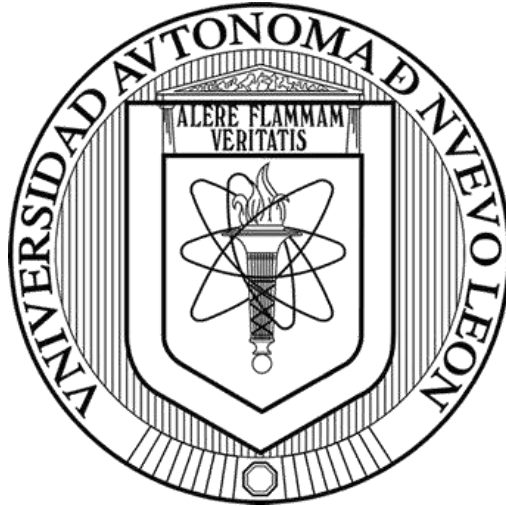


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL



**PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE UNA
CODIGESTIÓN ANAEROBIA UTILIZANDO AGUA RESIDUAL DE
LA INDUSTRIA ALIMENTICIA EN UN REACTOR CONTINUO
EMPLEANDO CONSORCIOS MICROBIANOS MIXTOS.**

POR
ALFREDO CRUZ MÉNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

FEBRERO, 2021



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FECHA: 2021/01/10

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE UNA CODIGESTIÓN ANAEROBIA UTILIZANDO AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA ALIMENTICIA EN UN REACTOR CONTINUO EMPLEANDO CONSORCIOS MICROBIANOS MIXTOS"**, que presenta el **ING. ALFREDO CRUZ MÉNDEZ**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dr. Arquímedes Cruz López

Evaluador



Av. Universidad S/N Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455
Tels. (81) 14424400 ext. 4448 | 83294000 ext. 7216, 7234
correo electrónico: spi.fc@uanl.mx



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 2020/12/12

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de TESIS, cuyo título es **"PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE UNA CODIGESTIÓN ANAEROBIA UTILIZANDO AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA ALIMENTICIA EN UN REACTOR CONTINUO EMPLEANDO CONSORCIOS MICROBIANOS MIXTOS"**, que presenta el ING. ALFREDO CRUZ MÉNDEZ, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS, del programa MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento CUENTA con la calidad y nivel CIENTÍFICO, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea APROBADO.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dr. Santiago Iván Suárez Vázquez

Co-Director y Evaluador de la Tesis



Av. Universidad S/N, Cd. Universitaria, CP 66455
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
Tels. 81 83294000 ext. 7200 / 8114424400
<http://fic.uanl.mx>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

FECHA: 2020/DIC/11

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es "**PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE UNA CODIGESTIÓN ANAEROBIA UTILIZANDO AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA ALIMENTICIA EN UN REACTOR CONTINUO EMPLEANDO CONSORCIOS MICROBIANOS MIXTOS**", que presenta el **ING. ALFREDO CRUZ MÉNDEZ**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dr. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez
Laboratorio de Biotecnología
Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Evaluador



**Producción de biohidrógeno a partir de una codigestión anaerobia
utilizando agua residual de la industria alimenticia en un reactor
continuo empleando consorcios microbianos mixtos.**

APROBACIÓN DE LA TESIS:

Dr. Arquímedes Cruz López

Director de tesis

Dr. Santiago Iván Suárez Vázquez

Revisor

Dr. Jorge Ágel Isidro Ascasio Martínez

Revisor

Dr. Gerardo Fajardo San Miguel

Subdirector de estudios de posgrado e investigación

RESUMEN

El presente trabajo propuso la evaluación en la codigestión de dos residuos de la industria alimenticia, sustrato industrial de cervecera (SIC) y sustrato industrial lácteo (SIL), para la producción de bioH₂. La primera etapa experimental consistió en la preparación de microrreactores tipo batch a partir de diferentes mezclas entre ambos sustratos con relaciones C/N de 20, 25, 30, 35 y 50 e inoculándose con dos consorcios microbianos mixtos, nombrados inóculo granular (IG) e inóculo de composta (IC). Cada sistema de reacción fue llevado a cabo en botellas serológicas de 124 mL con un volumen de trabajo de 90 mL, temperatura controlada a 35°C, velocidad de agitación de 100 RPM y el pH inicial de 5.5 ± 0.2. En una segunda etapa experimental, se consideró homologar el sistema de reacción con el mejor rendimiento a un reactor continuo de flujo ascendente. El reactor fue puesto en marcha con un volumen de trabajo de 2 L. La producción de bioH₂ en continuo fue evaluada a diferentes tiempos de retención hidráulica (TRH) siendo 3, 9 y 12 h, utilizando IG como inóculo, relación C/N = 35, a temperatura ambiente y pH inicial a 5.5 ± 0.3.

Para la caracterización fisicoquímica de los sustratos individuales y en codigestión durante las etapas experimentales consistió en la determinación del pH, de carbohidratos totales, de la Demanda Química de Oxígeno, de Nitrógeno Total, de Sólidos Totales Volátiles y de Sólidos Suspendedos Totales además del análisis de cromatografía de gases para cuantificar la producción de bioH₂ y Ácidos Grasos Volátiles.

Los resultados obtenidos a nivel microrreactor muestran que los sustratos SIL-SIC en codigestión tienen alto potencial para la producción de bioH₂ a pesar de la caída abrupta del pH hasta 3.5 en las 32 h respecto a las monodigestiones y la naturaleza del inóculo (IG o IC). En cuanto a la degradación de la materia orgánica, los carbohidratos totales y sólidos totales, mantuvieron una tendencia decreciente y remociones mayores al 90 %. Sin embargo, la mayor producción fue observada con los reactores con IG como inóculo con 103, 180, 125, 215 y 104 mL para las relaciones C/N 20, 25, 30, 35 y 50 respectivamente. A partir de los cálculos de rendimiento se determinó que la relación C/N = 35 presentó un rendimiento de 60.6 ± 1.8 mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹ para IG y 72.9 ± 5.8 mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹ para IC. En base a los resultados obtenidos se realizó el ajuste de los datos experimentales con la ayuda del modelo doble de Gompertz el cual indicó la máxima acumulación de bioH₂ (H_{Máx}) = 243.7 mL H₂, la velocidad máxima de reacción (R_{Máx}) = 15.07 mL H₂ h⁻¹, tiempo de adaptación de 1 h para la primera etapa y 22.86 para la segunda etapa, con una R² = 0.99 para la relación C/N 35 e IG.

El estudio de la identificación microbiana a los diferentes tiempos de reacción demostró que algunas especies productoras de bioH₂ mantuvieron mayor actividad las primeras 8 h de reacción. Entre las especies productoras de bioH₂ se encontró la *Citrobacter sp* y especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *Hafnia alvei* y *Rahnella sp* utilizando el inóculo IC y especies como *Megasphaera elsdenii* y *Prevotella sp* con inóculo IG.

Los resultados de la producción de bioH₂ en continuo (reactor UASB) a diferentes tiempos de retención hidráulicos (TRH's), evidenció la producción de bioH₂ durante 20 ciclos, empleando la codigestión SIL-SIC con la relación C/N = 35, el IG y el ajuste del pH = 5.5. Para mostrar este propósito se estudiaron 3 TRH = 3, 8 y 12h. Los resultados obtenidos mostraron la acidificación de los reactores hasta pH<4 durante todo el intervalo de estudio, pero la operación del reactor UASB con un TRH = 9 h logró incrementar 10 veces la producción de biogás respecto al reactor cuando operó a un TRH = 3 h. Del análisis de los gases permanentes (hidrógeno, dióxido de carbono, principalmente) y ácidos grasos se observó que los 3 experimentos alcanzan su mayor producción de bioH₂ entre los ciclos 10 a 18 posiblemente como resultados de la aclimatación de las especies productoras de bioH₂. En analogía con los resultados del análisis microbiológico para la codigestión SIL-SIC entre los microrreactores batch a tiempo de 8 h y los experimentos en el reactor TRH = 9 h posiblemente las especies predominantes como *Lactobacillus casei* (4%), *Lactobacillus delbrueckii* (7%), *Leucobostoc mensenteroides* (20%), *Lactococcus lactis* (44%) y *Bacilli* (7%), sean las que proliferan durante la operación del reactor en los diferentes ciclos, atribuyendo la probable sinergia entre los sustratos y las especies *Lactococcus lactis*, *Megasphaera elsdenii* y *Prevotella sp* como la productoras de bioH₂. Este mismo caso aplica para el TRH=12 donde el análisis microbiológico en sistema batch a 24 h, revela que especies como *Lactobacillus casei* (13%) y el género *Bacilli* (31%) causaron una disminución en el rendimiento de bioH₂. Además, que las rutas metabólicas del ácido acético y ácido butírico fueron predominantes y secundas por rutas del ácido propiónico y ácido valérico mismas que se validan con un análisis termodinámico. Finalmente, el rendimiento en la codigestión SIL-SIC demostró que el rendimiento máximo fue para el TRH = 9 h con 22.15 mmol H₂ g DQO⁻¹ seguido del TRH = 12 h con 1.01 mmol H₂ g DQO⁻¹ y el TRH = 3 h de 0.57 mmol H₂ g DQO⁻¹. En el caso de la productividad se encontró que el TRH = 9 mantuvo valores mayores a 0.35 L H₂ L⁻¹ d⁻¹, mientras que el TRH = 3 y 12 h estuvieron por debajo de 0.05 L H₂ L⁻¹ d⁻¹.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de conocer lo maravilloso que es la vida, reflejado en el amor de mis padres.

A mis padres, porque son mi mayor ejemplo de constancia, bondad y amor. Ellos a quienes les debo la persona que soy y que gracias a su apoyo y dedicación he dado un paso más en mi vida. Gracias a mi padre Víctor Manuel Cruz Aguilar, quien con sacrificio y esmero me ha apoyado a lo largo de mi carrera. Gracias a mi madre Yolanda Méndez Ramírez, quien ha participado en cada logro de mi vida y este no podría ser la excepción.

A mis hermanos, que a pesar de ser mayores que yo, se han preocupado por ser mis mejores amigos. A Eliseo, Maricela, Isaías y Tomás, quienes han apoyado cada una mis decisiones y aconsejado en cada momento.

A mi novia, Guadalupe Corro Rodríguez por el apoyo incondicional y compañía que me ha brindado.

A mis amigos, profesores, compañeros, en general, las personas que he tenido la oportunidad conocer y convivir, aportando un pedacito de su vida para construir la mía.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que a través del programa de becas nacionales me otorgó el apoyo financiero no. 717875 y por medio del proyecto CB-2011/168921 que cubrió parcialmente la realización de este proyecto.

Al Dr. Arquímedes Cruz López, por la participación como asesor del presente trabajo. Agradezco por su apoyo durante mi estancia de investigación, a la gestión que realizó a lo largo del mismo periodo que de otra manera no hubiese culminado en este exitoso proyecto. También agradezco las enseñanzas y conocimientos compartidos para formarme de manera integral.

A la Facultad de Ingeniería Civil por haber permitido hacer uso de las instalaciones de la facultad y contribuir a mi formación como maestro.

Al Dr. Benjamín Limón por contribuir en el desarrollo experimental de este proyecto, al facilitarnos el espacio del Laboratorio y equipos de Ingeniería Ambiental, FIC, UANL.

A la M.I. Lirio Reyna, por su asesoría y apoyo al realizar las actividades de la parte experimental del proyecto. Gracias a su ayuda constante y sus conocimientos, los cuales permitieron obtener excelentes resultados. Al Dr. Santiago por ser mi tutor a lo largo del proceso de enseñanza en el posgrado.

Al Dr. Carlos Abrego, quien además de facilitarme el aprendizaje en la maestría fue gracias a su disposición que podía ingresar al laboratorio y realizar los experimentos.

A mis amigos, a mi novia y a quienes les debo muchas vivencias, muchas risas, alegrías, tristezas, aventuras, y sobre todo les debo el apoyo incondicional, que dieron como resultado un logro más.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xvii
CAPÍTULO 1	
Introducción	2
1.1 Hipótesis.....	5
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos particulares.....	5
1.3 Justificación.....	6
1.4 Referencias	7
CAPÍTULO 2	
Antecedentes y Marco Teórico.....	11
2.1 Transición energética y la implementación de energías limpias.....	11
2.1.1 La biomasa como fuente alterna de energía.....	12
2.1.2 Producción de biogás a partir de residuos orgánicos	14
2.2 Potencial energético del bioH ₂ a partir de la biomasa disponible en México.....	15
2.2.1 Residuos agrícolas.....	16
2.2.2 Residuos domésticos municipales.....	16
2.2.3 Residuos industriales como sustrato renovable para la producción de bioH ₂	17
2.3 La fermentación oscura y las rutas metabólicas.....	19
2.3.1 Microorganismos involucrados en la producción de bioH ₂	19
2.3.2 Termodinámica de las rutas de reacción	20
2.3.3 Correlación entre los microorganismos y los productos intermediarios.....	21
2.4 Sistemas de reacción y diseño de reactores.....	23
2.4.1 Tipos de reactores y tiempo de retención hidráulica.....	23
2.4.2 El pH	25
2.4.3 La temperatura	26

2.4.4 La presión parcial de hidrógeno	26
2.5 Estrategias para aumentar el rendimiento de producción de bioH ₂	28
2.5.1 Fuente de inóculo	28
2.5.2 Producción en continuo.....	29
2.5.3 Control del pH.....	29
2.5.4 Codigestión	29
2.6 Aguas residuales en México.....	32
2.6.1 Calidad de los cuerpos receptores	32
2.6.2 Marco legal en las descargas de aguas residuales	33
2.7 Políticas públicas del hidrógeno en México.....	34
2.8 Referencias	35
CAPÍTULO 3	
Materiales y métodos	42
3.1 Introducción	42
3.2 Materiales y métodos	43
3.2.1 Sustrato.....	43
3.2.2 Inóculo	43
3.3 Métodos analíticos para evaluación de sustratos	45
3.3.1 Análisis bioquímico	45
3.4 Desarrollo del sistema de reacciones.	52
3.4.1 Diseño de experimentos para la codigestión en reactores tipo batch.....	52
3.4.2 Evaluación de reactores tipo Batch	52
3.4.3 Construcción y evaluación de reactor continuo	53
3.4.4 Métodos analíticos para la evaluación de la codigestión	55
3.4.5 Análisis de bioH ₂ y ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases	55
3.5 Extracción e identificación de las especies microbianas.....	58
3.6 Análisis cinético de las reacciones en batch	60
3.6.1 Modelo de Gompertz simple.....	60
3.6.2 Modelo Gompertz doble	60
3.7 Cálculos de Equilibrio químico.....	61
3.7 Referencias	62

CAPÍTULO 4

Resultados y discusión	65
4.1 Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales.....	65
4.1.1 Potencial de los cosustratos para la producción de biohidrógeno.....	65
4.2 Efecto de la relación C/N en microrreactores batch	67
4.2.1 Efecto de la relación C/N sobre el pH.....	67
4.2.2 Efecto de la relación C/N en la remoción de carga orgánica	68
4.2.3 Efecto de la relación C/N en la producción de bioH ₂	70
4.2.4 Efecto de relación C/N en la acumulación de los ácidos orgánicos.....	71
4.3 Efecto de inóculo en la codigestión (C/N = 25 y C/N = 35) en microrreactores batch	73
4.3.1 Evolución de los parámetros fisicoquímicos de los microrreactores en FO con IC.....	73
4.3.2 Evaluación de la relación C/N y su efecto sobre el rendimiento	74
4.4 Modelo cinético de los microrreactores en lote con IG e IC.....	76
4.4.1 Modelo Cinético de Gompertz.....	76
4.4.1 Modelo doble de Gompertz.....	77
4.5 Análisis microbiológico de los inóculos durante la FO	79
4.5.1 Inóculo granular	79
4.5.2 Inóculo de composta	81
4.6 Operación del Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente	86
4.6.1 Reactor UASB con TRH = 3 h.....	86
4.7 Efecto del tiempo de retención hidráulica en la producción de biohidrógeno	91
4.8 Análisis termodinámico	98
4.7 Referencias.....	100

CAPÍTULO 5

Conclusiones	104
5.1 Recomendaciones.....	105

ANEXOS

Anexo 1.....	107
Anexo 2.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre sustratos puros y sustratos a partir de residuos en reactores UASB	25
Tabla 2. Estudios donde se han empleado la codigestión de biomasa residual en reactores continuos de flujo ascendente.....	31
Tabla 3. Comparación de la norma mexicana y normas internacionales en materia de descarga de aguas residuales..	33
Tabla 4. Diseño de experimentos evaluados en reactores tipo batch.	52
Tabla 5. Resultados de la caracterización fisicoquímica de aguas residuales (SIC).	66
Tabla 6. Resultados de la caracterización fisicoquímica del suero de queso (SIL).....	66
Tabla 7. Porcentaje promedio de la remoción de carga orgánica durante la FO a partir de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N. pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.....	69
Tabla 8. Parámetros cinéticos del proceso de FO a partir de la ecuación modificada de Gompertz con la herramienta Solver®. Codigestión SIL-SIC, pH inicial 5.5, T=35°C.....	77
Tabla 9. Parámetros cinéticos en la codigestión SIL-SIC con relación C/N=25 y C/N=25 empleando los inóculos IG o IC empleando la ecuación modificada de Gompertz doble... ..	78
Tabla 10. Resultados de los AGV´s en relación al TRH.	97
Tabla 11. Efecto del TRH en las constantes de equilibrio.....	98
Tabla 12. Efecto del TRH en la energía libre de Gibbs.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del suministro de energía en México de 1990 a 2015..	11
Figura 2. Generación de energía a partir de la biomasa, a) generación porcentual por estado, b) generación por tipo de proceso.....	13
Figura 3. Potencial energético total de la biomasa en México..	15
Figura 4. Potencial energético total por tipo de biomasa industrial..	18
Figura 5. Ruta metabólica de biorreacción en la fermentación por consorcios microbianos mixtos.	21
Figura 6. Tipos de configuración de reactores para la fermentación oscura. a) Reactor de mezcla completa (CSTR), b) Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB), c) reactor anaerobio de lecho fluidizado (AFBR), d) Reactor de biomembranas (MBR), e) Reactor con deflectores (ABR).....	24
Figura 7. Supersaturación de bioH ₂ en un medio acuoso.....	26
Figura 8. Distribución porcentual de contaminación por DQO en cuerpos superficiales por RHA.....	32
Figura 9. Diagrama del flujo del proceso de la etapa experimental dentro del proyecto 249908 CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética.....	42
Figura 10. Fotografía del inóculo granular empleado durante el desarrollo de la FO empleando la codigestión SIL-SIC.....	44
Figura 11. Preparación e incubación de los reactores en primera ronda experimental.	53
Figura 12. Diagrama de flujo del proceso del reactor de flujo ascendente.	54
Figura 13. Detectores para cromatógrafo de gases, a) detector de conductividad térmica (TCD), b) detector de ionización de flama (FID).....	56
Figura 14. Procedimiento de obtención del ADN en reactores batch a partir de las codigestiones.	59
Figura 15. Evolución del pH respecto al tiempo durante la FO a partir de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N a pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.	67

Figura 16. Perfil de remoción de carbohidratos respecto al tiempo durante la FO a partir de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N. pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.....	69
Figura 17. Acumulación de bioH ₂ respecto al tiempo durante la FO para la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N. pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.....	71
Figura 18. Acumulación de ácidos grasos volátiles respecto al tiempo durante la FO para la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N e IG. a) relación C/N = 35 y b) relación C/N = 25	72
Figura 19. Efecto del inóculo de composta e inóculo granular en la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N a través del tiempo. pH inicial 5.5, T=35°C.....	73
Figura 20. Comparativo del rendimiento de bioH ₂ entre el IG e IC durante la codigestión SIL-SIC en las diferentes relaciones C/N a microrreactores batch, pH inicial 5.5, T=35°C	75
Figura 21. Cinética de la ecuación modificada de Gompertz para la codigestión SIL-SIC con relaciones C/N=35 e IG en microrreactor batch. pH inicial 5.5, T=35°C	76
Figura 22. Validación del modelo doble de Gompertz de la codigestión SIL-SIC a diferentes relaciones C/N y la fuente de inóculo. (Símbolos: datos experimentales; Líneas: datos obtenidos de la curva regresión).....	78
Figura 23. Estructura de la comunidad de microbacterias de las codigestiones del sustrato SIL-SIC con la relación C/N = 35 en presencia de inóculo granular en diferentes tiempos (t) (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.....	79
Figura 24. Porcentaje de Abundancia de comunidades de microbacterías en la relación C/N = 25 en presencia de IG en diferentes tiempos (t) (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.....	80
Figura 25. Análisis filogenético de la codigestión SIL-SIC con la relación C/N 35 e IG. .	81
Figura 26. Estructura de la comunidad microbiana en la codigestión SIL-SIC con C/N = 35 utilizando inóculo de composta a diferentes tiempos (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.....	82

