

33. Tugtas a. E, Tezel U, Pavlostathis SG. A comprehensive model of simultaneous denitrification and methanogenic fermentation processes. *Biotechnol Bioeng*. 2010;105(1):98-108. doi:10.1002/bit.22443.
34. Zonta Ž, Alves MM, Flotats X, Palatsi J. Modelling inhibitory effects of long chain fatty acids in the anaerobic digestion process. *Water Res*. 2013;47(3):1369-1380. doi:10.1016/j.watres.2012.12.007.
35. Alves MM, Pereira MA, Sousa DZ, et al. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microb Biotechnol*. 2009;2(5):538-550. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00100.x.
36. Langerak E. *Control of Calcium Carbonate Precipitation in Anaerobic Reactors.*; 1998. <http://library.wur.nl/WebQuery/wda/959640>.
37. Barat R, Montoya T, Seco a., Ferrer J. Modelling biological and chemically induced precipitation of calcium phosphate in enhanced biological phosphorus removal systems. *Water Res*. 2011;45(12):3744-3752. doi:10.1016/j.watres.2011.04.028.
38. Kazadi Mbamba C, Tait S, Flores-Alsina X, Batstone DJ. A systematic study of multiple minerals precipitation modelling in wastewater treatment. *Water Res*. 2015;85:359-370. doi:10.1016/j.watres.2015.08.041.
39. Batstone DJ, Keller J. Industrial applications of the IWA anaerobic digestion model No.1 (ADM1). *Water Sci Technol*. 2003;47(12):199-206.
40. Barrera EL, Spanjers H, Dewulf J, Romero O, Rosa E. The sulfur chain in biogas production from sulfate-rich liquid substrates: A review on dynamic modeling with vinasse as model substrate. *J Chem Technol Biotechnol*. 2013;88(8):1405-1420. doi:10.1002/jctb.4071.
41. Fezzani B, Cheikh R Ben. Extension of the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation processes for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *J Hazard Mater*. 2009;162(2-3):1563-1570. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.127.
42. Ramirez I, Volcke EIP, Rajinikanth R, Steyer J-P. Modeling microbial diversity in anaerobic digestion through an extended ADM1 model. *Water Res*. 2009;43(11):2787-2800. doi:10.1016/j.watres.2009.03.034.

43. Galí a., Benabdallah T, Astals S, Mata-Alvarez J. Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresour Technol.* 2009;100(11):2783-2790. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.052.
44. Biernacki P, Steinigeweg S, Borchert A, Uhlenhut F. Application of Anaerobic Digestion Model No. 1 for describing anaerobic digestion of grass, maize, green weed silage, and industrial glycerine. *Bioresour Technol.* 2013;127(1):188-194. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.128.
45. Peiris BRH, Rathnasiri PG, Johansen JE, Kuhn a., Bakke R. ADM1 simulations of hydrogen production. *Water Sci Technol.* 2006;53(8):129. doi:10.2166/wst.2006.243.
46. Penumathsa BK V, Premier GC, Kyazze G, et al. ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach. *Water Res.* 2008;42(16):4379-4385. doi:10.1016/j.watres.2008.07.030.
47. Ntaikou I, Gavala HN, Lyberatos G. Application of a modified Anaerobic Digestion Model 1 version for fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract by *Ruminococcus albus*. *Int J Hydrogen Energy.* 2010;35(8):3423-3432. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.01.118.
48. Peiris BRH, Rathnasiri PG, Johansen JE, Kuhn A, Bakke R. ADM1 simulations of hydrogen production. *Water Sci Technol.* 2006;53(8):129-137. doi:10.2166/wst.2006.243.
49. Lin PY, Whang LM, Wu YR, et al. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *Int J Hydrogen Energy.* 2007;32(12):1728-1735. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.12.009.
50. Alkaya E, Demirer GN. Anaerobic acidification of sugar-beet processing wastes: Effect of operational parameters. *Biomass and Bioenergy.* 2011;35(1):32-39. doi:10.1016/j.biombioe.2010.08.002.
51. Mccarty PL, Mckinney RE. Volatile acid toxicity in anaerobic digestion. *Water Pollut Control Fed.* 1961;33(3):223-232.
52. Davila-Vazquez G, de León-Rodríguez A, Alatríste-Mondragón F, Razo-Flores E. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy.* 2011;35(7):3174-3181. doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.046.

53. Garcia-Peña EI, Parameswaran P, Kang DW, Canul-Chan M, Krajmalnik-Brown R. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. *Bioresour Technol.* 2011;102(20):9447-9455. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.068.
54. Kim S-H, Han S-K, Shin H-S. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy.* 2004;29(15):1607-1616. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.02.018.
55. Mccarty PL, Mckinney RE. Salt toxicity in anaerobic digestion. *Water Pollut Control Fed.* 1961;33(4):399-415.
56. Mshandete A, Kivaisi A, Rubindamayugi M, Mattiasson B. Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes. *Bioresour Technol.* 2004;95(1):19-24. doi:10.1016/j.biortech.2004.01.011.
57. Ponsá S, Gea T, Sánchez A. Anaerobic co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste with several pure organic co-substrates. *Biosyst Eng.* 2011;108(4):352-360. doi:10.1016/j.biosystemseng.2011.01.007.
58. Rosen C, Jeppsson U. Aspects on ADM1 Implementation within the BSM2 Framework. *Tech Rep.* 2006:1-37.
59. Siegrist H, Vogt D, Garcia-Heras JL, Gujer W. Mathematical model for meso- and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Environ Sci Technol.* 2002;36(5):1113-1123. doi:10.1021/es010139p.
60. Ye X, Zhang X, Morgenroth E, Finneran KT. Anthrahydroquinone-2 , 6-disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose , xylose , and cellobiose. *Int J Hydrogen Energy.* 2012;37(16):11701-11709. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.05.018.
61. Ye X, Zhang X, Morgenroth E, Finneran KT. Exogenous anthrahydroquinone-2,6-disulfonate specifically increases xylose utilization during mixed sugar fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Int J Hydrogen Energy.* 2012;38(6):2719-2727. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.11.149.
62. Taguchi F, Chang JD, Mizukami N, Saito-Taki T, Hasegawa K, Marimoto M. Isolation of a



- hydrogen-producing bacterium, *Clostridium beijerinckii* strain AM21B, from termites. 2008;3(1):44-47.
63. Lo YC, Bai M Der, Chen WM, Chang JS. Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. *Bioresour Technol.* 2008;99(17):8299-8303. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.004.
  64. García-Depraect O, Gómez-Romero J, León-Becerril E, López-López A. A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *Int J Hydrogen Energy.* 2017;1-12. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.11.204.
  65. Ntaikou I, Antonopoulou G, Lyberatos G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. *Waste and Biomass Valorization.* 2010;1(1):21-39. doi:10.1007/s12649-009-9001-2.
  66. Ren N, Guo W, Liu B, Cao G, Ding J. Biological hydrogen production by dark fermentation: Challenges and prospects towards scaled-up production. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22(3):365-370. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.022.
  67. Kim JK, Nhat L, Chun YN, Kim SW. Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2008;13(4):499-504. doi:10.1007/s12257-008-0142-0.
  68. Baer SH, Blaschek HP, Smith TL. Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. 1987;53(12):2854-2861.
  69. Levin DB, Islam R, Cicek N, Sparling R. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int J Hydrogen Energy.* 2006;31(11):1496-1503. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.06.015.
  70. Nath K, Muthukumar M, Kumar A, Das D. Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. *Int J Hydrogen Energy.* 2008;33(4):1195-1203. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.12.011.