Figura 27. Estructura de la comunidad de microbacterias en la relación C/N = 25 en presencia de inóculo granular en diferentes tiempos (t) (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.	83
Figura 28. Análisis filogenético de la codigestión SIL-SIC con la relación C/N 35 e IC... ..	84
Figura 29. Análisis clúster para la agrupación de muestras.	85
Figura 30. Registro de pH y acumulación de biogás de La codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h, pH constante de 5.0 ± 1, temperatura de 35 °C.	86
Figura 31. Cuantificación de gases permanentes en la codigestión SIL-SIC ((C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h, pH constante de 5.0 ± 1, T= 35 °C.	87
Figura 32. Degradación de la materia orgánica de la codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h, (a) Remoción de CH y DQO y (b) Retención de SST y SSV. pH constante de 5.0 ± 1, T= 35 °C.	89
Figura 33. Acumulación de ácidos grasos volátiles durante la codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h. pH constante de 5.0 ± 1, temperatura de 35 °C.	89
Figura 34. Comparación de la evolución del pH de la codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB empleando IG a los TRH's de 3, 9 y 12 h. T=35°C y pH constante de 5.5.	91
Figura 35. Efecto del TRH en la producción de biogás durante codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB empleando IG con TRH de 3, 9 y 12 h. T=35°C y pH constante de 5.5.	92
Figura 36. Efecto de la composición del biogás durante codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB a diferentes TRH's (3, 9 y 12 h). T=35°C y pH constante de 5.5.	93
Figura 37. Efecto de la tasa de producción y rendimiento de bioH ₂ durante la codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB a diferentes TRH's (3, 9 y 12 h). T=35°C y pH constante de 5.5.	94

Figura 38. Degradación de la materia orgánica durante la codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB a diferentes TRH's (3, 9 y 12 h). (a) Remoción de CH y DQO y (b) Retención de SST y SSV y, reactor con TRH = 12 ± 0.4 h (c) Remoción de CH y DQO. 95

ABREVIATURAS

ABR	Reactor con deflectores	NK	Nitrógeno Kjeldahl
AFBR	Reactor anaerobio de lecho fluidizado	NT	Nitrógeno total
AGV's	Ácidos grasos volátiles	OD	Oxígeno disuelto
Ak	Alcalinidad	PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
BAE	Bacterias anaerobias obligadas esporuladas	P_{H2}	Presión parcial de hidrógeno
BAF	Bacterias anaerobias facultativas	pH	Potencial de hidrógeno
BAL	Bacterias ácido lácticas	RIA	Residuos de la industria de alimentos
BANE	Bacterias anaerobias no esporuladas	RHA	Regiones hidrológicas administrativas
CFE	Comisión federal de electricidad	SENER	Secretaría de energía
CG	Cromatografía de gases	SIC	Sustrato industrial de cervecería
CH	Carbohidratos	SIL	Sustrato industrial lactosuero
COT	Carbón orgánico total	SST	Sólidos suspendidos totales
CSTR	Reactor de tanque agitado continuo	SSV	Sólidos suspendidos volátiles
DA	Digestión anaerobia	ST	Sólidos totales
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno	SV	Sólidos volátiles
DQO	Demanda química de oxígeno	TCD	Detector de conductividad térmica
EPA	Agencia de protección ambiental	TRH	Tiempo de retención hidráulica
FAO	Organización de fomento a la agricultura	UASB	Biorreactor anaerobio de flujo ascendente
FID	Detector de ionización de flama	VCO	Velocidad de carga orgánica
FO	Fermentación oscura	ΔG°	Energía libre de Gibss
GEI	Gases de efecto invernadero		
IC	Inóculo de composta		
IG	Inóculo granular		

CAPÍTULO 1

Introducción

Introducción

En la actualidad existe una preocupación por mejorar la relación entre los seres humanos y el medio ambiente. Esto ha aumentado el interés por la investigación e implementación de tecnologías de energía renovable (TER) que aprovechen al máximo los recursos de cada país [1]. En México, las TER como la energía geotérmica (1.8%), la energía eólica (3.2%) y la energía hidráulica (9.7%) han contribuido a la generación de energía eléctrica. En cambio, la energía de biomasa, con una capacidad de generación de energía de 1.3%, solo contribuyó el 0.6%. Por ello, se ha impulsado la investigación tecnológica de la biomasa mediante estrategias de prospectiva nacional. La biomasa es sujeto de interés porque aprovecha los residuos (agroindustriales, industriales y/o domésticos) y garantiza energía económica, eficaz y segura ambientalmente. A partir de la biomasa se obtienen combustibles como el bioetanol, el biodiesel o el biogás. El biohidrógeno (bioH_2), biogás, es considerado un combustible único por su alto potencial energético y no existe huella de carbono en su combustión [2-4].

El bioH_2 puede obtenerse a través de 3 procesos, la biofotólisis del agua, la fotofermentación y la fermentación oscura (FO). La FO es el proceso más simple porque funciona a presión y temperatura cercanas a la atmosférica y no depende de una fuente de iluminación u oxigenación, además es posible utilizar cualquier fuente de carbono como sustrato. El rendimiento del proceso depende del contenido de carbohidratos, la disponibilidad del sustrato y la velocidad de biodegradabilidad [5-6]. Diversos estudios indican que los sustratos fácilmente biodegradables, como la glucosa, la sacarosa o almidón, pueden lograr buenos resultados, aunque pueden presentar deficiencias de nutrientes, baja capacidad amortiguadora y son más costosos. Con la finalidad transitar a las energías renovables, es imperativo el uso de sustratos renovables o fuentes de alimentos y, por lo tanto, hay interés en aprovechar las fuentes de biomasa de segunda generación [2,7-8].

Así mismo, la normativa de las aguas residuales que obliga al cumplimiento de los límites permisibles antes de su disposición de final en los cuerpos receptores las posicionan como fuentes novedosas de investigación para la producción de bioH_2 y aún más atractivo si el origen de los cosustratos es antropogénico [9-11]. La principal ventaja de esta estrategia es que los residuos podrían adquirir un valor energético con respecto a las aguas residuales de la industria alimentaria, en la que un alto contenido de materia orgánica se transformaría en combustible [12-14]. Existen varios reportes sobre la utilización de la FO para producir bioH_2 empleando aguas residuales de los procesos de fabricación de cerveza [7,15-16] y de quesos en biorreactores que utilizan cultivos mixtos mesófilos, en los que se destaca que el crecimiento de las comunidades microbianas depende de las fuentes del inóculo y de las características fisicoquímicas del sustrato [17-19].

Con el propósito de alcanzar un mayor rendimiento se han utilizado cultivos puros de los géneros *Clostridia*, *Enterobacter* y *Streptococcus*, pero su escalamiento industrial no es técnica ni económicamente factible. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), entre ellas los *Bacillus* y *Lactobacillus* que pueden competir por el sustrato y disminuir el rendimiento de bioH_2 . La solución propuesta es el empleo de consorcios microbianos mixtos durante la codigestión y tiene por objeto evitar la

competencia entre las comunidades nativas y microbianas favoreciendo la proliferación de microorganismos productores de bioH₂. Aunque no es claro Gómez Romero *et al.*, [18] reportó la codigestión entre suero de queso y residuos de frutas y un periodo de adaptación del inóculo, una abundancia de *Lactobacillus* del 72 % y bacterias productoras de bioH₂ como *Clostridium* (2.5%) y *Bifidobacterium* (6%) tuvieron menor presencia. Sin embargo, mantener un control del pH y óptima C/N=21 logró rendimientos de 449.84 mL H₂ g DQO⁻¹ causado por el balance de nutrientes y una mejora en la capacidad amortiguadora.

Más recientemente, Szaja *et al.*, [20] informaron sobre la codigestión de residuos de suero de queso ácido y los lodos de una planta de tratamiento que utiliza un biorreactor anaeróbico de semiflujo con diferentes tiempos de retención de líquidos (16.17, 18 y 20 días). En sus conclusiones, los autores informaron de un aumento del 160% en la eficiencia para el tiempo de retención de fluidos de 16,7 días cuando se añadió al alimento el grano gastado en la cervecería (stock para el injerto). En otro estudio, García Depraect *et al.*, [21] reportó la sinergia que existe entre género *Lactobacillus* y el género *Clostridia*, logrando una mejora en la etapa exponencial de la producción de bioH₂. Por otro lado, Wang *et al.*, [22] demostró que el tipo de cosustrato puede afectar directamente la comunidad microbiana y a su vez repercutir en la producción de bioH₂ [18-19,22].

El estudio del sustrato industrial de cervecería (SIC) y el sustrato industrial de lactosuero (SIL) podría ser una propuesta atractiva para las zonas industrializadas como el Área Metropolitana de Monterrey (AMM). México, según el Atlas Nacional de Biomasa (ANBIO), cuenta con la producción anual de casi 20 millones de m³ aguas residuales de cervecería a partir de 18 fuentes generadoras del país. Siendo sus características principales, el contenido de nutrientes, carbohidratos, carga orgánica de 2 a 32 g DQO L⁻¹ y potencial energético de 29,350 TJ año⁻¹. En el caso del suero de queso, se pueden obtener a través de 260 fuentes que se distribuyen en 27 de las 32 entidades del país, con una generación anual de suero de queso de 2.5 millones de m³. En cuanto al potencial energético, el lactosuero, contribuye con alrededor de 1,270 TJ año⁻¹, alta carga orgánica (entre 40 y 100 g DQO.L⁻¹), proteínas, lípidos y sales minerales [23-24].

A partir de lo anterior, es evidente que existe la necesidad de estudiar a detalle la codigestión entre SIL y SIC que, además de ser una mezcla atractiva para el AMM, no existen reportes de su estudio en codigestión. Asimismo, en este trabajo se busca evaluar la evolución de las comunidades microbianas de dos fuentes consorcios microbianos mixtos, el inóculo de composta (IC) y el inóculo granular (IG) para los sustratos individuales (SIL y SIC) y sus respectivas codigestiones con el objetivo de identificar las bacterias productoras de bioH₂ en reactores tipo batch a condiciones mesofílicas y poder homologarlo a un reactor continuo de flujo ascendente.

El presente trabajo de tesis se compone de los siguientes capítulos. El capítulo 1 presenta una breve introducción sobre la importancia de la codigestión a partir de sustratos de origen industrial que permiten justificar el proyecto además de sustentar la hipótesis, el objetivo general y objetivos particulares. Posteriormente en el capítulo 2 se presenta el marco general sobre la capacidad y potencial energético de la biomasa para la generación de energía

renovable mediante el proceso de fermentación oscura, además de describir el fundamento de este proceso se destacan los principales parámetros de operación (pH, Temperatura, inóculo, relación C/N, TRH y P_{H_2}) durante la operación de un reactor de flujo ascendente. En el capítulo 3, se presentan los procedimientos y métodos de caracterización de los inóculos (IC e IG), sustratos SIL-SIC antes y durante la codigestión en el microreactor batch (90 mL) y posterior escalamiento a un reactor de flujo ascendente (2 L) y sus correspondientes análisis de $bioH_2$ y subproductos de la reacción por cromatografía de gases (FID y/o TCD). Por último, el capítulo 4 describe los resultados obtenidos de la codigestión de los sustratos SIL-SIC. i) con el apoyo de un diseño de experimentos se identificaron los parámetros de mayor significancia en la producción de $bioH_2$ a nivel microrreactor, destacando la relación C/N=35 y el IG. ii) para la operación del reactor de flujo ascendente se estudió el tiempo de retención hidráulico para producir $bioH_2$ de forma continua a pH constante en el intervalo de 5.5 a 5.0. Finalmente, el capítulo 5 presenta las conclusiones del proyecto y algunas recomendaciones para el trabajo a futuro.

1.1 Hipótesis

La implementación de una mezcla de efluentes de la industria alimenticia (codigestión) de baja biodegradabilidad aportará condiciones ideales para garantizar la presencia de un consorcio microbiano mixto selectivo a bioH_2 a partir del control de variables de operación en un proceso continuo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la relación C/N de los sustratos de baja biodegradabilidad a partir de aguas residuales industriales haciendo énfasis en el aprovechamiento de azúcares fermentables con la finalidad de diseñar un reactor de flujo ascendente para la producción de bioH_2 .

1.2.2 Objetivos particulares

1. Muestrear y caracterizar fisicoquímicamente (Carbohidratos, Proteínas, Sólidos Totales, Sólidos Volátiles, pH, Demanda Química de Oxígeno, Nitrógeno Kjeldahl) los sustratos de la industria de alimentos (industria cervecera y lactosuero).
2. A partir de un diseño de experimentos de tipo Plackett Burman, preparar reactores batch para identificar las variables del proceso (temperatura, concentración de sustrato, pH e inóculo) que permitan obtener la relación C/N y tiempo más favorable para el crecimiento microbiano y producción selectiva de bioH_2 .
3. Cuantificar los gases permanentes y Ácidos Grasos Volátiles (AGV`s) por cromatografía de gases (FID y TCD).
4. Determinar las propiedades físicas (densidad, viscosidad, velocidad del fluido) de los reactores para homologar su escalamiento a 1L.
5. Implementar un reactor continuo estudiando el tiempo de retención hidráulica (TRH < 24 h) y tipo de empacado (biomedia, platos, etc.) para prolongar la fase acetogénesis e incrementar la conversión de las biomoléculas y la productividad de bioH_2 .
6. Llevar a cabo el estudio cinético de las reacciones.
7. Identificar los consorcios microbianos mixtos (presentes en los biorreactores con mayor productividad).

1.3 Justificación

Parte de las necesidades del ser humano es el suministro de energía, base en el desarrollo económico y social de cada país. Por lo tanto, es importante poseer una estrategia de aprovechamiento y financiación que aumente la capacidad energética a partir de sus recursos disponibles [8]. Con la expedición de la Ley para el aprovechamiento de los recursos renovables y el financiamiento de la transición energética en México, se dio la pauta para la implementación de tecnologías de energías renovables [25]. A partir de allí se fomentó la investigación científica que impulsaba al bioH_2 como el nuevo vector energético y así, el petróleo deje de ser la principal fuente de energía del país [7,26]. El hidrógeno tiene un potencial energético 2.5 mayor que la gasolina y se puede obtener a partir diferentes procesos.

En busca del aprovechamiento de los residuos orgánicos y como parte del desarrollo sustentable se ha propuesto la bioenergía como tecnología capaz de cumplir los objetivos energéticos. Actualmente, México ocupa el lugar 31 en generación de energía eléctrica a nivel mundial a partir de la biomasa [27]. Sin embargo, menos del 50% representa la energía generada del total de la capacidad instalada. En parte, porque el potencial está distribuido en residuos agrícolas (26.7%) y forestales (58.1%) y los residuos industriales solo representan el 9 % [28-29]. Puesto que la explotación de los recursos depende de su localización, el Área Metropolitana Monterrey (AMM) es una zona ampliamente industrial y tiene un potencial de aprovechamiento para este tipo de biomasa residual.

En general, los residuos industriales pertenecen a la industria alimenticia, destacando la generación de aguas residuales en la producción de aceite vegetal y de cerveza. Las aguas residuales de cervecería (SIC) con una producción de casi 20 millones de m^3 presentan alto contenido de materia orgánica, alrededor de 2 a 32 g DQO L^{-1} , con potencial energético de 29,350 TJ año^{-1} . Por otro lado, el suero de queso está presente en 27 entidades del país y el AMM no es la excepción. A pesar representar el 12.5% de SIC, con 2.5 millones de m^3 , es suficiente con su enorme contenido orgánico de 40 a 100 g DQO L^{-1} . Según la Comisión Nacional de Agua (CONAGUA), la DQO es un parámetro clave en la determinación de aguas contaminadas. Por eso la importancia que las aguas residuales cumplan con la normativa vigente y se garantice un mejor manejo de las descargas a los cuerpos receptores [30]. El proceso de FO reúne las características anteriormente citadas porque es una tecnología limpia que utiliza los residuos industriales como materia prima, el producto final, el bioH_2 (nuevo vector energético) y es capaz de remover materia orgánica.

El presente trabajo busca el aprovechamiento de la materia orgánica de las aguas residuales de cervecería y el suero proveniente de la fabricación de queso a partir de la FO. Para esto, se pretende utilizar herramientas como codigestión entre ambos residuos para aumentar el rendimiento y la producción de bioH_2 . En cuanto al aporte científico, actualmente en la literatura no se encuentra reportada dicha codigestión. Además, es importante estudiar nuevas alternativas para el aprovechamiento de los recursos y así lograr una mejor gestión ambiental de los recursos. Esto será posible a través del aprovechamiento de las aguas residuales que no presentan ningún valor en el mercado y generar bioH_2 como combustible reduciendo el potencial contaminante antes de su disposición final.

1.4 Referencias

- [1] Pérez-Denicia E., Fernández-Luqueño F., Vilariño-Ayala D., Montaña-Zetina L. M., Maldonado-López L. A. Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev*; 2017; 78: 597–613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.009>.
- [2] Łukajtis R., Holowacz I., Kucharska K., Glinka M., Rybarczyk P., Przyjazny A., Kamiński M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev*; 2018; 91: 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.
- [3] Castelló E., Nunes-Ferraz-Jr A. D., Andreani C., Anzola-Rojas M. P., Borzacconi L., Buitrón G., Carrillo-Reyes J., Gomes S. D., Maintinguer S. I., Moreno-Andrade I., Palomo-Briones P., Razo-Flores E., Schiappacasse-Dasati M., Tapia-Venegas E., Valdez-Vázquez I., Vesga-Baron A., Zaiat M., Etchebehere C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew. Sust. Energ. Rev*; 2020; 119: 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- [4] López Ortiz A., Meléndez Zaragoza M. J., Collins-Martínez V. Hydrogen production research in Mexico: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2016; 41(48): 23363–23379. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.004>.
- [5] Buitron G., Carvajal C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol*; 2010; 101(23): 9071-9077. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>.
- [6] Yang P., Zhang R., McGarvey J. A., Benemann J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2007; 32(18): 4761-4777. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.038>.
- [7] Estevam A., Arantes M. K., Andrigheto C., Fiorini A., da Silva E. A., Alves H. J. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2018; 43(9): 4276–4283. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.052>.
- [8] Lin C. Y., Leu H. J., Lee K. H. Hydrogen production from beverage wastewater via dark fermentation and room-temperature methane reforming. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2016; 41(46): 21736–21746. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.028>.
- [9] Anburajan P., Park J. H., Sivaguranathan P., Pugazhendhi A., Kumar G., Choi C. S., Kim S. H. Mixed-culture H₂ fermentation performance and the relation between microbial community composition and hydraulic retention times for a fixed bed reactor fed with galactose/glucose mixtures. *J. Biosci. Bioeng*; 2017; 124(3): 339–345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.04.004>.
- [10] Castello E., García C. y Santos, Iglesias T., Paolino G., Wenzel J., Borzacconi L., Etchebehere C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2009; 34: 5674–5682. <https://doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>.
- [11] Lacovidou E., Ohandja D. G., Voulvoulis N. Food waste codigestion with sewage sludge – Realising its potential in the UK. *J. Environ. Manage*; 2012; 112: 267-274. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.029>.
- [12] Nikhil G.N., Sarkar O., Venkata Mohan S. Biohydrogen Production: An Outlook of Fermentative Processes and Integration Strategies. In: Purohit H., Kalia V., Vaidya A.,

- Khardenavis A. editors. Optimization and Applicability of Bioprocesses. Springer, Singapore. 2017; 249-265.
- [13] Show K. Y., Lee D. J., Chang J. S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresour. Technol*; 2011; 102(18): 8524–8533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.055>.
- [14] Khan M. A., Ngo H. H., Guo W., Liu Y., Zhang X., Gou J., Liu Y., Zhang X., Guo J., Chang S. W., Nguyen D. D., Wang J. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. *Renew. Energy*; 2018; 129: 754–768. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>.
- [15] Kumar B. S., Sivaramakrishnan M., Chaitanya N., Srinivas Y., Himabindu V., Narasu M. L. Brewery Effluent as the Promising Substrate Source for Hydrogen Production Using Various Mixed Microbial Consortia. *Int. J. Sci. Res*; 2014; 3(11): 3052-3058.
- [16] Sinbuathong N., Somjit C., Leungprasert S. Feasibility study for biohydrogen production from raw brewery wastewater. *Int. J. Energy Res*; 2015; 39: 1769-1777. <https://doi.org/10.1002/er.3321>.
- [17] De Gioannis G., Friargou M., Massi E., Muntoni A., Poletti A., Pomi R., Spiga D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(36): 20930–20941. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>.
- [18] Gomez-Romero J., Gonzalez-Garcia A., Chairez I., Torres L., García-Peña E. I. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(24): 12541–12550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>.
- [19] Lateef S. A., Beneragama N., Yamashiro T., Iwasaki M., Ying C., Umetsu K. Biohydrogen production from codigestion of cow manure and waste milk under thermophilic temperature. *Bioresour. Technol*; 2012; 110: 251-257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.102>.
- [20] Szaja A., Montusiewicz A. Enhancing the codigestion efficiency of sewage sludge and cheese whey using brewery spent grain as an additional substrate. *Bioresour. Technol*; 2019; 291: 121863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121863>.
- [21] García-Depraect O., Gómez-Romero J., León-Becerril E., López-López A. A novel biohydrogen production process: Codigestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2017; 42(9): 5820-5831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.204>.
- [22] Wang W., Xie L., Luo G., Zhou Q. Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by codigestion: The effects of different co-substrates. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2013; 38(17): 6980–6988. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.04.004>.
- [23] Secretaria de Energía. Atlas Nacional de Biomasa. <https://dgel.energia.gob.mx/anbio/mapa.html?lang=es>.
- [24] Valta K., Damala P., Angeli E., Antonopoulou G., Malamis D., Haralambous K. J. Current Treatment Technologies of Cheese Whey and Wastewater by Greek Cheese Manufacturing Units and Potential Valorisation Opportunities. *Waste Biomass Valor*; 2017; 8: 1649-1663. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9862-8>.
- [25] "Estrategia de transición para promover el uso de tecnologías y combustibles más limpios" Ley de Transición Energética. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, a 18 de noviembre de 2016.

- [26] Arantes M. K., Sequinel R., Alves H. J., Machado B., Fiorini A., da Silva E. A. Improvement of biohydrogen production from brewery wastewater: Evaluation of inocula, support and reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2020; 45(8): 5216-5226. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.208>.
- [27] IRENA. (2018). Transformación global: una hoja de ruta hacia 2050. International Renewable Energy Agency.
- [28] Prospectiva del sector eléctrico, 2018-2032, SENER, Ciudad de México, 2018.
- [29] Prospectiva de energías renovables, 2018-2032, SENER, Ciudad de México, 2018.
- [30] CONAGUA. 2016. Estadísticas del agua en México.

CAPÍTULO 2

Antecedentes y Marco Teórico

Antecedentes y Marco Teórico

2.1 Transición energética y la implementación de energías limpias

Afortunadamente en México, en años recientes el consumo de petróleo ha disminuido [1]. En su lugar se ha incrementado el uso de gas natural de 23,000 a 64,000 ktep y las energías limpias como la energía solar y la energía eólica se han mantenido en 4,000 ktep, tal como se observa en la Figura 1 [2]. La búsqueda de un combustible limpio y fácil de obtener ha provocado el interés de tecnologías como la biomasa. El bioH₂, puede generarse a partir de tecnologías como la biomasa y, además es muy atractivo por su alto valor calórico mayor que los combustibles fósiles. Además, la bibliografía científica sugiere que el uso de bioH₂ es parte de la solución energética en varios países, que han optado hacia la economía del bioH₂ [3]. La implementación de pilas combustibles se utiliza en la generación de electricidad en uso doméstico, industrial y de transporte es un ejemplo claro de la transición del petróleo hacia el bioH₂ [4]. Sin embargo, lo anterior no es suficiente para resaltar la eficiencia de este tipo de productos. En consecuencia, se debe enfrentar el gran desafío de generar suficiente cantidad de bioH₂ a partir de recursos renovables y emplear procesos amigables con el medio ambiente [5].

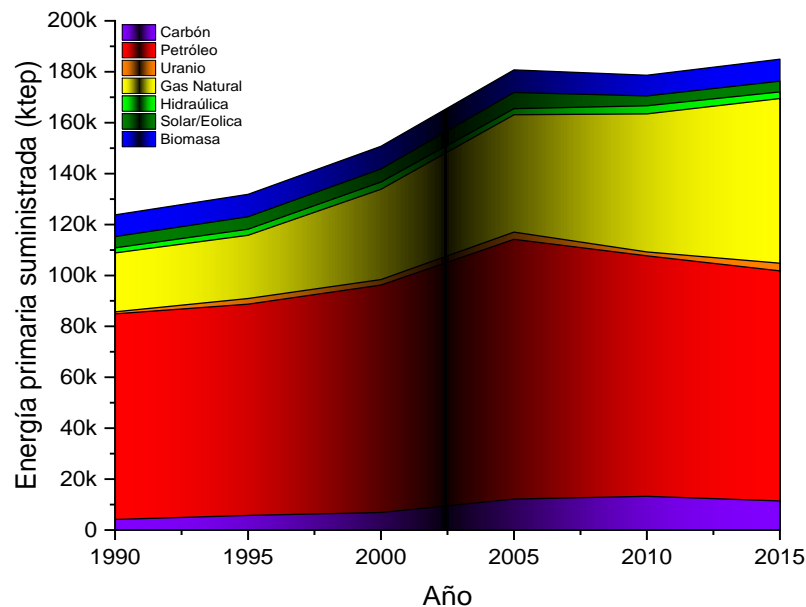


Figura 1. Evolución del suministro de energía en México de 1990 a 2015. Datos obtenidos de [2].

Los procesos biológicos cumplen dichas características, pues son diseñados a temperaturas y presión atmosférica naturales [6]. Los grupos de investigación más avanzados proponen la generación de bioH₂ a partir de residuos de las actividades económicas como: residuos sólidos, agua residual, residuos agrícolas, etc. Particularmente el bioH₂, a partir de su desarrollo y producción, se ubica como un elemento clave para el suministro de energía sostenible global [7]. Además, se presenta como una alternativa prometedora, frente a los

combustibles fósiles. La principal ventaja de esta tecnología es el potencial que contrarresta parte de los problemas y desafíos de los combustibles fósiles [8]. Sin embargo, es necesario estudiar a detalle la biomasa como fuente de energía alterna.

2.1.1 La biomasa como fuente alterna de energía

En teoría, cualquier fuente de carbono rica en carbohidratos, lípidos o grasas son ideales para la generación de energía y producción de biocombustibles. En México, la energía primaria a partir de la biomasa es obtenida por la combustión directa de la quema de bagazo [6]. A nivel nacional se genera alrededor de 1,252 GW.h al año por combustión directa como se observa en la Figura 2. El proceso de combustión directa consiste en la incineración de la biomasa (bagazo) obteniendo temperaturas de 800 a 1100 °C. Este calor es aprovechado en una caldera que produce vapor, el vapor suministra energía a una turbina de vapor que está conectada a un generador eléctrico que convierte la energía mecánica a energía eléctrica [4]. Además, este proceso con alrededor de 20 % de eficiencia también implica un costo ambiental por la generación de cenizas que son desprendidas a la atmósfera junto con el dióxido de carbono (CO₂) por la combustión del bagazo [9, 10]. A pesar de esto, en algunos estados como Jalisco, San Luis Potosí y Veracruz la combustión directa es la principal fuente de energía en los ingenios azucareros [11].

Por otro lado, Nuevo León ha asumido el liderazgo con la mayor generación de electricidad a partir del biogás, con 102 MWh año⁻¹ [11]. El biogás generalmente se obtiene por la degradación de la materia orgánica en contenedores cerrados conocidos como biodigestores [3]. En los biodigestores ocurren procesos de óxido-reducción por la actividad microbiana donde la materia orgánica es oxidada liberando una mezcla de gases entre ellos el metano, el CO₂, bioH₂ entre otros [12]. En el caso de Nuevo León, la producción de biogás se obtiene de los rellenos sanitarios donde la materia orgánica y en general, los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) son sometidos a un proceso de descomposición en porciones de suelo conocidos como celdas. El biogás generado es suministrado a un generador eléctrico para producir electricidad. Desafortunadamente los rellenos sanitarios han sido fuertemente criticados por los problemas ambientales que pueden ocasionar. Por ejemplo, la infiltración de los lixiviados a aguas subterráneas, malos olores, la nula cultura del reciclaje por parte de la sociedad e inclusive el uso extensivo de suelo [13].

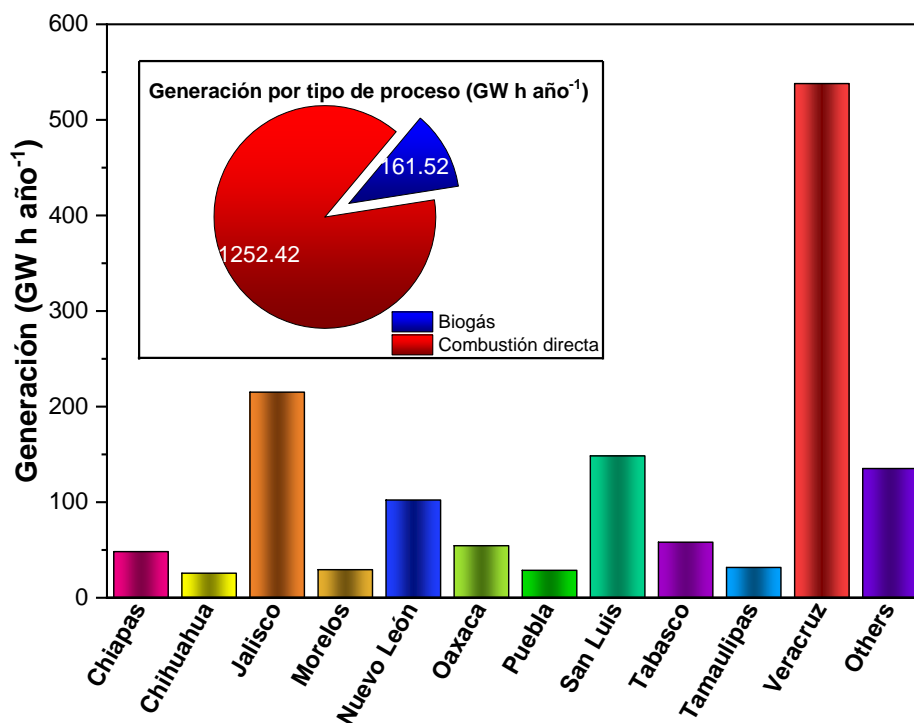


Figura 2. Generación de energía a partir de la biomasa, a) generación porcentual por estado, b) generación por tipo de proceso. Datos obtenidos de [4].

A pesar de los beneficios que proporciona el uso de la biomasa como fuente alterna de energía, está claro que es necesario implementar tecnología eficaz, sostenible y que implique ahorro de energía [13]. Algunas tecnologías en desarrollo al respecto son la generación de biocombustible como el biodiesel, el bioetanol y el biogás [14]. El biogás es producto de un proceso natural en ausencia de oxígeno conocido como digestión anaerobia (DA). La DA abarca una serie de procesos bioquímicos, fisicoquímicos y microbiológicos que se encargan de reducir la materia orgánica biodegradable, producir energía y algunos subproductos como biofertilizantes [14]. Por ello, la utilización de biogás como combustible es la opción más sostenible y amigable con el medio ambiente que otros biocombustibles.

Además, es indispensable cumplir los acuerdos internacionales en materia ambiental. Entre ellos, el protocolo de Kioto que extendió su vigencia en la conferencia de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) celebrada en México en 2010. Asimismo, es necesario cumplir con el acuerdo de París, firmado por 195 estados miembros de la ONU, con el objetivo de lograr un desarrollo bajo en emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y un modo de desarrollo resiliente del clima [15]. Por lo tanto, es importante que la investigación de continúe en una línea de desarrollo sostenible. Esto permitirá que México asuma su papel en favor de la protección ambiental con la implementación de energías limpias. También, es necesario que México se mantenga como un país competitivo. Ejemplo de lo anterior, nuestro país cuenta con las políticas públicas necesarias para un crecimiento energético que fueron impulsadas por el sexenio pasado. El decreto sobre la transición energética hacia el bioH₂,

ha generado un nuevo paradigma de sustentabilidad energética. Afortunadamente, a partir de la DA es posible la producción de bioH₂, sin embargo, para que este proceso sea selectivo a bioH₂ debe cumplir con ciertas condiciones las cuales se verán a detalle en la Sección 2.5, así como las políticas vigentes en nuestro país que posicionan al bioH₂ como nuevo vector energético.

2.1.2 Producción de biogás a partir de residuos orgánicos

La energía es la base del desarrollo económico y social del mundo. El suministro de este recurso debe ser continuo en todas sus formas y es deseable que cada nación tenga un plan de desarrollo para obtener la energía en función de sus georecursos [16]. Nuestro país no es la excepción ya que las reformas estructurales aprobadas en el sexenio pasado se ha dado la apertura a la generación de energía y el impulso al interés científico para desarrollar tecnología que generen y utilicen el bioH₂ como portador de energía alterna y de esta manera disminuya la dependencia del petróleo [4, 17]. Aunado a lo anterior, la versatilidad en el uso de bioH₂ y su alto valor energético hacen suponer que dicho elemento tiene el potencial para ser explotado como un combustible limpio en nuevos procesos y en el desarrollo tecnológico.

Algunos estudios aseguran que el desarrollo de la tecnología del bioH₂ es una solución energética viable en varios países alrededor del mundo. Actualmente algunas tecnologías ya han logrado comercializarse, como la aplicación de pilas de combustibles para la generación de energía eléctrica de uso doméstico y en el transporte [4]. Sin embargo, lo anterior no es suficiente si consideramos la eficiencia de este tipo de productos. En consecuencia, aun es necesario seguir explorando alternativas para enfrentar el gran desafío de la generación masiva de bioH₂ a partir de recursos renovables empleando procesos amigables con el medio ambiente [3]. Donde los procesos biológicos, en particular la FO, cumple con las características necesarias, pues es un proceso que funciona a temperaturas y presión atmosférica naturales, no generan residuos contaminantes y son renovables [5,17].

El bioH₂ se puede obtener a partir de tres procesos biológicos, la FO, la fotofermentación y la biofotólisis del agua [18]. En cada proceso, un selecto grupo de microorganismos intervienen y juegan un papel importante para la transformación de la materia orgánica. Específicamente, el caso de la FO, es la ruta que se vislumbra como la más favorable, debido a la sinergia de los microorganismos y a la manipulación de parámetros. Los parámetros como el sustrato, el pH y/o configuración del reactor pueden controlar la velocidad de reacción y producir mayor biogás en el menor tiempo. Además, la conversión anaerobia tiene otras ventajas, como: procesar diferentes residuos orgánicos e hidratos de carbono provenientes de efluentes líquidos. Los efluentes líquidos pueden ser generados por la industria de los alimentos, papel, bebidas, etc., lo que hace suponer que su abundancia y muy bajo costo lo hacen más atractivo. En relación en lo anterior, se ve favorecido el coste sustentable del vector energético y elimina el problema de contaminación y, además, genera energía limpia que puede cumplir con los decretos para el aprovechamiento de los recursos renovables y transición energética de México.

2.2 Potencial energético del bioH₂ a partir de la biomasa disponible en México

La biomasa orgánica biodegradable y rica en carbohidratos, proteínas y grasas son la cuarta fuente de energía más abundante en el planeta y representa más del 12% del abastecimiento de energía [19]. El sustrato, nombre dado a la biomasa orgánica suele jugar un papel importante en la tasa y rendimiento en la producción de bioH₂ y costes del proceso en función de sus características [20]. Por lo general cualquier fuente de materia orgánica es ideal para los procesos biológicos. De hecho, la DA, proceso natural de la FO, se puede clasificar en tres tipos de procesos, el bajo (menor al 15%), el medio (15-20%) y el alto (20-40%) en contenido en sólidos [14]. La categorización de la biomasa por contenido en sólidos es sumamente útil cuando se desea elegir la mejor opción de sustrato. Por ejemplo, el proceso con alto contenido en sólidos se puede obtener de los bosques nativos y los residuos agrícolas que representan el 85 % de toda la biomasa disponible en México [21].

Tal como se observa en la Figura 3, existe una amplia disponibilidad de los residuos con alto contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. Sin embargo, esta clase de biomasa está limitada por su compleja estructura. Estos materiales lignocelulósicos presentan una estructura extremadamente compleja que disminuye la biodegradabilidad del sustrato. Además, la celulosa como sacárido es difícil de degradar, esto aumenta la necesidad de utilizar procesos físicos y químicos para obtener sustratos de baja biodegradabilidad. No obstante, los tratamientos suelen aumentar el costo del proceso por lo que es necesario realizar evaluaciones de costo beneficio.

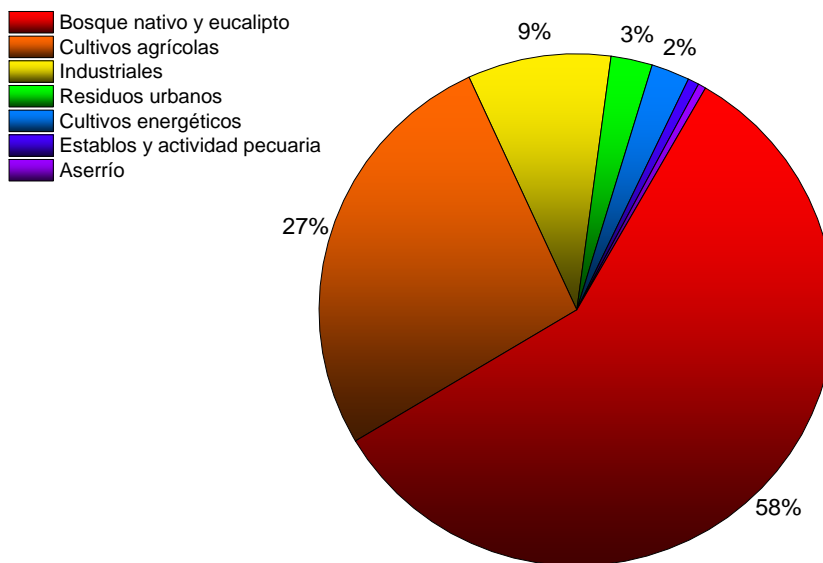


Figura 3. Potencial energético total de la biomasa en México. Datos obtenidos de [21].

Para ello se han clasificado la materia prima en relación al tipo de biocombustible capaz de generarse. Es así como, los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de los productos alimenticios, los de segunda generación se producen con materia lignocelulosa, residuos municipales e industriales. Entonces, a partir de la prometedora aplicación de la FO para la producción de biocombustibles, diversos grupos de investigadores han despertado el interés por el estudio de todo tipo de residuos. Afortunadamente, el 9% del potencial energético del país se puede obtener de los residuos industriales (Figura 3) y son fuentes de carbono con materia orgánica altamente biodegradable. Asimismo, los residuos industriales cumplen con los criterios básicos de selección del sustrato. Por ejemplo, los residuos industriales se encuentran disponibles cerca del área de consumo energético, al ser biomasa residual no representa ningún costo su utilización, el contenido de carbono es alto y fácilmente biodegradable. A partir de lo anterior, a continuación, se presentan algunos ejemplos de las fuentes de carbono más utilizadas, así mismo se propone una clasificación por el tipo y origen del residuo.

2.2.1 Residuos agrícolas

Los residuos agrícolas son materias primas de origen vegetal cuya estructura está compuesta por material lignocelulósicos y el almidón. Algunos ejemplos de este tipo de residuos son del trigo, cáscaras de frutas, rastrojo de maíz, bagazo de caña, hojas, entre otros. Aunque estos residuos se caracterizan por la baja biodegradabilidad debido al contenido de lignina que no puede ser degradada a partir de procesos anaerobios [22]. El contenido de lignina, por ende, dependerá del tipo de sustrato empleado, como los residuos de cultivos (paja, cáscara, tallo, bagazo), los desechos de madera y las plantas acuáticas.

La clasificación anterior se realiza de acuerdo a la composición química de los cultivos, como almidón y azúcar (caña de azúcar, maíz y trigo) y cultivos lignocelulósicos (pasto forrajero y álamo). En México, este tipo de biomasa representa el 26.7 % del potencial total y pueden proporcionar una seguridad energética para la producción de bioH₂ [19]. A pesar de ello, el uso de los residuos agrícolas ha generado inconformidades puesto que el uso de este tipo de biomasa para generar un vector energético puede comprometer los precios de los alimentos y con ello la seguridad alimentaria mundial [23]. Además, como se mencionó anteriormente, el material lignocelulósico se divide en tres polímeros, sin embargo, a mayor cantidad de lignina menor será la biodegradabilidad del sustrato.

2.2.2 Residuos domésticos municipales

Los residuos domésticos municipales consisten en una mezcla de desechos de alimentos con un alto contenido de materia orgánica, parte de ello son carbohidratos de alta biodegradabilidad con humedades superiores al 80%, por lo que cuenta con el potencial para ser implementado como sustrato [24]. Estos residuos pueden contener componentes ricos en polisacáridos, como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, así como proteínas, lípidos y carbohidratos simples. Tales residuos son una de las fuentes que liberan metano a la atmósfera. También contamina las aguas subterráneas con aguas residuales formadas durante la descomposición de la materia orgánica en los vertederos [25, 26]. La necesidad de limitar el efecto negativo de tal residuo estimula a los científicos y a la industria a investigar su posible aplicación como materia prima en la FO. A partir de la deficiente gestión ambiental

de los residuos porque son principales fuentes de emisión de metano o la producción de lixiviados en los rellenos sanitarios pueden ser una alternativa para la disposición final de los residuos domésticos.

Desafortunadamente, debido a las complejidades que representa trabajar con este tipo de residuos, estudios han propuesto el uso de tratamientos previos a los residuos, tales como la acidificación, hidrólisis térmica, pretratamiento alcalino o molienda con la finalidad de potenciar sus características para la fermentación [20].

2.2.3 Residuos industriales como sustrato renovable para la producción de bioH₂

La industria de los alimentos es el sector industrial con mayor potencial para la producción de bioH₂. Los residuos de la industria de alimentos (RIA) cuentan con las características necesarias para la implementación en la FO tales como; disponibilidad, abundancia, costo y alto contenido materia orgánica biodegradable. Por lo tanto, se ha investigado el uso de las RIA y se han logrado obtener rendimientos altos sin la necesidad de hacer cambios físicos o químicos a los residuos. Entre los residuos más utilizados se encuentran la melaza, las vinazas [27], las aguas residuales y pulpa de la molienda de aceitunas [28], aguas residuales de cervecería [29], suero de queso [30], entre otras y, donde se ha probado los beneficios de utilizar los residuos como fuente generadora de energía.

Sin embargo, no toda la materia orgánica disponible puede ser totalmente aprovechable, algunas RIA pueden tener una composición química compleja. Es decir, cada una presenta diferentes características fisicoquímicas y concentraciones variables disminuyendo la reproducibilidad del proceso. En otros casos, los residuos de la industria alimenticia, pueden inhibir la FO debido a que presentan cargas orgánicas superiores a los 40 g DQO L⁻¹ por lo que algunos estudios han propuesto la dilución de las aguas residuales. Entre los residuos que presentan alto contenido orgánico podemos mencionar los residuos de conserva de atún, vegetales y frutas en esta misma clasificación se encuentran los residuos lácteos y aguas residuales de mataderos. Además, existen los residuos con baja biodegradabilidad como las aguas residuales de la industria papelera y el bagazo de caña, pero con un alto potencial energético como se puede observar en la Figura 4.

Además de la carga orgánica, existen otros parámetros que pueden afectar el proceso, aunque de esto se ahondará en la sección 2.4. Por ejemplo, en el caso del suero de queso, Dávila-Vázquez *et al.*, [31] sugieren que un pH entre 6 y 7 es óptimo para obtener el mayor rendimiento y tasa de producción de bioH₂, respectivamente, mientras que Yang *et al.*, [32] sugieren que un pH en el rango 4-5. Ren *et al.*, [33] demostraron que la melaza de desecho es un excelente sustrato en un sistema a escala piloto operado a 35 °C. De acuerdo a lo anterior se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto a la tasa de producción de bioH₂ (232 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹) y el rendimiento (26 mol H₂ kg DQO⁻¹ eliminada). La producción de grandes cantidades de este tipo de biomasa residual permite su utilización en sistemas como la FO para la producción continua de bioH₂. En el estado de Nuevo León se ha evaluado la factibilidad de producción de bioH₂ a partir de los residuos de papel, sin embargo, se trata de un sustrato con baja biodegradabilidad y requiere un estudio a fondo que garantice su factibilidad [33]. Análogamente, el suero comprende principalmente carbohidratos (lactosa),

proteínas y lípidos, es un sustrato de gran potencial para la producción de bioH₂ [20]. En lo que se refiere a la zona Metropolitana de Monterrey, existen varias empresas en el giro de alimentos, de papel, PTAR con un potencial para valorizar sus residuos sólidos o aguas residuales por medio de la extracción de energía y simultaneo tratamiento del agua.

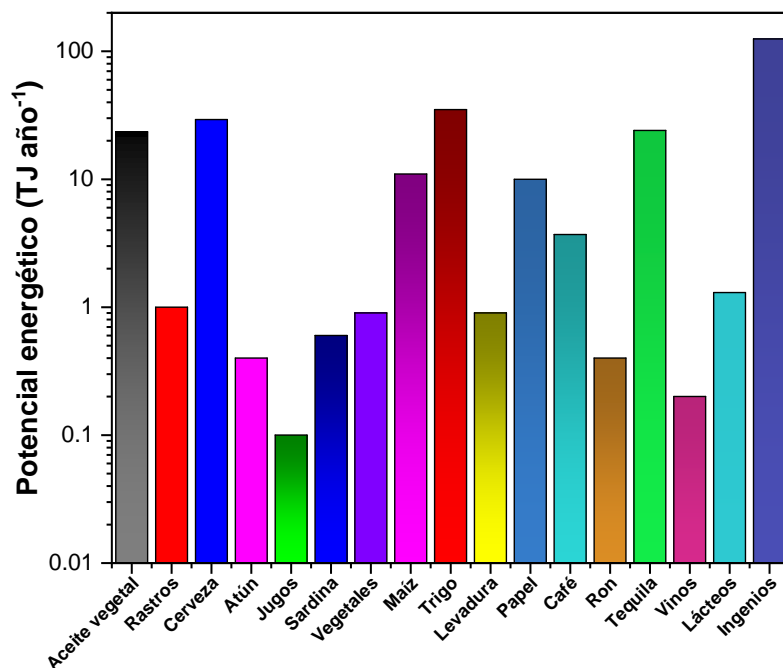


Figura 4. Potencial energético total por tipo de biomasa industrial. Datos obtenidos de [21].

2.3 La fermentación oscura y las rutas metabólicas

La FO es un proceso único que genera productos de alto valor como el bioH₂ y ácidos grasos volátiles, resultado de la sinergia entre los microorganismos y la manipulación de parámetros, para maximizar las tasas de producción aumentar el porcentaje de remoción de la materia orgánica en configuración batch [3, 27]. Aunque, algunas condiciones del proceso se encuentran actualmente preestablecidas como el tipo de sustrato, la relación C/N (rango de 20 a 40), el pH (4 a 7), temperaturas mesofílicas y termofílicas, TRH menores a 24 h y/o la configuración del reactor (flujo ascendente) entre otros, influyen de forma positiva o negativa en la estabilidad del mismo [20]. Lo anterior se ha convertido en uno de los mayores retos a vencer por parte de la comunidad científica, pero que continúa siendo atractivo por el coste sustentable del vector energético y la cualidad de disminuir el problema de contaminación al generar energía limpia. A continuación se describen los principales componentes que describen el proceso.

2.3.1 Microorganismos involucrados en la producción de bioH₂

En ocasiones resulta conveniente imaginarse el proceso de FO como una caja negra donde hay un ingreso de sustrato y salida de biomasa y productos. Sin embargo, esta analogía se hace para simplificar el cálculo estequiométrico de las reacciones bioquímicas que ocurren en el interior de la célula. Pero, cuando es necesario hacer un análisis de lo que ocurre en esa caja negra para maximizar o controlar las salidas, la identificación microbiológica es una estrategia adecuada para comprender mejor el proceso. Como sabemos, en la FO las bacterias más activas son las anaerobias que se clasifican según su sensibilidad hacia el oxígeno y rango de temperatura en las que son más activas [22]. Generalmente la literatura reporta una amplia lista de microorganismos productores de bioH₂, por lo tanto, el sustrato disponible puede ser convertido a numerosos metabolitos.

La producción de los metabolitos dependerá del tipo de bacteria, para esto, se ha clasificado las bacterias productoras de bioH₂ en tres grupos; las bacterias anaerobias obligadas esporuladas (BAE), las bacterias anaerobias no esporuladas (BANE) y las bacterias anaerobias facultativas (BAF). Entre las BANE se encuentra el género *Acetanaerobacterium elongatum* y el género *Megasphaera* y es el grupo con menor rendimiento de bioH₂, pero capaces de consumir algunos metabolitos producto de la fermentación. Las BAE, al contrario, es el grupo que ha reportado los mejores rendimientos, sobre todo porque aquí se concentra todo el género *Clostridium*. Por último, las BAF pueden colaborar sinérgicamente con el género *Clostridium*. En parte porque este grupo se encarga de consumir el O₂ del medio, algunas especies pueden ser el género *Enterobacter*, *Enterococcus* y *Citrobacter*. De allí que, existe un fuerte interés en el uso de consorcios microbianos mixtos que garanticen la estabilidad del proceso como resultado de una redundancia funcional.

Desafortunadamente, no todas las especies contribuyen a la producción de bioH₂, algunos microorganismos como *Bacillus sp.* y *Lactobacillus sp.* utilizan el bioH₂ y desvían la ruta metabólica hacia la acumulación de lactato provocando un menor rendimiento de bioH₂ [20]. También, es posible que se den las condiciones ideales para el crecimiento de bacterias metanogénicas, quienes son capaces de recombinar el bioH₂ y CO₂ y generar CH₄. Asimismo,

la especie *Propionibacterium*, por medio de la fermentación propiónica, utiliza el bioH_2 para generar ácido butírico. En general las bacterias metanogénicas u homoacetogénicas (productores de acetato), las BAL y las bacterias del ácido propiónico pueden coexistir con las bacterias productoras de bioH_2 [34].

Así como existen microorganismos que compiten por el bioH_2 producido, existen microorganismos que compiten por el sustrato con las bacterias productoras de bioH_2 . Algunos microorganismos utilizan el sustrato para generar productos diferentes al bioH_2 , tal es el caso de la fermentación alcohólica que transforma el sustrato a etanol o la fermentación propiónica que su principal producto es el ácido propiónico. Entre los tipos de fermentaciones, la fermentación ácido láctica es la que se presenta con mayor frecuencia porque las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico de diferentes fuentes de carbono y, son capaces de crecer a rangos de pH de 3.5 a 10 y de 4 a 45 °C. Además, la capacidad de competencia por el sustrato de las BAL se debe a la segregación de bacteriocinas, péptidos, capaces de inhibir la actividad microbiana de otras bacterias entre ellas las productoras de bioH_2 [35].

Con la finalidad de crear consorcios microbianos más versátiles y con mayores rendimientos se ha optado por la implementación del pretratamiento del inóculo o la bioaumentación de cultivos el cual se hablará en la Sección 2.5.1. Otros estudios han demostrado que la configuración del reactor puede influir en la estructura microbiana del medio fermentativo. Inclusive el control de las variables también representa cambios significativos en la estructura microbiana. Sin embargo, a pesar de algunas estrategias para mejorar el rendimiento del proceso de FO continúa siendo un desafío sin resolver [36].

2.3.2 Termodinámica de las rutas de reacción

La FO es un proceso independiente de la luz respaldado por su bajo consumo energético y además funciona a condiciones de temperatura y presión ambiental normal. En proceso se lleva a cabo en reactores donde es posible la conversión de las aguas residuales ricas en sustancias orgánicas, como los carbohidratos, las proteínas y los lípidos. A partir de una serie de reacciones en cadena estas macromoléculas son convertidas a bioH_2 , AGV's y otros subproductos [23]. La molécula más utilizada para ejemplificar las reacciones es la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) que, dependiendo del tipo de sustrato, las bacterias involucradas y las condiciones de operación como el pH o el TRH se obtendrán un máximo de 4 mol H_2 mol $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6^{-1}$ por la ruta del acetato o 2 mol H_2 mol $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6^{-1}$ por la ruta del butirato [29, 37].

Las reacciones que presentan mayor rendimiento en la producción de bioH_2 son el acetato con un $\Delta G^\circ = -206.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y el butirato una $\Delta G^\circ = -254.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, ambas con ΔG° negativa, indicando que son termodinámicamente factibles y su presencia en el caldo fermentado [35]. Sin embargo, es equivocado pensar que en la FO solo se presentan estas dos rutas de reacción, al contrario, existen otros metabolitos que se pueden generar y que dependen de otros factores que se examinarán posteriormente. Entre los metabolitos no deseados está el ácido propiónico ($\Delta G^\circ = -279.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) con menores rendimientos o el etanol ($\Delta G^\circ = -164.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) y ácido láctico ($\Delta G^\circ = -225.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) que utilizan el bioH_2 , tal como se representa en la Figura 5. Es probable que el caldo fermentando contenga una

mezcla de los metabolitos anteriores, sobre todo cuando el medio de reacción contiene bacterias con amplio tipo de metabolismo o cuando se utilizan consorcios microbianos mixtos [13]. Por tal motivo, es necesario evaluar las condiciones de operación óptimas que garanticen el mayor rendimiento de bioH₂. Es indispensable, cuando se emplean consorcios microbianos mixtos, el uso de herramientas como el fuente y pretratamiento de inóculo, fuente de sustrato y TRH.

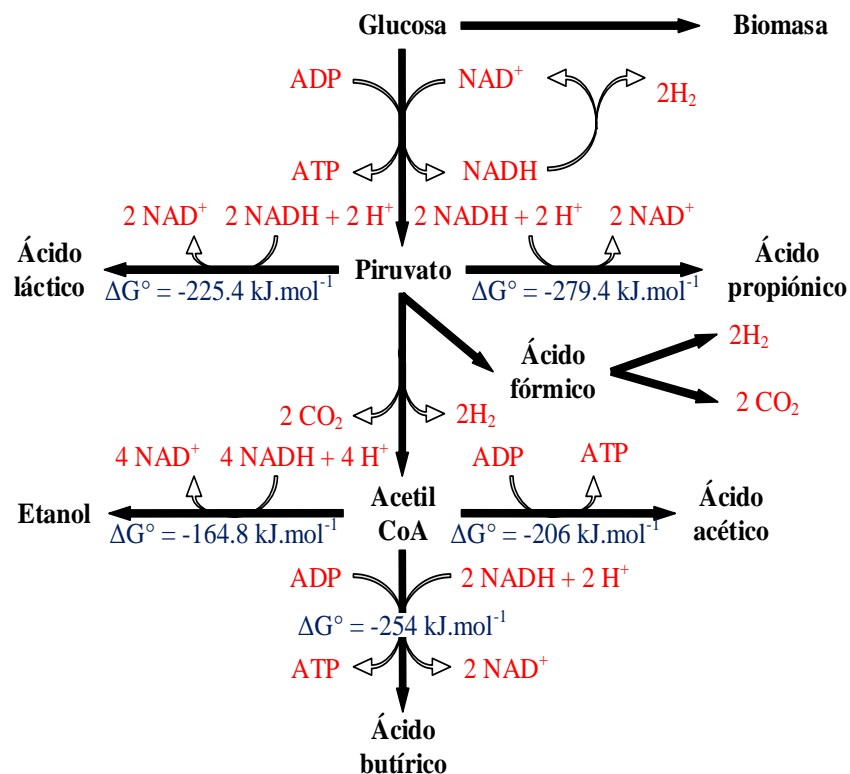


Figura 5. Ruta metabólica de biorreacción en la fermentación por consorcios microbianos mixtos. Adaptado de [38].

2.3.3 Correlación entre los microorganismos y los productos intermediarios.

La FO es considerado como la pausa de la etapa acidogénica en la DA. En esta etapa se presenta una mayor acumulación de metabolitos comúnmente conocidos como AGVs y con ello una disminución brusca del pH. El pH inicial puede afectar la duración de la fase de retardo involucrada en la germinación de esporas y la síntesis de enzimas. La carga orgánica operativa del biorreactor puede afectar a varios aspectos funcionales, entre los que se incluye la acumulación de AGV's no asociados y las variaciones del pH. Esto modifica posteriormente la diversidad de la flora microbiana con las consiguientes modificaciones de las vías metabólicas aliadas [39].

Los azúcares orgánicos son metabolizados por medio de la glucólisis a piruvato, el cual es un precursor clave para la posterior fermentación microbiana. En consecuencia, el piruvato puede dar lugar a una variedad de ácidos grasos orgánicos de cadena corta, y también se produce bioH₂ durante el metabolismo [39]. En el proceso participan innumerables tipos de

bacterias como, por ejemplo, las bacterias homoacetogénicas llamadas así por su analogía con las bacterias homolácticas. Debido a esta capacidad, los homoacetogenos pueden producir hasta 3 mol de acetato a partir de 1 mol de glucosa consumida: dos a partir de un metabolismo heterótrofo y uno a partir de un metabolismo autótrofo $\Delta G^\circ = -104 \text{ KJ mol}^{-1}$ [35]. Así como las bacterias homoacetogénicas es posible identificar otros grupos de bacterias que participan positiva o negativamente en la FO por lo que es indispensable su identificación.

2.4 Sistemas de reacción y diseño de reactores

Es importante examinar algunos de los factores importantes que gobiernan el proceso de FO. Es conocido que los parámetros operativos como pH, temperatura y TRH influyen en el rendimiento de la producción de bioH₂ y productos intermediarios como los AGV's y producción de amoníaco [8, 30, 31]. Aunque el pH también es una variable que influye sobre la hidrólisis del sustrato, las rutas metabólicas productoras de bioH₂ y la actividad de la enzima hidrogenasa [40]. Además, un valor menor a pH 4, puede afectar la fisiología celular externa y disminuir la conversión de energía por el bajo rendimiento en la actividad microbiana [41, 42].

La DA de los carbohidratos complejos por medio de la mezcla de microbiota anaeróbica puede dar lugar a una amplia gama de intermediarios y subproductos en función de los parámetros operativos, como el tipo de sustrato, la tasa de carga del sustrato, el pH, la temperatura y otras condiciones operativas y ambientales, ya que también influyen en la estructura de la comunidad microbiana en los biorreactores [20].

2.4.1 Tipos de reactores y tiempo de retención hidráulica

Existe una amplia variedad de trabajos dedicados a procesar materiales lignocelulósicos de origen agrícola y residuos sólidos municipales [43]. Para el caso de las configuraciones de los biorreactores, en la literatura se mencionan diferentes tipos de biorreactor para codigestión aunado a una amplia variedad de sustratos e inóculos [44, 45]. Entre las geometrías más utilizadas para mejorar la producción de bioH₂ destacan principalmente las configuraciones reactor completamente agitado (CSTR en inglés), reactor anaerobio de lecho fluidizado (AFBR en inglés), reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB en inglés), reactor con deflectores (ABR en inglés) y reactor de biomembranas (MBR en inglés) como se observa en la Figura 6.

Al día de hoy, la velocidad de producción de bioH₂ se ha reportado con un sustrato modelo empleando un reactor CSTR [45] y en un FBR [46] obteniendo valores de 15 L H₂ L⁻¹ h⁻¹ y 10.5 L H₂ L⁻¹ h⁻¹ respectivamente. Sin embargo, para la primera configuración ya está ampliamente reportado que se tiene el riesgo inhibir la producción de bioH₂ si el reactor opera con bajos TRH [45]. En cambio, con el reactor MBR, es posible fijar la biomasa sobre la superficie donde los microorganismos están soportados, ocasionando la formación de biopelículas. Gracias al desarrollo de este fenómeno dentro del reactor, se tiene la ventaja que alrededor de las biopelículas se forme una fase de gas como consecuencia de la actividad microbiana, promoviendo la liberación fácil de bioH₂. Desafortunadamente, que debería evitar la inhibición del proceso de producción de bioH₂ por alta presión parcial de H₂ (P_{H2}) [45-47].

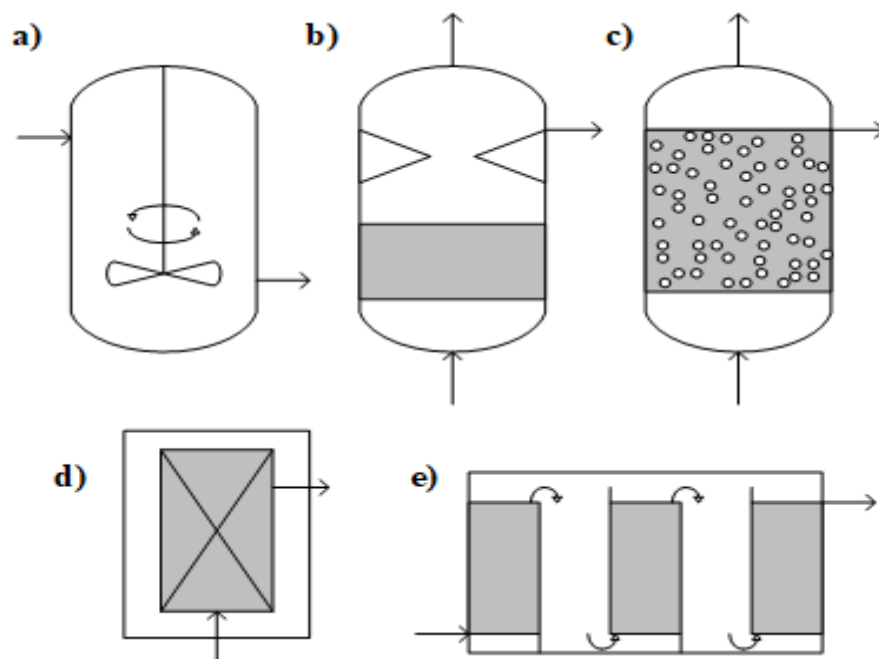


Figura 6. Tipos de configuración de reactores para la fermentación oscura. a) Reactor de mezcla completa (CSTR), b) Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB), c) reactor anaerobio de lecho fluidizado (AFBR), d) Reactor de biomembranas (MBR), e) Reactor con deflectores (ABR). [48].

El rendimiento en la producción de bioH_2 también depende de las óptimas condiciones del TRH y velocidad de carga orgánica (VCO). Ambos son parámetros que definen el volumen del reactor y por lo general están relacionados al lavado de biomasa [49, 50]. El lavado de la biomasa puede ser controlado a través de un buen diseño del reactor [51, 52]. Para determinar el TRH óptimo es necesario tomar en cuenta los siguientes factores: la velocidad de reacción, la concentración del sustrato, la composición de la biomasa, su naturaleza y la temperatura.

La disminución en la productividad del bioH_2 se produce cuando el flujo de alimentación y descarga aumenta, provocando un menor tiempo de interacción entre la carga orgánica y los microorganismos [18, 27, 50]. El reactor UASB ha demostrado excelentes resultados mejorando rendimiento del proceso, sin embargo, pocos estudios han evaluado residuos industriales o sistemas de codigestión [27, 32, 51]. Algunos como Sivagurunathan *et al.*, [49] reporta el estudio de 3 TRH utilizando como sustrato galactosa, obteniendo una tasa de $2.25 \text{ mol H}_2 \text{ mol galactosa}^{-1}$ y una velocidad de producción de $56.8 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a un TRH de 1.5 h. Similar resultado obtuvo Pugazhendhi *et al.*, [53] quienes evaluaron diferentes TRH, de 12 a 1.5 h, utilizando glucosa como sustrato obtuvo una tasa de $2.3 \text{ mol H}_2 \text{ mol glucosa}^{-1}$ y velocidad de producción de $78 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con un TRH óptimo de 1.5 h. Por otro lado, Junk *et al.*, [54] encontró que el TRH óptimo fue de 6 h utilizando como sustrato xilosa con una producción de $2.71 \text{ mol H}_2 \text{ mol xilosa}^{-1}$. Esto demuestra que la producción de bioH_2 en un reactor UASB puede verse influido por el tipo de sustrato (Tabla 1).

La tabla 1 muestra que utilizar sustancias puras (ideales) permite obtener las producciones de bioH₂ más altas con respecto al sustrato a partir de residuos, como residuos de café, de yuca o suero de queso. Sin embargo, el reto de la producción de bioH₂ a partir de biomasa empleando la FO es valorizar los residuos con altas cargas orgánicas y sin ningún valor en el mercado. Además del análisis de literatura se percibe que los estudios de codigestión en reactores tipo UASB son muy escasos, inclusive no existe reportes. Sin embargo, frente al reto de lograr la producción continua de bioH₂, en este trabajo se ha estudiado la codigestión anaerobia de sustratos SIL-SIC a diferentes TRH empleando lodos granulares provenientes de la industria de cerveza.

Tabla 1. Comparación entre sustratos puros y sustratos a partir de residuos en reactores UASB.

Sustrato	Fuente de inóculo	Operación	TRH óptimo (h)	Producción	Productividad (L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Ref.
Glucosa	Lodo granular	37 °C y pH 5.5	1.5	2.3 mol H ₂ .mol glucosa ⁻¹	78	[55]
Galactosa	Cultivos mixtos	35 °C y pH 5.5-6	1.5	2.25 mol.mol galactosa ⁻¹	56.8	[56]
Xilosa	Lodos CSTR	35 °C y pH 5.5	6	2.71 mol.mol xilosa ⁻¹	9.98	[57]
A.R. de café	Lodo granular	35 °C y pH 5.5	6	1.78 mol H ₂ .mol ARC ⁻¹	2.76	[58]
Residuos de yuca	Lodo granular	55 °C y pH 5.5	ND	54.2 mL H ₂ .g DQO ⁻¹	0.53	[59]
Suero de Queso	Lodos digeridos	35 °C y pH 5.5	12	ND	0.12	[60]

2.4.2 El pH

Recientes estudios han propuesto un rango óptimo de operación entre 6.5-4.5, aunque la materia prima y condiciones de operación suelen influir [14, 42, 61]. Por ejemplo, De Gioannis *et al.*, [42] reportó el mejor rendimiento en la producción de bioH₂ a un pH de 7.5-6.5 utilizando residuos lácteos (171.3 NL H₂ kg TOC⁻¹). Por otro lado, Chun Liu *et al.*, [50] utilizó residuos de queso, y encontró que el crecimiento celular disminuye cuando el pH ≤ 4 y/o a pH=7 la actividad de la enzima hidrogenasa es menor y con ello la producción, por lo que mantener un intervalo de 6 ≥ pH ≥ 5 y resultó ser el óptimo al obtener un rendimiento mayor al 10 % con respecto a los que no se encontraron en este intervalo. Este mismo valor fue avalado por Stavropolous *et al.*, [41] quienes encontraron el mejor rendimiento para la producción de bioH₂ a partir de residuos lácteos se obtuvo a pH=5 con una producción máxima de 24 mL H₂ g DQO⁻¹.

2.4.3 La temperatura

La temperatura es otro parámetro que influye sobre la tasa de crecimiento y las rutas metabólicas de los microorganismos. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de crecimiento celular de cultivos puros o mixtos que aceleran la DA [18, 61, 63]. Los cultivos mixtos son preferibles sobre los cultivos puros por su capacidad de resiliencia y robustez y factibilidad de escalamiento. Sin embargo, si se desea maximizar la producción de bioH₂ es necesario que el inóculo sea pretratado. Existen diversos tipos de pretratamiento como los químicos, físicos, térmicos, entre otros, pero el pretratamiento térmico presenta mejores resultados. El pretratamiento térmico es más efectivo si se utilizan las condiciones operativas correctas en el proceso de FO [20, 29, 64].

2.4.4 La presión parcial de hidrógeno

Otra de las problemáticas de la FO es el aumento de la P_{H₂}. Algunas referencias, principalmente estudios en reactores tipo batch, han demostrado el impacto de la P_{H₂} en el rendimiento final del reactor. La P_{H₂} es en teoría la presión que ejerce el bioH₂ si este estuviese de manera individual en un sistema cerrado. Por lo tanto, cuando la P_{H₂} presenta un incremento en el sistema, se origina la acumulación de bioH₂ en el medio acuoso por la reducción de los protones de H₂ produciendo una supersaturación de bioH₂ en el medio [50]. La supersaturación de bioH₂ ocurre cuando aumenta la tasa de producción de bioH₂ en el reactor en función de la tasa de transferencia en la fase gas para mantener el equilibrio dinámico, provocando la disolución del bioH₂ tal como se ejemplifica en la Figura 7.

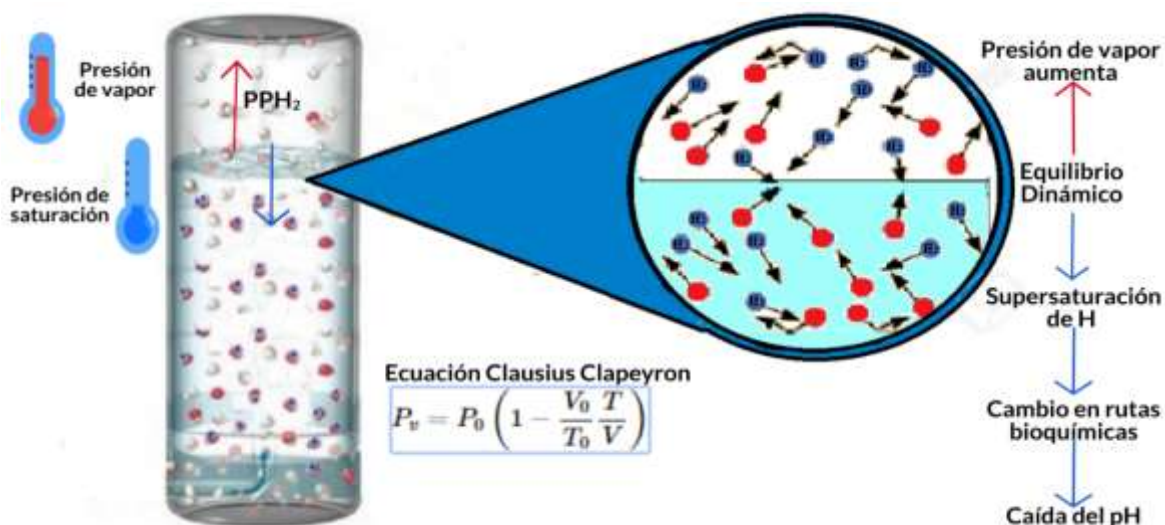


Figura 7. Supersaturación de bioH₂ en un medio acuoso.

Desafortunadamente la supersaturación provoca algunos efectos en las reacciones del medio fermentativo provocando cambios en las rutas bioquímicas. En parte porque, el incremento de la P_{H₂} baja la conversión del sustrato y disminuye la conversión hacia bioH₂ porque aumentan los productos indeseables como la acetona, el etanol y otros ácidos y reduce la actividad de la enzima hidrogenasa [34].

También es posible la inhibición de la actividad microbiana por el incremento de metabolitos ácidos que saturan el medio. Los metabolitos, con bajo grado de disociación, son capaces de penetrar la membrana celular disociándose en su interior y acidificando el medio, como resultado, los microorganismos requieren de mayor energía para mantener el pH interno lo que reduce la actividad microbiana [35].

Por otro lado, desde el punto de vista termodinámico, la mayoría de las rutas de bioquímicas del etanol, el ácido propiónico o el ácido valérico presenta una ΔG° positiva, es decir, las reacciones no se producirán de manera espontánea. Pero, cuando aumenta la P_{H_2} , la ΔG° cambia y se vuelve negativa favoreciendo la producción de estos metabolitos [65]. No obstante, el cambio de la ΔG° puede contribuir al proceso de homoacetogénesis o aumentar la actividad metanogénica de esta manera disminuye la producción de $bioH_2$ [39].

Para disminuir el impacto de la P_{H_2} se han estudiado el comportamiento de esta magnitud física. Según la ley de Raoult, una disminución en la presión total puede lograr una disminución de la presión de vapor en el sistema de reacción. Es decir, es posible que la aplicación de presión de vacío en el medio de reacción logre incrementar el rendimiento en la producción de $bioH_2$ porque involucra una disminución en la P_{H_2} . Sin embargo, la implementación de una bomba de vacío puede elevar los costos de operación. Otros estudios han implementado el uso de membranas activadas pero su coste y funcionalidad se han visto opacados por otros métodos.

En busca de implementar técnicas que requieran la menor cantidad de energía, se han implementado modificaciones en los sistemas de reacción para disminuir la presión de vapor. Algunas de las estrategias consisten en mantener la agitación constante afín de aumentar la energía cinética de las moléculas irrumpiendo su equilibrio dinámico y el $bioH_2$ sea separado del medio acuoso. Por otro lado, se han implementado el burbujeo de gases inertes como el Nitrógeno (N_2) y el CO_2 , pero, este método puede aumentar significativamente el costo de producción de $bioH_2$. Principalmente porque la técnica del burbujeo es el alto costo del gas empleado y la difícil recuperación del $bioH_2$. No obstante, el propósito del presente trabajo no es evaluar la P_{H_2} , sino que es importante tenerlo presente para explicar en teoría las reacciones termodinámicas de los experimentos realizados.

2.5 Estrategias para aumentar el rendimiento de producción de bioH₂

Anteriormente hemos visto los principales avances tecnológicos de la FO y como el desarrollo ha aumentado su factibilidad. También sabemos del amplio beneficio que nos otorga esta tecnología debido a su amplia gama de aplicaciones. Sin embargo, la FO tiene obstáculos que debe vencer y, es importante conocer cuáles son las estrategias a implementar para mejorar la producción de bioH₂. Algunos ejemplos han sido el control de las variables del proceso (la temperatura, el pH, la C/N, el TRH, entre otros), la fuente de inóculo o incluso el modo de operación del reactor. A continuación, se describen algunas de las estrategias más estudiadas y su efectividad en el rendimiento de bioH₂.

2.5.1 Fuente de inóculo

Los consorcios mixtos pueden derivarse de diversas fuentes naturales, como los lodos de depuración, los lodos de digestión anaeróbica, los lodos aclimatados, el estiércol animal y el suelo o incluso de los microorganismos autóctonos que se encuentran en ciertos desechos [23]. A este respecto, en la bibliografía se informaba de diversas estrategias. Algunas de ellas son la selección y el tratamiento previo de los consorcios microbianos, la inmovilización de los consorcios, las técnicas estadísticas para la optimización de los procesos, la secuenciación de los biorreactores, el tratamiento bioelectroquímico, la integración de procesos múltiples y la bioaumentación [39].

Los cultivos de aislados puros pueden ser más fáciles de controlar, pero necesitan un entorno constantemente estéril para evitar la contaminación que es difícil y costosa de mantener fuera de los laboratorios. Además de su aplicación en un entorno no estéril, los cultivos puros pueden utilizarse en la bioaumentación de diversas poblaciones productoras de bioH₂ para obtener mejores desvíos de gas. Las restricciones de los criterios de esterilidad son las principales razones por las que se prefieren las comunidades bacterianas mixtas a sus homólogas puras en las aplicaciones a escala real [34].

Además, los cultivos mixtos con aparatología enzimática compleja pueden ser privilegiados para la bioconversión de biomasa compleja en gas bioH₂, ya que una sola cepa puede ser incapaz de tratar adecuadamente una variedad de sustancias, por ejemplo, los polisacáridos [61]. Cuando en un reactor bioaumentado que utiliza "comunidades diseñadoras" de cepas múltiples se experimenta un mayor rendimiento, una menor inestabilidad y una mayor flexibilidad, es probable que estén asociados con el metabolismo complementario de la(s) cepa(s) de aumento y la comunidad bacteriana huésped empleada originalmente para la inoculación [36].

2.5.2 Producción en continuo

Tanto en las aplicaciones continuas como en las discontinuas, la configuración y el diseño del biorreactor es ciertamente un factor que ayuda a la aclimatación y a la capacidad de supervivencia a largo plazo del microorganismo o microorganismos particulares. Estos objetivos pueden alcanzarse, por ejemplo, mediante biorreactores de membrana y sistemas de granulado, que pueden mantener concentraciones celulares relativamente altas, así como tiempos de residencia de la biomasa más largos [36]. La actividad de los metanógenos y las SRB puede reducirse significativamente operando a un pH inferior a 6 junto con el control de la TRH y la VCO. Por lo tanto, la producción de bioH₂ mediante un cultivo fermentativo oscuro mixto es un sistema microbiano complejo, en el que influyen diversos parámetros como el tipo de sustrato, el pretratamiento del sustrato, el tipo de inóculo, el método de enriquecimiento del inóculo, el diseño y el funcionamiento del biorreactor [20].

2.5.3 Control del pH

El pH es uno de los factores más importantes que deben ser regulados en el proceso de la FO. El pH no sólo afecta el rendimiento de producción de bioH₂, sino que también influye en los productos y las comunidades microbianas resultantes. El proceso anaeróbico se ve afectado adversamente con pequeños cambios en los niveles de pH (que se encuentran fuera del intervalo óptimo). Los diferentes grupos bacterianos presentes en el proceso de DA presentan unos niveles de actividad óptimos en torno a la neutralidad. El óptimo es entre 5.5 y 6.5 para acidogénicos y entre 7.8 y 8.2 para metanogénicos [14, 18, 40-41, 61].

Recientes estudios han propuesto un rango óptimo de operación entre 6.5-4.5, aunque la materia prima y condiciones de operación suelen influir [14, 41, 61]. Por ejemplo, De Gioannis *et al.*, [42] reportó el mejor rendimiento en la producción de bioH₂ a un pH de 7.5-6.5 utilizando residuos lácteos. Por otro lado, Chun Liu *et al.*, [40] utilizó residuos de queso, y encontró que el crecimiento celular disminuye cuando el pH ≤ 4 y a pH=7 la actividad de la enzima hidrogenasa es menor y con ello la producción, por lo que mantener un $6 \geq \text{pH} \geq 5$ y resultó ser el óptimo al obtener un rendimiento mayor al 10 % con respecto a los que no se encontraron en este intervalo. Este mismo valor fue avalado por Stavropolous *et al.*, [41] quienes encontraron el mejor rendimiento para la producción de bioH₂ a partir de residuos lácteos se obtuvo a pH 5 con una producción máxima de 24 mL H₂ g DQO⁻¹.

2.5.4 Codigestión

La producción de bioH₂ también puede inhibirse o disminuir dependiendo de las características del sustrato, como por ejemplo su baja capacidad amortiguadora, la deficiencia de nutrientes y la presencia de microorganismos consumidores de bioH₂ y/o productores de metano. Recientemente la mezcla de dos o más sustratos (codigestión) se ha implementado como una estrategia para aumentar el rendimiento y la producción de bioH₂. La codigestión normalmente es reportada como el cociente entre fuente de carbono y la fuente de N₂ (C/N) [27, 30]. La calidad y cantidad del bioH₂ producido dependerá de la composición y la naturaleza del residuo utilizado [63]. El carbono constituye la fuente de energía, el N₂ promueve la formación de nuevas células.

Por lo tanto, una baja relación C/N conduce a una baja producción de bioH₂, mientras que una alta relación produce una baja capacidad amortiguadora provocada por la acidificación que inhibe la actividad celular [30, 63]. Las bacterias consumen 30 veces más carbono que nitrógeno, esto demuestra que la óptima C/N está en el intervalo de 20:1 hasta 30:1 [29, 52, 54].

Aunque, existen algunas excepciones como el caso de Smith *et al.*, [60] quienes encontraron que, a partir de residuos de papel, la relación C/N óptima fue de 37. Mientras que el estudio realizado por Gómez-Romero *et al.*, [30] afirman que la relación C/N óptima fue de 21, además, aseguran que una proporción adecuada de sustratos puede mejorar el rendimiento en la producción de bioH₂. De la misma forma, Basak *et al.*, [52], a través de una codigestión, encontraron que la relación C/N fue de 26.8. Su estudio también demostró que una baja relación de C/N refleja una baja remoción de DQO y conforme la relación C/N aumenta el porcentaje de remoción de DQO también aumenta, y disminuye cuando se sobrepasa la relación óptima. El principal obstáculo para obtener altos rendimientos de bioH₂ durante la fermentación de los desechos orgánicos es el insuficiente grado de descomposición de los sustratos complejos. Además, la necesidad de eliminar los productos de la fermentación es un problema importante para mantener la FO a escala industrial a un nivel de producción constante, especialmente en un proceso continuo [22].

De lo anterior, es importante destacar que en todos los casos la evaluación de la codigestión se realizó en sistemas batch y, como hemos mencionado anteriormente los sistemas en lote no son fácilmente de escalables. Para esto se ha implementado la FO en codigestión para procesos continuos. A pesar de las ventajas que ofrece la codigestión, los recientes estudios demuestran que es complejo la estabilización del proceso. De hecho, algunos estudios como el de Ferreira *et al.*, [66] quienes estudiaron la codigestión entre suero de queso y glucosa en un reactor AFBR, demostraron rendimientos de 0.64 mol H₂ g glucosa⁻¹. Sin embargo, no es justificable el uso de la glucosa como cosustrato por la infactibilidad de escalamiento.

En realidad, existen escasos trabajos donde se haya empleado la FO en continuo y la codigestión de sustrato de biomasa residual. De hecho, en la Tabla 2 se presentan algunos estudios de codigestión en reactores de flujo ascendente. Por ejemplo, Ramos *et al.*, [68] quienes demostraron que la codigestión entre suero de queso y vinazas de caña de azúcar (SQ-V) a un TRH de 8 h en un reactor AFBR y una relación SQ-V de 2:10 aumentaba el rendimiento de bioH₂ en un 400%. En otro estudio, Dareioti *et al.*, [69] evaluó la producción de bioH₂ a partir de residuos del proceso de aceite de oliva, suero de queso y estiércol de vaca. Demostró el buen desempeño de la codigestión, pero no evaluó su comportamiento en continuo. Para el caso del reactor UASB no existe el estudio de la codigestión entre los sustratos propuestos en el presente trabajo. De allí la importancia de estudiar el sistema de codigestión en un reactor continuo de flujo ascendente.

Tabla 2. Estudios donde se han empleado la codigestión de biomasa residual en reactores continuos de flujo ascendente.

Codigestión	Tipo de reactor	Operación	TRH (h)	Rendimiento (mmol H ₂ , g DQO ⁻¹)	OLR (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Ref.
SQ y glucosa	AFBR	30°C y pH 6	6	0.64 mol H ₂ g glucosa ⁻¹	20	[66]
GUC y SQ	UASB	35 °C y pH 7	16.7 (d)	0.54 L CH ₄ g SV ⁻¹	4.11	[67]
SQ y VCA	AFBR	55 °C y pH 4.95	6	1.01 mmol H ₂ g DQO ⁻¹	42	[68]

GUC: granos usados de cervecería, SQ: suero de queso, VCA: vinazas de caña de azúcar.

2.6 Aguas residuales en México

2.6.1 Calidad de los cuerpos receptores

La calidad del agua se determinada mediante la caracterización química de muestras de agua proveniente de cuerpos receptores como ríos, lagos y cuerpos de agua. La CONAGUA plantea la evaluación de la calidad del agua a partir de tres indicadores principales: la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO₅), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Totales (SST). Para determinar la calidad del agua es necesario la instalación de redes de monitoreo en los principales puntos de abastecimiento de agua. Al 2015, la red de monitoreo ascendía a 5000 puntos en todo el país y cerca del 56% presentaban una buena calidad del agua. Sin embargo, es preocupante que más del 8% se encontraba contaminada. Como vimos la DQO indica la cantidad de materia orgánica que proviene de las aguas residuales dirigidas a los cuerpos receptores y un incremento de las concentraciones de DQO por el aumento de materia orgánica no biodegradable. Lo anterior puede disminuir el oxígeno disuelto y afectar la vida acuática [25].

En la Figura 8, se presenta las 13 regiones hidrológicas administrativas (RHA) de México en relación al porcentaje de contaminación por DQO donde se observa la RHA 4 (Región perteneciente al río balsas) y la RHA 13 que es la región del valle de México que además de ser las más contaminadas presentan un bajo valor de agua *per cápita*, tal como la RHA 6 (Río bravo). Por su parte la región de Río bravo es la tercera región con mantos acuíferos sobrexplotados demostrando que es importante seguir monitoreando los indicadores de contaminación en los cuerpos receptores.

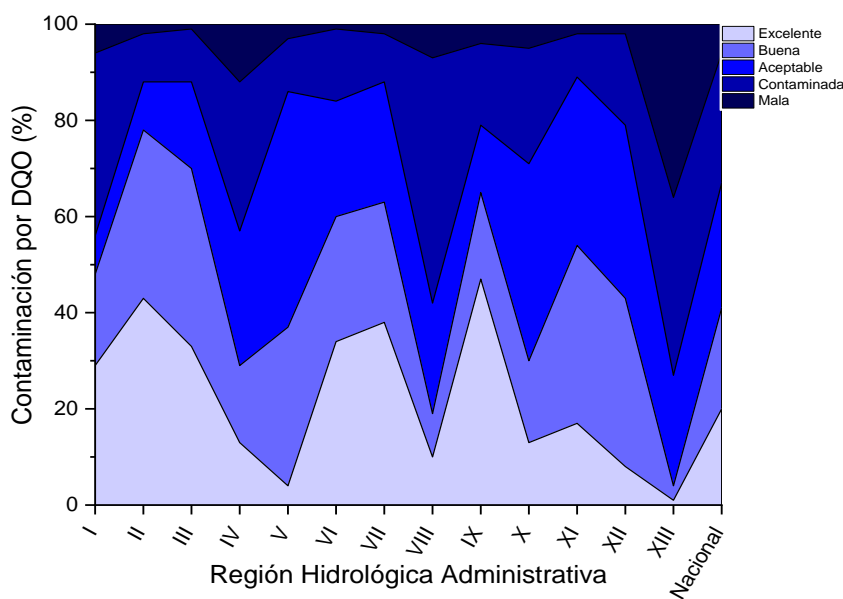


Figura 8. Distribución porcentual de contaminación por DQO en cuerpos superficiales por RHA. Datos obtenidos de [25]

2.6.2 Marco legal en las descargas de aguas residuales

Actualmente en México, la CONAGUA es el organismo regulador en la calidad del agua en México. La CONAGUA ha publicado basta información para la disposición, especificación y metodología que garantice la que el agua de consumo humano cumpla con la cantidad y calidad suficiente de manera eficiente y sustentable. Sin embargo, las regulaciones actuales tienen permisiones sumamente laxas. Por ejemplo, la NOM-127-SSA1-1994 establece los límites permisibles bacteriológicos como los coliformes fecales y totales, características físicas como el color, olor y turbiedad y principalmente las características químicas, comprendiendo cerca de 34 parámetros de evaluación que son considerados como contaminantes [26].

Desafortunadamente, hoy en día las normas de la calidad en las descargas de aguas residuales en México son las más permisibles. Por ejemplo, los límites máximos permisibles en las descargas, la norma vigente en México, la NOM-001-SEMARNAT-1996 tiene una vigencia mayor a 20 años. Entre los máximos permisibles convenidos en esta norma se sugieren concentraciones menores a 150 mg DBO₅ L⁻¹, 40 mg NT L⁻¹ de y 75 mg SST L⁻¹. Por otro lado, las principales normas internacionales en este tema, como la EPA, sugieren límites contaminante de 30 mg DBO₅ L⁻¹, 10 mg NT L⁻¹ y 30 mg SST L⁻¹. Como se observa en la Tabla 2, los máximos permisibles de la norma mexicana son entre 2 y 4 veces mayor que la EPA. Actualmente se está trabajando en la propuesta de la norma PROY-NOM-SEMARNAT-2017 la cual contempla algunos valores de las normas internacionales, aunque solo es una propuesta por lo que no se considera una norma vigente [70]. Por ello, es necesario impulsar una política pública que permita la implementación de normas internacionales y contribuya a mejorar política pública en el control de la calidad del agua en México.

Tabla 3. Comparación de la norma mexicana y normas internacionales en materia de descarga de aguas residuales. Datos obtenidos de [25, 26, 70-72].

Norma	EPA	Unión Europea	NOM-001-SEMARNAT-1996			PROY-NOM-SEMARNAT-2017		
			Río	Mar	Suelo	Río	Mar	Suelo
Parámetros	Descarga	Clase 3	Río	Mar	Suelo	Río	Mar	Suelo
Temperatura (°C)	45	25	NA	40	NA	35	40	35
pH	6-9	5.5-9	NE	NE	NE		6.5-8.5	
Grasas y aceites	15	NE	15	15	15		15	
SST	30	35	75	75	NA	60	20	100
DQO	150	125	NE	NE	NE	150	85	150
DBO	30	25	150	75	NA		30*	
Nitrógeno	10	3	40	15	NA	25	25	NA
Fósforo	15	NE	20	5	NA	15	15	NA
Coliformes fecales, (NMP/100)	200	NE	NE	NE	NE		1000	

*Factor 1.6 de la relación DQO.DBO⁻¹.

2.7 Políticas públicas del hidrógeno en México

En 2008, con la promulgación de la Ley de promoción y desarrollo de los biocombustibles y, posteriormente con la Ley para el aprovechamiento de los recursos renovables y el financiamiento de la transición energética, dio la pauta para aumentar la capacidad energética de las energías renovables. En el sexenio pasado se hizo uso de instrumentos económicos tales como el (1) aumentar la capacidad de generación y (2) promover el uso de las energías renovables, así como, (3) mitigar las emisiones de CO₂ con el propósito de cumplir dichos decretos. En particular, la biomasa paso a representar 4% de total de la producción de energía del país, sin embargo, el 97% se obtuvo a partir de la quema del bagazo de caña, lo que demostró la falta de diversificación de fuentes alternas de energía. Además, la quema de bagazo contribuye potencialmente en las emisiones de CO₂, en busca de satisfacer la demanda energética y disminuir las fuentes de emisión de CO₂ se ha optado por la tecnología del bioH₂ [4, 73].

En 2014, se aprobó la ley general para la utilización del bioH₂ y sus tecnologías relacionadas con la finalidad de adoptar el bioH₂ como combustible con ayuda de la investigación científica y tecnológica [3]. Actualmente, el área de investigación de la tecnología del bioH₂ más activa son los procesos biológicos. El principal interés radica en la importancia de valorizar los desechos y aguas residuales con abundante materia orgánica por las actividades económicas del país. También es importante mencionar que la investigación en México ha tomado un rumbo ascendente los últimos 8 años y ha proporcionado una fuente confiable de información. Así mismo, es importante recalcar que la transición energética no solo dependerá de las políticas públicas y la investigación científica del país, sino también de lo económico, académico y social. Entre los ejemplos podemos encontrar la precaria educación en materia ambiental, la pobreza y la falta de servicios básicos como la salud y la seguridad. Por lo tanto, es importante la participación activa de los ciudadanos para un desarrollo encaminado a la sustentabilidad [17].

2.8 Referencias

- [1] Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Trably, E., Carrere, H., Lyberatos, G. Continuous biohydrogen production from a food industry waste: influence of operational parameters and microbial community analysis, *J. Cleaner Prod*; 2018; 174: 1054-1063.
- [2] World energy balances and statistics – Data services. Recuperado 1 de julio de 2020, de <https://www.iea.org/subscribe-to-data-services/world-energy-balances-and-statistics>.
- [3] López Ortiz A., Meléndez Zaragoza M. J., Collins-Martínez V. Hydrogen production research in Mexico: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2016; 41(48): 23363–23379. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.004>.
- [4] Pérez-Denicia E., Fernández-Luqueño F., Vilariño-Ayala D., Montaña-Zetina L. M., Maldonado-López L. A. Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev*; 2017; 78: 597–613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.009>.
- [5] García-Sánchez, R., Ramos-Ibarra, R., Guatemala-Morales, G., Arriola-Guevara, E., Toriz-González, G., & Corona-González, R. I. Photofermentation of tequila vinasses by *Rhodospseudomonas pseudopalustris* to produce hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2018; 43(33): 15857-15869. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.07.015>.
- [6] Estevam A., Arantes M. K., Andrigheto C., Fiorini A., da Silva E. A., Alves H. J. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2018; 43(9): 4276–4283. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.052>.
- [7] Sinbuathong N., Somjit C., Leungprasert S. Feasibility study for biohydrogen production from raw brewery wastewater. *Int. J. Energy Res*; 2015; 39: 1769-1777. <https://doi:10.1002/er.3321>.
- [8] Boboescu I. Z., Ilie M, Gherman D. V., Mirel I, Pap B, Negrea A, Kondorosi É, Bíró T. and Maróti G. Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate. *Biotechnol. Biofuels*; 2014; 7: 139. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0139-1>.
- [9] Prospectiva del sector eléctrico, 2018-2032, SENER, Ciudad de México, 2018.
- [10] Prospectiva de energías renovables, 2018-2032, SENER, Ciudad de México, 2018.
- [11] INEL. Recuperado 31 de julio de 2020, de <https://dgel.energia.gob.mx/qa/INEL/INELV5/mapa.html?lang=es>
- [12] Sarma, S. J., Pachapur, V. L., Brar, S. K., Verma, M., & Soccol, C. R. Biohydrogen. *Green Fuels Technol*; 2016; 407-429. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_16.
- [13] PEGIR. “Programa estatal de gestión integral de residuos de Nuevo León 2009-2015”. Recuperado 31 de Julio de 2020, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/187464/Nuevo_Le_n.pdf.
- [14] Náthia-Neves, G., Berni, M., Dragone, G., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. *Int. J. Environ. Sci. Technol*; 2018; 15(9), 2033-2046. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1682-2>.
- [15] Tian, H., Li, J., Yan, M., Tong, Y. W., Wang, C.-H., & Wang, X. Organic waste to biohydrogen: A critical review from technological development and environmental impact analysis perspective. *Applied Energy*; 2019; 256, 113961. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113961>.

- [16] Wicher, E., Seifert, K., Zagrodnik, R., Pietrzyk, B., & Laniecki, M. (Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2013; 38(19): 7767-7773. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.04.008>.
- [17] Ávalos Rodríguez, M. L., Alvarado Flores, J. J., Alcaraz Vera, J. V., Rutiaga Quiñones, J. G., & Valencia, J. E. The legal regulation of the H₂ as a strategy for public policy in Mexico from the consolidation of the National Council of the hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2019; 44(24): 12303-12308. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.214>.
- [18] Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S.-U. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass Bioenergy*; 2015; 75: 101-118. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.011>.
- [19] Rezania, S., Din, M. F. M., Taib, S. M., Sohaili, J., Chelliapan, S., Kamyab, H., & Saha, B. B. Review on fermentative biohydrogen production from water hyacinth, wheat straw and rice straw with focus on recent perspectives. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2017; 42(33): 20955-20969. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.007>.
- [20] Ghimire A., Frunzo L, F. Pirozzi, E. Trabaly, R. Escudie, P. N.L. Lens, Esposito G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy*; 2015; 144: 73-95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>.
- [21] Secretaría de Energía. Atlas Nacional de Biomasa. <https://dgel.energia.gob.mx/anbio/mapa.html?lang=es>.
- [22] Łukajtis R., Holowacz I., Kucharska K., Glinka M., Rybarczyk P., Przyjazny A., Kamiński M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev*; 2018; 91: 665-694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.
- [23] Ghimire, A., Luongo, V., Frunzo, L., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., & Esposito, G. Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2017; 42(8): 4861-4869. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.185>.
- [24] Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste Biomass Valorization*; 2010; 1(1), 21-39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>.
- [25] CONAGUA. 2016. Estadísticas del agua en México.
- [26] Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1991.
- [27] García-Depraect O., Valdez-Vázquez I., Rene E. R., Gómez-Romero J., López-López A., León-Becerril E. Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark cofermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol*; 2019; 282: 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>.
- [28] Pachiega, R., Rodrigues, M. F., Rodrigues, C. V., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., De Oliveira, J. E., & Maintinguer, S. I. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2019; 44(1), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.107>.
- [29] Arantes M. K., Sequinel R., Alves H. J., Machado B., Fiorini A., da Silva E. A. Improvement of biohydrogen production from brewery wastewater: Evaluation of

- inocula, support and reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2020; 45(8): 5216-5226. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.208>.
- [30] Gomez-Romero J., Gonzalez-Garcia A., Chairez I., Torres L., García-Peña E. I. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by codigestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(24): 12541–12550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>.
- [31] Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2009; 34(10): 4296-4304. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>.
- [32] Yang, P., Zhang, R., Mcgarvey, J., & Benemann, J. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2007; 32(18): 4761-4771. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.038>.
- [33] Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., & Liu, S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2006; 31(15): 2147-2157. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.011>.
- [34] Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., & Bélafi-Bakó, K. Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renew. Sust. Energ. Rev*; 2014; 40: 806-813. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.014>.
- [35] Castelló E., Nunes-Ferraz-Jr A. D., Andreani C., Anzola-Rojas M. P., Borzacconi L., Buitrón G., Carrillo-Reyes J., Gomes S. D., Maintinguer S. I., Moreno-Andrade I., Palomo-Briones P., Razo-Flores E., Schiappacasse-Dasati M., Tapia-Venegas E., Valdez-Vázquez I., Vesga-Baron A., Zaiat M., Etchebehere C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew. Sust. Energ. Rev*; 2020; 119: 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- [36] Kumar B. S., Sivaramakrishnan M., Chaitanya N., Srinivas Y., Himabindu V., Narasu M. L. Brewery Effluent as the Promising Substrate Source for Hydrogen Production Using Various Mixed Microbial Consortia. *Int. J. Sci. Res*; 2014; 3(11): 3052-3058.
- [37] Bao, M., Su, H., & Tan, T. Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of *Bacillus* sp and *Brevumdimonas* sp. *Energy Fuels*; 2012; 26(9): 5872-5878. <https://doi.org/10.1021/ef300666m>.
- [38] Saady, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2013; 38(30): 13172-13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.
- [39] Nikhil G.N., Sarkar O., Venkata Mohan S. Biohydrogen Production: An Outlook of Fermentative Processes and Integration Strategies. In: Purohit H., Kalia V., Vaidya A., Khardenavis A. editors. *Optimization and Applicability of Bioprocesses*. Springer, Singapore. 2017, p. 249-265.
- [40] Liu, I.-C., Whang, L.-M., Ren, W.-J., & Lin, P.-Y. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2011; 36(1): 439-449. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.045>.
- [41] Stavropoulos, K.P., Kopsahelis, A., Zafiri, C. et al. Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from End-of-Life Dairy Products (EoL-DPs) via Dark Fermentation. *Waste Biomass Valor*; 2016; 7: 753–764. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9548-7>. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9548-7>.

- [42] De Gioannis G., Friargou M., Massi E., Muntoni A., Polettini A., Pomi R., Spiga D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(36): :20930–20941. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>.
- [43] Valdez-Vazquez I., Morales A. L. and Escalante A. E. History of adaptation determines short-term shifts in performance and community structure of hydrogenproducing microbial communities degrading wheat Straw. *Microb. Biotechnol*; 2017; 10(6): 1569-1580. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12678>.
- [44] Vijaya Krishna, S., Kiran Kumar, P., Chaitanya, N., Bhagawan, D., Himabindu, V., & Lakshmi Narasu, M. Biohydrogen production from brewery effluent in a batch and continuous reactor with anaerobic mixed microbial consortia. *Biofuels*; 2016; 8(6): 701-707. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1206409>.
- [45] Wu, S.-Y., Hung, C.-H., Lin, C.-N., Chen, H.-W., Lee, A.-S., & Chang, J.-S. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol. Bioeng*; 2006; 93(5): 934-946. <https://doi.org/10.1002/bit.20800>.
- [46] Jeon, B.-S., Um, Y. S., Lee, S.-M., Lee, S.-Y., Kim, H.-J., Kim, Y. H., ... Sang, B.-I. Performance Analysis of a Proton Exchange Membrane Fuel Cell (PEMFC) Integrated with a Trickling Bed Bioreactor for Biological High-Rate Hydrogen Production†. *Energy Fuels*; 2008; 22(1): 83-86. <https://doi.org/10.1021/ef700270y>.
- [47] Arreola-Vargas, J., Alatraste-Mondragón, F., Celis, L. B., Razo-Flores, E., López-López, A., & Méndez-Acosta, H. O. Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: effect of simple and complex substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol*; 2014; 90(6): 1062-1069. <https://doi.org/10.1002/jctb.4410>.
- [48] Fogler, H Scott. *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Cuarta edición. Pearson education, México, 2008.
- [49] Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., & Kim, S.-H. Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2016; 41(46): 21670-21677. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.047>.
- [50] Khan, M. B. H., & Kana, E. B. G. Design, implementation and assessment of a novel bioreactor for fermentative biohydrogen process development. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2016; 41(24): 10136-10144. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.208>.
- [51] Tomczak, W., Ferrasse, J.-H., Giudici-Orticoni, M.-T., & Soric, A. Effect of hydraulic retention time on a continuous biohydrogen production in a packed bed biofilm reactor with recirculation flow of the liquid phase. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2018; 43(41): 18883-18895. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.08.094>.
- [52] Basak B., Fatima A., Jeon B. H., Ganguly A., Chatterjee P. K., and Dey A. Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. *Energy Sustain. Dev.* 2018; 47: 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.08.004>.
- [53] Pugazhendhi, A., Anburajan, P., Park, J.-H., Kumar, G., Sivagurunathan, P., & Kim, S.-H. Process performance of biohydrogen production using glucose at various HRTs and assessment of microbial dynamics variation via q-PCR. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2017; 42(45): 27550-27557. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.184>.

- [54] Yin, J., Yu, X., Wang, K., & Shen, D. Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2016; 41(46): 21713-21720. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.094>.
- [55] Anburajan, P., Pugazhendhi, A., Park, J.-H., Sivagurunathan, P., Kumar, G., & Kim, S.-H. Effect of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) on high-rate continuous biohydrogen production from galactose. *Bioresour. Technol*; 2018; 247: 1197-1200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.001>.
- [56] Kim D. H., Kim S. H., Shin H. S. Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme Microb. Technol*; 2019; 45(3): 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.013>.
- [57] Jung, K.-W., Kim, D.-H., & Shin, H.-S. Application of a simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor using xylose. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2013; 38(18): 7253-7258. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.171>.
- [58] Jung, K.-W., Kim, D.-H., & Shin, H.-S. A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2011; 36(2): 1466-1473. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.095>.
- [59] Intanoo, P., Rangsavigit, P., Malakul, P., & Chavadej, S. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresour. Technol*; 2014; 173: 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.039>.
- [60] Aaron D. Smith, Mark T. Holtzapple, Investigation of the optimal carbon–nitrogen ratio and carbohydrate–nutrient blend for mixed-acid batch fermentations. *Bioresour. Technol*; 2011; 102(10): 5976-5987. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.024>.
- [61] Levin, D., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.015>.
- [62] Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, L., Xing, X.-H. (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresour. Technol*; 2013; 135: 292-303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.027>.
- [63] Prabakar, D., Suvetha K, S., Manimudi, V. T., Mathimani, T., Kumar, G., Rene, E. R., & Pugazhendhi, A. Pretreatment technologies for industrial effluents: Critical review on bioenergy production and environmental concerns. *J. Environ. Manage*; 2018; 218: 165-180. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.136>.
- [64] Valta K., Damala P., Angeli E., Antonopoulou G., Malamis D., Haralambous K. J. Current Treatment Technologies of Cheese Whey and Wastewater by Greek Cheese Manufacturing Units and Potential Valorisation Opportunities. *Waste Biomass Valor*; 2017; 8: 1649-1663. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9862-8>.
- [65] Su X., Zhao W., Xia D. The diversity of hydrogen producing bacteria and methanogens within an in situ coal seam. *Biotechnol. Biofuels*. 2018; 11(245): 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1237-2>.
- [66] Ferreira Rosa, P. R., Santos, S. C., & Silva, E. L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(3): 1288-1296. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.11.011>.

- [67] Szaja A., Montusiewicz A. Enhancing the co-digestion efficiency of sewage sludge and cheese whey using brewery spent grain as an additional substrate. *Bioresour. Technol*; 2019; 291: 121863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121863>.
- [68] Ramos, L. R., & Silva, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2018; 43(29): 13081-13089. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.070>.
- [69] Dareioti, M. A., Vavouraki, A. I., & Kornaros, M. Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: A lab-scale evaluation using batch tests. *Bioresour. Technol*; 2014; 162: 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.149>.
- [70] Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.” *Diario Oficial de la Federación*, 5 de enero de 2018.
- [71] Reúso de aguas residuales municipales-lecturas selectivas sobre el reúso del agua- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América- EPA 430/09-91-022 septiembre 1991
- [72] Ley N° 135/40. 91/271/CEE), sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas. *Diario Oficial de la Comunidades Europeas*, 21 de mayo de 1991.
- [73] Alemán-Nava, G. S., Casiano-Flores, V. H., Cárdenas-Chávez, D. L., Díaz-Chavez, R., Scarlat, N., Mahlknecht, J., Parra, R. Renewable energy research progress in Mexico: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev*; 2014; 32, 140-153. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.004>.

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

Materiales y métodos

3.1 Introducción

En este capítulo se abordará todo lo relacionado con la parte experimental para la extracción de energía a partir de la codigestión de sustratos SIL-SIC en un reactor UASB como se ilustra en la Figura 9. En primer lugar, se optó por evaluar dos tipos de consorcios microbianos, siendo la primera etapa la elección del inóculo granular (IG) proveniente de la planta de tratamiento de la industria de bebidas de la cd. de Monterrey y el inóculo de composta los inóculos elegidos mismos que fueron caracterizados fisicoquímicamente. Debido a la actividad industrial de la zona metropolitana de Monterrey se seleccionó el suero que queso y las aguas residuales de cervecería como sustrato modelos debido a que sus características químicas podrían potenciar la producción de bioH_2 de acuerdo con el análisis de literatura. Una vez teniendo definidas las fuentes de CH y N_2 necesarios para el crecimiento microbiano durante la FO, se realizó una evaluación en sistema batch a nivel microreactor con la finalidad de obtener las condiciones ideales empleando un diseño de experimentos de tipo Placked Burman. Los productos de la reacción de FO fueron determinados por espectroscopia UV-Vis y Cromatografía de gases como se especifica con mas detalle en este capítulo. Una vez identificadas las principales variables que tiene mayor impacto en la FO ($\text{C/N} = 35$) se validó la cinética de la reacción mediante el modelo de Gompertz. Finalmente, en la última etapa se replicó los resultados obtenidos en la etapa batch para evaluar la producción de bioH_2 en continuo y el efecto del TRH en el sistema.

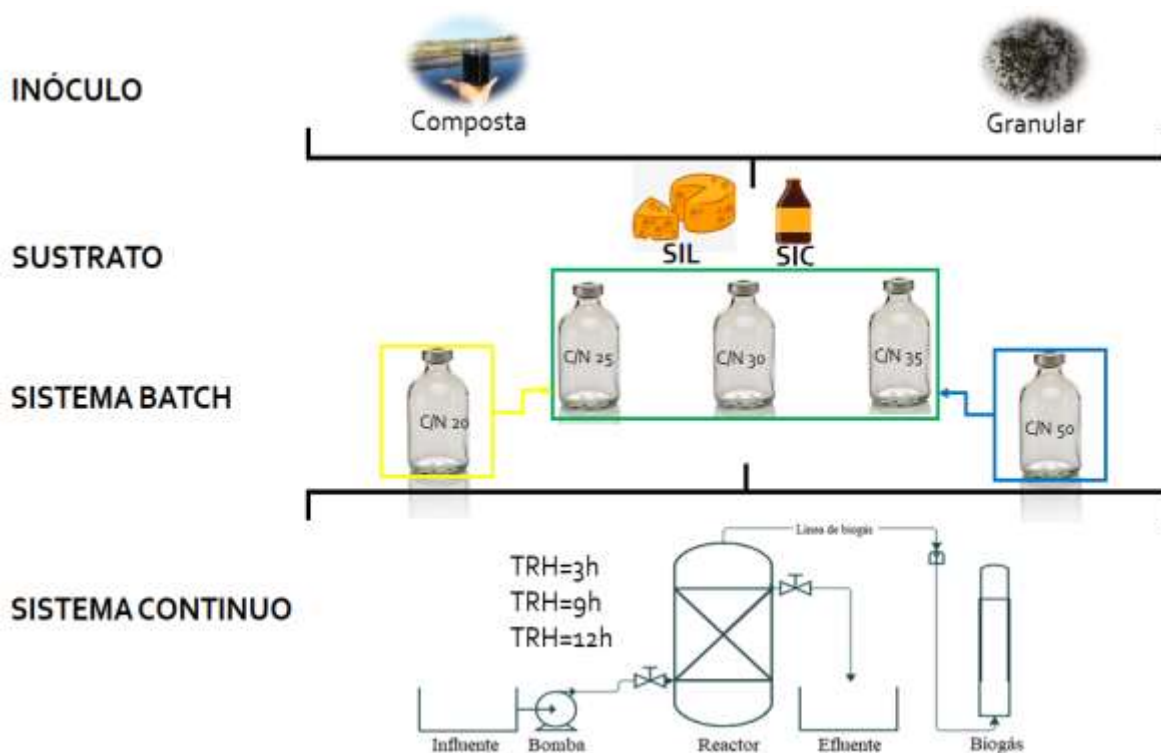


Figura 9. Diagrama del flujo del proceso de la etapa experimental dentro del proyecto 249908 CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Sustrato

Se utilizaron dos residuos de la industria alimenticia. El primer residuo corresponde a las aguas residuales de la industria de bebidas de la Zona metropolitana de con un periodo regular de muestreo periódicamente. El segundo sustrato, el suero de queso “dulce”, residuo de la fabricación del queso panela, fue proporcionado por Facultad de Agronomía de la UANL, el periodo de muestreo se realizó periódicamente y correspondiente al primer lavado del producto. Los análisis se realizaron en el laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería Civil de la UANL. El procedimiento de toma de muestra se realizó conforme a la norma mexicana NMX-AA-003-1980 y se conservó la muestra a 4°C hasta su uso [1]. Esto se realizó con la intención de evitar que la actividad de los microorganismos alterase los resultados. Inmediatamente después de la obtención de la muestra se analizaron las propiedades fisicoquímicas como el pH, la alcalinidad (Ak), los ST, los SV, la DQO, los CH, las proteínas y el NT de acuerdo a las normas internacionales y la norma mexicana [2]. La cantidad de muestra necesaria para cada caracterización, cantidad de reactivo a utilizar, el tiempo y la temperatura que son los parámetros más importantes en el análisis de las muestras.

3.2.2 Inóculo

Como parte de la primera etapa del proyecto, se consideró estudiar dos tipos de consorcios microbianos mixtos.

Inóculo granular (IG)

El IG (Figura 10) se obtuvo de una planta de tratamiento de aguas residuales localizada en la ciudad de Monterrey, Nuevo León. La caracterización fisicoquímica del inóculo fue reportada por Reyna Gómez *et al.*, [3] que demuestra un $\text{pH} > 7$ y una carga orgánica de $66 \pm 2.5 \text{ g DQO L}^{-1}$ demostrando su prometedora capacidad de amortiguamiento para el medio de reacción. Previo a su uso, el inóculo granular fue pretratamiento térmico que consiste en colocar 100 mL de IG en un matraz y se tapó con una torunda. En seguida el matraz se introdujo en un baño María y se procedió a calentar hasta a 100 °C ó hasta ebullición durante 30 minutos y posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente [3]. De acuerdo con la relación volumen inóculo/sustrato = 1:10, se colocó el volumen de inóculo en los microrreactores, así como en el reactor UASB.



Figura 10. Fotografía del inóculo granular empleado durante el desarrollo de la FO empleando la codigestión SIL-SIC.

Inóculo de Composta

El segundo inóculo, inóculo de composta (IC) consiste en un líquido oscuro producto de la lixiviación de un proceso de compostaje de flores de ornato. El objetivo de su utilización es por el probable potencial de degradación de material lignocelulósico y materia orgánica de baja biodegradabilidad. La caracterización fisicoquímica indica un pH óptimo para la FO de $\text{pH} = 6$ y una baja carga orgánica, menor a 15 g DQO L^{-1} . Respecto al pretratamiento del inóculo y su uso en la FO de la codigestión SIL-SIC se desarrollo bajo el mismo procedimiento que el IG.

3.3 Métodos analíticos para evaluación de sustratos

A continuación, se describen las técnicas analíticas empleadas durante la caracterización de los sustratos individuales (SIL y SIC) durante el muestreo para establecer las codigestiones en función de la relación C/N.

3.3.1 Análisis bioquímico

Potencial de Hidrógeno (pH)

Para el análisis de pH se siguieron los procedimientos señalados para el método en la NMX-AA-008-SCFI-2016 [4]. Se tomó 500 ml de muestra en un vaso de precipitados, y se midió el pH con ayuda de un potenciómetro (Modelo “Orion”, marca Thermo Scientific®) se realizaron tres lecturas de pH (*in-situ*) y se tomó un promedio de ellas para cada caso, mirando que no hubiese una variación de más de 0,03 unidades de pH entre ellas. Esta operación se realizó para cada tipo de muestra.

Oxígeno Disuelto (OD):

Se utilizó el método electrométrico basado en la NMX-AA-012-SCFI-2001 [5], con ayuda de un medidor portátil marca Horiba y un electrodo de la misma marca, modelo 9551-20D para oxígeno disuelto, mismo que se calibró previo a la lectura del parámetro, posteriormente se introdujo en la muestra de los sustratos individuales y se procedió a hacer la lectura.

Alcalinidad

La determinación de la Ak en cada muestra se hace por el método de valoración con una sustancia titulante de acuerdo a la NMX-AA-036-SCFI-2001 para la determinación de acidez y Ak de los sustratos individuales. Se tomaron 50 ml de la muestra y depositados en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se introdujo el electrodo de un potenciómetro (Modelo “Orion”, marca Thermo Scientific®), teniendo en cuenta el pH inicial, se valoró con Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) y en el momento que la pantalla del equipo se observa la lectura en un pH igual a 4.5 se tomó el volumen consumido del titulante y se realizaron los cálculos [6]. Según la siguiente formula:

$$Ak = \frac{V_g * N * 50}{V_m} \times 1000 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

Ak = Alcalinidad de la muestra en mg CaCO₃ L⁻¹.

V_g = Volumen de titulante gastado en mL.

N = Normalidad del agente titulante en Eq L⁻¹.

50 = Es el factor para convertir eq L⁻¹ a mg CaCO₃ L⁻¹.

V_m = Volumen de muestra valorada en mL.

1000 = Factor para convertir de mL a L.

Sólidos totales

La determinación de los ST se realizó para los sustratos individuales y las codigestiones de los reactores batch. Los ST representan la humedad del lodo, y se basa en la pérdida de peso que sufre la misma después de someterse a un proceso de calentamiento a 105 °C. De acuerdo a la NMX-AA-034-SCFI-2015 [7].

Preparación de crisoles

1. Introducir los crisoles a la estufa a una temperatura de 105 ± 2 °C durante 20 minutos y posteriormente a 550 ± 50 °C durante 1 h.
2. Trasladar crisol a desecador y dejar enfriar por 20 minutos.
3. Pesar las cápsulas y repetir el ciclo del horno (Modelo “Heratherm Oven”, marca Thermo Scientific®), al desecador hasta obtener una diferencia de 0.0005 g en dos pesadas consecutivas y registrar como m.

Procedimiento.

1. Agitar la muestra para homogeneizar la muestra.
2. Tomar 50 mL con pipeta volumétrica y colocarlos en capsula de porcelana, previamente pesada a peso constante.
3. Secar en estufa (Modelo “Heratherm Oven”, marca Thermo Scientific®), a una temperatura de 105 ± 2 °C hasta peso constante.
4. Al termino de esto, pesar la capsula con los sólidos y registrar como m_1 .
5. Realizar los respectivos cálculos.

Cálculos

Terminado el análisis, la muestra residual, puede usarse para determinar el contenido de ST y/o de materia orgánica.

$$ST = \frac{m_1 - m}{V} \times 1\,000\,000 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

ST = Sólidos totales, en mg L^{-1} .

m = Peso de la cápsula vacía en mg.

m_1 = Peso de la cápsula con el residuo, después de la evaporación en mg.

V = Volumen de la muestra en mL.

Sólidos volátiles

La determinación de los SV se basa en la pérdida de peso que sufre la muestra después de someterse a un proceso de calentamiento a 550 °C. La determinación se hará de acuerdo a la NMX-AA-034-SCFI-2015 para la determinación de cenizas [7].

Procedimiento.

1. Introducir en la mufla (Modelo “Linderberg M”, marca Thermo Scientific®) el recipiente con el residuo seco a 105 ± 3 °C según la evaluación de ST.
2. Lentamente subir la temperatura a 550 °C y mantener durante dos horas, lentamente disminuir hasta menos de 200 °C.
3. Retirar de la estufa (Modelo “Heratherm Oven”, marca Thermo Scientific®), tapar y dejar enfriar en desecador.
4. Sacar del desecador e inmediatamente pesar y registrar como m_2 .
5. Realizar los cálculos respectivos.

Cálculos

Calcular los sólidos volátiles, tal como se recibió, según la siguiente formula:

$$STV = \frac{m_1 - m_2}{V} \times 1\,000\,000 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

STV = Sólidos totales volátiles, en mg L⁻¹.

m_2 = Peso de la cápsula, después de la calcinación en mg.

Sólidos suspendidos totales*Preparación de dispositivo de filtración*

1. Utilizar filtro de fibra de vidrio de 1.5 µm de tamaño de poro y colocar la parte rugosa hacia arriba de los crisoles Gooch.
2. Mojar filtro con agua destilada para que se adhiera al crisol.
3. Introducir crisoles a la estufa a 105 ± 2 °C por 20 minutos e introducir al desecador.
4. Pesar el dispositivo de filtración y repetir el paso anterior hasta obtener una diferencia de 0.0005 g en 2 pesadas consecutivas y registrar como m_3 .

Procedimiento

1. Montar sistema de filtración.
2. Homogenizar muestra y seleccionar un volumen de acuerdo a las características de la muestra.
3. Medir un volumen conocido en probeta y colocar en sistema de filtración, posteriormente enjuagar la probeta para arrastrar residuos y verter en el dispositivo de filtración hasta filtrar totalmente la muestra líquida.
4. Introducir el dispositivo de secado en estufa (Modelo “Heratherm Oven”, marca Thermo Scientific®) a 105 ± 2 °C durante 1 h.
5. Realizar paso 4 de la preparación de dispositivo de filtración y registrar como m_4 .

Cálculos

$$SST = \frac{m_4 - m_3}{V} \times 1\,000\,000 \quad (\text{Ec. 4})$$

*Donde:*SST = Sólidos suspendidos totales, en mg L⁻¹.m₃ = Peso del dispositivo antes de la filtración en mg.m₄ = Peso del dispositivo después de la evaporación en mg.

V = Volumen de la muestra en mL.

Sólidos suspendidos volátiles*Procedimiento*

1. Introducir dispositivo de filtración, registrado como m₄, a la mufla (Modelo “Linderberg M”, marca Thermo Scientific®) con una temperatura de 550 ± 50 °C durante 1 h.
2. Trasladar el dispositivo calcinado a la estufa (Modelo “Heratherm Oven”, marca Thermo Scientific®) a una temperatura de 550 ± 50 °C durante 20 minutos.
3. Realizar paso 3 y 4 de la preparación del dispositivo de filtración y registrar como m₅.

Cálculos

$$SSV = \frac{m_4 - m_5}{V} \times 1\,000\,000 \quad (\text{Ec. 5})$$

*Donde:*SST = Sólidos suspendidos totales, en mg L⁻¹.m₄ = Peso del dispositivo después de la evaporación en mg.m₅ = Peso de la cápsula con el residuo, después de la evaporación en mg.

V = Volumen de la muestra en mL.

Demanda Química del Oxígeno

La DQO representa el contenido total de la materia orgánica presente en una muestra acuosa. El método de prueba de DQO es un proceso acelerado de la biodegradación, que suelen realizar naturalmente los microorganismos, por medio de la oxidación forzada con agentes oxidantes y métodos estándar. El método estándar utiliza el sulfato de plata (Ag₂SO₄) como catalizador en la oxidación de compuestos alifáticos lineales y sulfato de mercurio (HgSO₄) para inhibir haluros, principales interferencias en este tipo de métodos.

La determinación de DQO se realizó de acuerdo a la NMX-AA-030/2-SCFI-2011 por el método de reflujo cerrado o método espectrofotométrico [8]. Las muestras utilizadas fueron

las mencionadas con anterioridad, así como cada una de las pruebas realizadas y de cada uno de los ciclos del reactor biológico.

Soluciones y Materiales

Para el análisis se prepararon tres disoluciones principales. La primera fue la disolución estándar de biftalato de potasio ($C_8H_5KO_4$), para la que se pesaron 0.851 g de ($C_8H_5KO_4$) que posteriormente se secó a $120^\circ C$ durante 2 h. Una vez seco, se disolvió en agua y se aforó a 1 L en matraz volumétrico.

La segunda disolución preparada fue la de Ag_2SO_4 en H_2SO_4 . Se pesaron 15 g de Ag_2SO_4 y se disolvieron en 1 L de H_2SO_4 concentrado. Una vez preparada la solución, se dejó reposar durante 2 días para asegurar la completa disolución antes de ser utilizada.

Finalmente, se preparó la disolución digestora, pesando 10.216 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) que posteriormente se secó a $105^\circ C$ por 2 h. Una vez seco, se añadieron 500 mL de agua, 167 mL de H_2SO_4 concentrado y 33.300 g de $HgSO_4$, para posteriormente aforar la solución a 1L con agua destilada y empleando un matraz volumétrico.

Curva de calibración

Para elaborar la curva de calibración se realizaron en primer lugar los cálculos necesarios con la ecuación 4.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 6})$$

Con la finalidad de conocer los distintos volúmenes de cada dilución. La solución patrón se preparó a una concentración de 1000 mg L^{-1} , utilizando matraces volumétricos de 25 mL, y micropipetas de 10 mL para hacer las disoluciones. El procedimiento empleado para su preparación se presenta a continuación.

Procedimiento

1. Se colocó el volumen deseado de la solución patrón de $C_8H_5KO_4$ previamente preparada, en cada uno de los matraces de 25 mL.
2. Una vez que se colocó el volumen deseado de $C_8H_5KO_4$ se aforaron los matraces a 25 mL con agua destilada.
3. Posteriormente se colocaron 2.5 mL de cada matraz en cada uno de los tubos para digestión de 16 mm x 100 mm con tapa.
4. En la campana de gases, se añadió a cada uno de los tubos un volumen de 1.5 mL de la disolución digestora y 3.5 mL de la disolución de Ag_2SO_4 en H_2SO_4 .
5. Una vez adicionado el H_2SO_4 se tapó inmediatamente el tubo para evitar la volatilización de los compuestos orgánicos.
6. Los tubos preparados se colocaron en el digestor (Modelo “DRB 200”, Marca Hach®), previamente calentado a $150^\circ C$, durante 2 h.
7. Concluido este tiempo, se dejaron enfriar, para posteriormente medir la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro UV-vis (modelo “Lambda 365”, Marca Perkin Elmer®).

Cuantificación de DQO en las muestras.

Para determinar la concentración de DQO en cada una de las muestras a analizar, se empleó el procedimiento siguiente:

1. Se tomaron 2.5 mL de la muestra a analizar y se colocaron en los tubos para digestión de 16 mm x 100 mm con tapa.
2. Se repitió el procedimiento de la curva de calibración a partir del paso 4.

Proteínas

Método de Lowry

Es un método útil para la determinación de cantidades pequeñas de proteína en una disolución. Se basa en la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu y oxidación de la tirosina, triptófano, cisterna y cistina de las cadenas polipéptidas. En este proceso de óxido-reducción se forman quelatos de cobre por la transferencia de electrones de los grupos funcionales amino, por lo que se puede observar una coloración azul útil para su análisis colorimétrico [9].

Procedimiento:

1. Colocar 1 mL de la solución adecuadamente diluida en tubos de ensaye etiquetados, y tomando el tiempo adicionar 3 mL del reactivo C preparado recientemente [C: 50 mL de A y 2 de B (A: Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 2% y tartrato de sodio 0.02% en NaOH (hidróxido de sodio) 1M; B: Sulfato de cobre (CuSO_4) 0.5%)].
2. Después de 10 minutos adicionar a la mezcla 0.3 mL del reactivo D.
3. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Determinar la absorbancia del color azul a 750 nm en espectrofotómetro UV-vis (modelo "Lambda 365", Marca Perkin Elmer®) contra un blanco preparado de la misma manera con 1 mL de agua en lugar de la solución problema.
5. La concentración de la proteína se calcula a partir de una curva patrón preparada con albumina bovina sérica en concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tratadas de la misma manera con los reactivos.

Carbohidratos totales

Método del Fenol-Sulfúrico

La determinación de carbohidratos se realizó por medio del método de Dubois ó método Fenol-sulfúrico [10]. Debido a que los CH son sensibles a los ácidos fuertes y altas temperaturas, se realiza una hidrólisis ácida de oligosacáridos y polisacáridos para producir monosacáridos. Después se presentan una serie de reacciones complejas como la deshidratación simple hasta llegar a la formación de furanos y otros compuestos coloridos. La coloración de los monosacáridos se realiza por la condensación de compuesto fenólicos, por lo que es común la utilización de fenol, además, como no son reacciones estequiométricas las curvas de calibración son necesarias.

Procedimiento:

1. Se prepara una solución de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos queden en el intervalo de 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (rango del método).
2. Se etiquetan tubos de ensaye y se coloca 1 mL de la solución acuosa sobre la muestra.
3. Adicionar 0.5 mL de solución acuosa de Fenol al 5 % a cada tubo. Mezclar bien y después adicionar 3.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizar nuevamente.

Nota: Se debe realizar el procedimiento de manera secuencial, es decir terminar con un tubo antes de iniciar el siguiente.

4. Atemperar la mezcla aproximadamente 30 minutos y determinar la intensidad de color naranja en el colorímetro a 480 nm en espectrofotómetro UV-vis (modelo “Lambda 365”, Marca Perkin Elmer®) frente a un blanco preparado con agua de la misma forma.
5. Calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con el carbohidrato de interés en el intervalo del método (10-100 $\mu\text{g glucosa mL}^{-1}$), tratada de la misma forma que el problema.

Nitrógeno total

La determinación del NT se realizó siguiendo el método HACH 10072, por medio de una digestión con persulfato.

1. Se precalienta el digestor (Modelo “DRB 200”, Marca Hach®) a 105 °C
2. Se añade el sobre de reactivo de persulfato al tubo de digestión, y se adicionan 0.5 mL de la muestra.
3. Se tapa y agita por 30 segundos con ayuda de un vórtex.
4. Una vez que el digestor alcanzó su temperatura de 105 °C se colocan los tubos y se dejan por 30 min.
5. Una vez concluido el tiempo se retiran los tubos y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
6. Se adiciona el reactivo A de NT al tubo, se tapa y se agita por 30 s con ayuda de un vórtex, y se deja reaccionar por 3 min.
7. Pasado el tiempo se adiciona el reactivo B de NT, se tapa y agitas por 15 s, aquí la solución se tornará color amarillo, dejando reaccionar por 2 min.
8. Se toma una alícuota de 2 mL de este tubo de digestión y se adicionan al tubo NT Reagent C, agitamos 10 veces y se deja reaccionar 5 min.
9. Finalmente, transcurrido este tiempo se toma la lectura correspondiente en el espectrofotómetro UV-vis (modelo “Lambda 365”, Marca Perkin Elmer®).

3.4 Desarrollo del sistema de reacciones.

3.4.1 Diseño de experimentos para la codigestión en reactores tipo batch

Inicialmente se propuso un diseño experimental (Anexo 2) para identificar las variables de mayor significancia en los reactores. El primer factor se eligió el tipo de inóculo, el segundo factor corresponde a las mezclas en base a la relación C/N de ambos sustratos (SIL-SIC), utilizándose tres relaciones de codigestión (C/N 25, C/N 30 y C/N 35) y las dos relaciones de los sustratos puros (C/N 20 y C/N 50 para SIL y SIC respectivamente) y con mayor presencia las aguas residuales de cervecería, los porcentajes son presentados en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño de experimentos evaluados en reactores tipo batch.

Ronda	Relación	Sustrato		Inóculo	
	C/N	SIL	SIC	Granular	Composta
II	20	100%	0%	☉	☉
I	25	30%	70%	☉☉☉	☉☉☉
II	30	10.5%	89.5%	☉☉☉	☉☉☉
I	35	3%	97%	☉☉☉	☉☉☉
II	50	0%	100%	☉	☉

☉ Réplicas

3.4.2 Evaluación de reactores tipo Batch

La preparación de los reactores consistió en la preparación del medio de fermentación (SIC-SIL) en botellas serológicas de vidrio de 124 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 90 mL. La mezcla de sustrato fue inoculada a un 10 % w/v y para garantizar el crecimiento y adaptación de la comunidad microbiana se utilizó una solución nutritiva, conteniendo por cada litro la cantidad de: 0.050 g de NH₄Cl, 0.250 g de K₂HPO₄, 0.025 g de FeCl₂, 0.025 g de CoCl₂, 0.250 KH₂PO₄, 0.300 g de MgCl₂·H₂O y 0.016 g de NiSO₄ [12-13].

Después de la inoculación de los reactores batch se realizó el ajuste del pH a 5.5 con ácido clorhídrico (HCl) 1N y se garantizó el pH óptimo para el crecimiento de los microorganismos productores de bioH₂. Después se burbujeo cada reactor, con gas N₂ durante 10 segundos, con el fin de desplazar el oxígeno presente en el sistema. Por ultimo, los reactores se sellaron con tapones de inyección de caucho butilo y casquillos de aluminio para garantizar un ambiente anaerobio. Las reacciones se llevaron a cabo en una incubadora “MaxQ 400” de Thermo Scientific a condiciones en el diseño de experimentos y se mantuvo las variables fijas de temperatura (35 °C) y agitación (100 RPM). Para el caso de las codigestiones C/N 25 y 35 para el IG e IC se evaluó en la primera ronda experimental, mientras que las relaciones C/N 20, 30 y 50 fueron evaluadas en la segunda ronda experimental (Ronda 1, Figura 11). Con la ayuda de jeringas desechables, periódicamente se midió la producción de biogás, pH, DQO ST, SV y CH de cada uno de los reactores cada 4 h durante 32 horas que duró cada ronda experimental.

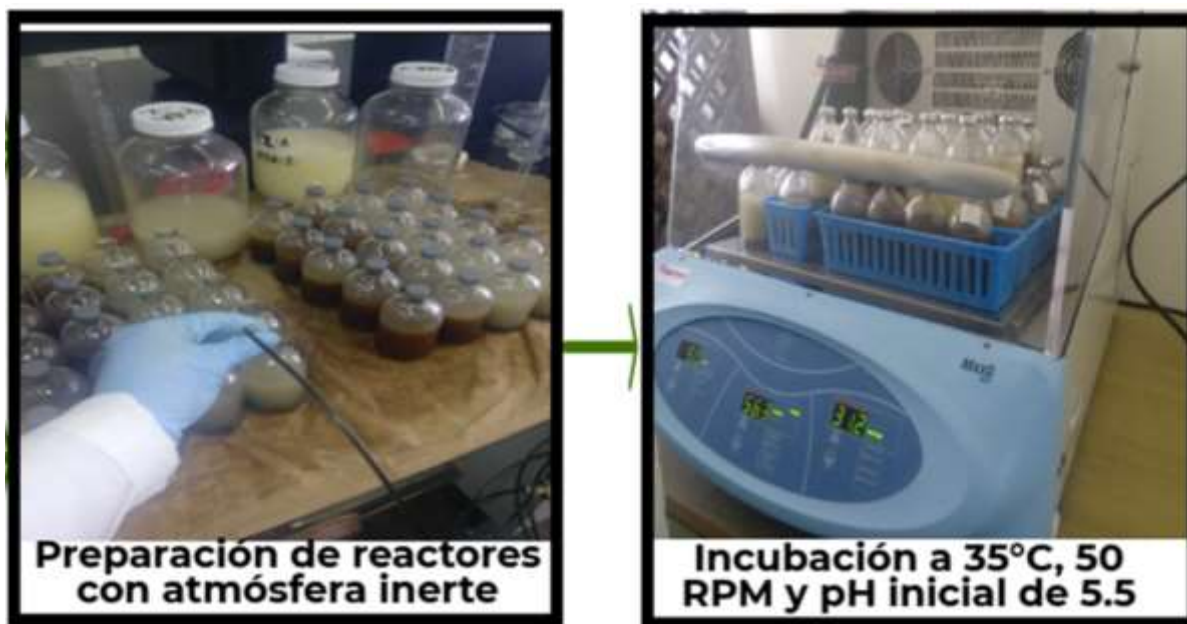


Figura 11. Preparación e incubación de los reactores en primera ronda experimental.

3.4.3 Construcción y evaluación de reactor continuo

Se construyeron un reactor anaerobio de flujo ascendente a partir de material acrílico, ambos con un volumen de trabajo de 2 L. La dimensión de cada reactor consistió en 2 piezas de 250 mm de altura y 88.8 mm de diámetro interno. La válvula de alimentación se localizó en la parte inferior del reactor mientras que la válvula de salida fue colocada 30 mm de la pieza superior del reactor y un dispositivo en forma de “L” que promovía el vórtice al interior del reactor 80 mm. Ambos reactores fueron ensamblados a mano y atornillados con la ayuda de una junta tórica. Posteriormente se realizaron las pruebas hidráulicas y neumáticas con la finalidad de detectar fugas. En las pruebas hidráulicas también fue evaluado el TRH. En cuanto a las condiciones iniciales se tomaron como referencia los resultados obtenidos en trabajos anteriores.

Cada reactor estaba equipado con un tanque de alimentación, una bomba peristáltica (Modelo “Daigger”, Marca Fisher Scientific®), medidor de pH (Modelo “Orion”, marca Thermo Scientific®) y cuantificación de gas por el método de la probeta invertida como se muestra en la Figura 12. Cada sistema de reacción fue inoculado con 200 mL de inóculo pretatado y 1800 mL de caldo fermentado. La temperatura del sistema de reacción se mantuvo a temperatura ambiente mientras el pH de los reactores fue observado entre 4.8 ± 0.21 a 5.15 ± 0.10 medido al efluente del reactor a partir del suministro de una solución de NaOH 5 N. Además, por cada litro de medio, se añadieron las siguientes cantidades de sales minerales similares a las utilizadas en los reactores batch. Después del periodo de aclimatación del inóculo se realizó la evaluación de la producción biogás y porcentaje de bioH₂, la remoción de la materia orgánica al inicio y final de cada ciclo de operación en cada TRH. La operación continua de los reactores se realizó utilizando un TRH de 3, 9 y 12 h. Cada reactor fue operado por 20 ciclos por cada TRH. El TRH se determinó a partir de la ecuación 7. Mientras que la VCO se determinó a partir de la ecuación 6.

$$TRH = \frac{Q}{V_r} \tag{Ec. 7}$$

Donde:

Q = Caudal de alimentación (L h⁻¹).

V_r = Volumen de trabajo del reactor (L).

Para determinar el caudal de alimentación se utilizó una probeta de 100 mL y un cronómetro con lo cual se tomó el tiempo en el cual la probeta era llenada completamente. Posteriormente se determinó el cociente de los 0.1 L entre el tiempo que tardó en llenarse. A partir de 3 observaciones se calculó un promedio el cual fue empleado dependiendo del TRH a utilizar en el experimento. En cuanto al volumen de trabajo del reactor se calculó a partir de la fórmula del volumen de un cilindro.

$$VCO = \frac{C_i}{TRH} \tag{Ec. 8}$$

Donde:

C_i = Concentración inicial de alimentación (g DQO L⁻¹).

TRH = Tiempo de retención hidráulica empleado (d⁻¹).

Los datos utilizados para el cálculo de la VCO, fueron utilizados a partir de las variables fijadas en la etapa en continuo. El TRH utilizado en el cálculo de la VCO fue dependiente del TRH a evaluar [12].

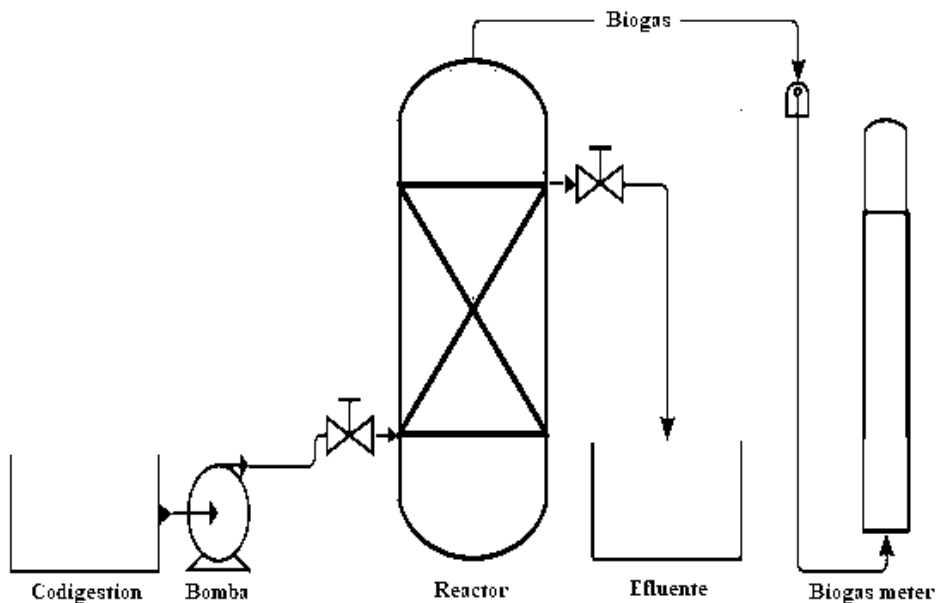


Figura 12. Diagrama de flujo del proceso del reactor de flujo ascendente.

3.4.4 Métodos analíticos para la evaluación de la codigestión

Durante la fase experimental se dio el seguimiento *in situ* de los parámetros fisicoquímicos de las diferentes relaciones C/N. Los parámetros principales analizados fueron: el pH, los ST, los SV, la DQO y los CH.

3.4.5 Análisis de bioH₂ y ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica empleada para la separación y análisis de compuestos volátiles no termosensibles. El principio físico se basa en la destilación de multicomponentes a partir de suministro de energía cuando se eleva la temperatura del horno. En el interior del horno se encuentra la columna encargada de la separación de los compuestos volátiles y esta separación dependerá de la fase móvil, por lo regular un gas acarreador inerte como el He, H₂, Ar, N₂, entre otros y la fase estacionaria que pueden ser capas microscópicas de líquidos o polímeros sobre un sólido inerte. Los compuestos en forma gaseosa interaccionan con la fase estacionaria de la columna provocando una retención de algunos compuestos que se ve reflejado en los diferentes tiempos de elución del compuesto (tiempo de retención) [11, 12]. El CG cuenta con diferentes tipos de detectores, a continuación, se presentan el fundamento de los utilizados en este trabajo.

Detector de conductividad térmica

El detector de conductividad térmica (TCD en inglés) es utilizado para el análisis de pequeños compuestos orgánicos y gases inorgánicos. Este detector mide y compara los valores de conductividad térmica del gas portador (gas de referencia) y la muestra. El He y el H₂ son los gases portadores que se emplea comúnmente, ya que estos gases presentan diferencia en sus conductividades térmicas en comparación con la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos.

El TCD consta de unos cables calentados eléctricamente, que, al presentar cambios en la temperatura, son afectados por la conductividad térmica del gas que fluye a su alrededor, tal como se muestra en la Figura 13a, provocando cambios en la conductividad térmica, los cuales se detectan como un cambio en la resistencia eléctrica y finalmente son medidos por el detector [14].

Detector de ionización de flama

El detector de ionización de flama (FID en inglés) es utilizado para el análisis de la mayoría de los compuestos orgánicos, es comúnmente utilizado por su rápida respuesta y por presentar límites de detección bajos, a pesar de ser extremadamente sensible, presenta la desventaja de destruir la muestra. Este detector consta de una flama de aire-hidrógeno, en la cual pasa el efluente de la columna del GC, descomponiendo las moléculas orgánicas y de esta manera producir iones. Estos iones se recogen en un electrodo polarizado produciendo una señal eléctrica, la cual es el resultado de la combustión de los compuestos orgánicos (Figura 13b) [14].

Preparación y análisis de muestras para gases permanentes.

Para la cuantificación de la composición del biogás durante la codigestión, ésta se realizó en un cromatógrafo de gases (Modelo 7820 A, marca Agilent technologies®) equipado con un detector TCD. Los gases permanentes fueron analizados en una columna capilar de sílice fundida Carboxen 1006 (3 m x 0.53 mm) marca Supelco® con el uso de Argón como gas acarreador. El horno del cromatógrafo se mantuvo a 40 °C y la temperatura del inyector y analizador se fijó a 230 °C [11]. Las muestras para la determinación de gases permanentes fueron obtenidas a partir de la extracción manual del biogás al interior del reactor con la ayuda de una jeringa de vidrio de 1 mL. Posteriormente la muestra de biogás fue inyectada en el puerto de inyección de forma manual. Para la calibración de gases permanentes se utilizó estándar de INFRA® con mezclas de gases como H₂, N₂, CH₄, monóxido de carbono (CO) y CO₂.

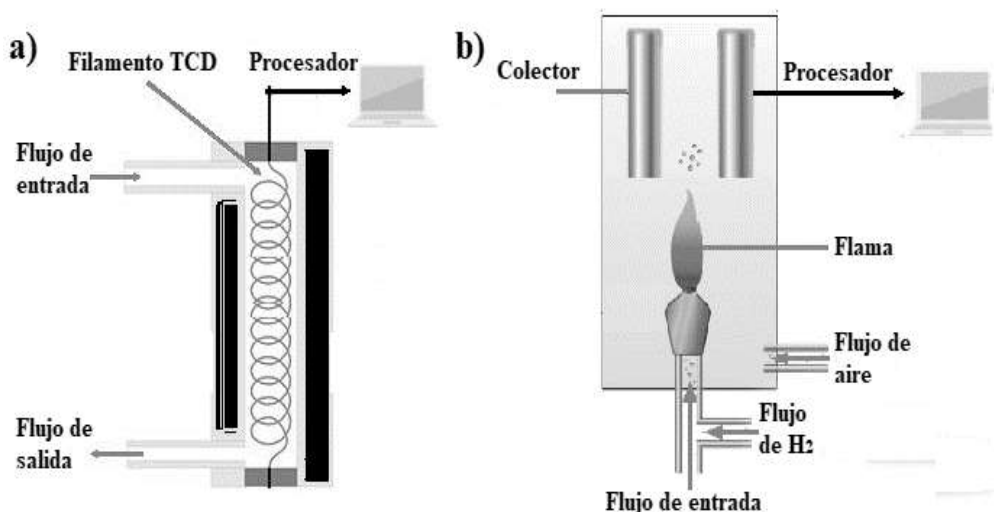


Figura 13. Detectores para cromatógrafo de gases, a) detector de conductividad térmica (TCD), b) detector de ionización de flama (FID).

Preparación y análisis de muestras para ácidos grasos volátiles

Para la determinación de los AGV's se utilizó un cromatógrafo de gases (Modelo 7820 A, marca Agilent technologies®) equipado con un detector FID, una columna HP- Inowax (50 m x 0.20 mm x 0.4 µm de espesor de película) y argón como gas de acarreador. Para condiciones de temperatura, se estableció una rampa de calentamiento en el horno de 70 °C a 180 °C y velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹. La temperatura del puerto de inyección y la temperatura del analizador se estableció a 250 °C. Se realizó las curvas de calibración para los gases permanentes y los AGV's en el cromatógrafo de gases tal como se muestra a continuación [2].

La preparación de las muestras de AGV's primeramente fueron centrifugadas a 10,000 RPM durante 1 minuto en centrífuga (Modelo "Sorvall ST 16/16R", marca Thermo Scientific®). Posteriormente el sobrenadante fue filtrado con la ayuda de una jeringa y acrodiscos con tamaño de poro de 0.5 μm . Finalmente, el líquido filtrado fue depositado y sellado en viales de 2 mL y colocados en un automuestreador del equipo, quien inyectaba automáticamente 2 μL de la muestra para el análisis.

3.5 Extracción e identificación de las especies microbianas

Para conocer las comunidades microbiológicas presentes en la codigestión (SIL-SIC) y partiendo de dos diferentes fuentes de inóculo (IG e IC), se analizó las especies microbianas del inóculo inicial y el cambio en la estructura microbiológica a tiempos 4, 8 y 24 h del proceso de producción de bioH₂, con la secuenciación Illumina MiSeq. La extracción de ADN consistió en extraer 0.25 g de muestra con el kit QLAGEN como lo señala el manual de operación. La porción de muestra se introdujo en un tubo con perlas y fue centrifugado a 10,000 XG durante 2 minutos, hasta obtener el sobrenadante; después, el sobrenadante fue extraído y centrifugado hasta eliminar cualquier suspensión. El procedimiento también contempló la filtración de la muestra con una columna especial de filtrado, el procedimiento completo se puede visualizar en la Figura 14. Las muestras con el ADN se enviaron debidamente identificadas al Research and Testing Laboratory (RTL de Texas, USA), para la amplificación del ADN del gen 16 ARNr. Los datos se analizaron de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el manual de RTL [15].

Se utilizó el algoritmo USEARCH y el software UCHIME para eliminar las quimeras, las secuencias cortas y únicas y el ruido. A continuación, se seleccionaron las secuencias con una longitud igual o superior a 2050 pb y una puntuación de calidad igual o superior a 30. Se seleccionaron las unidades taxonómicas operativas (OTU en inglés) utilizando el algoritmo UPARSE [16, 17].

La secuencia multiplexada y filtrada (2 iteraciones) se agrupó en OTU's óptimas con un umbral de similitud de secuencias del 97% con el método MUSCLE.

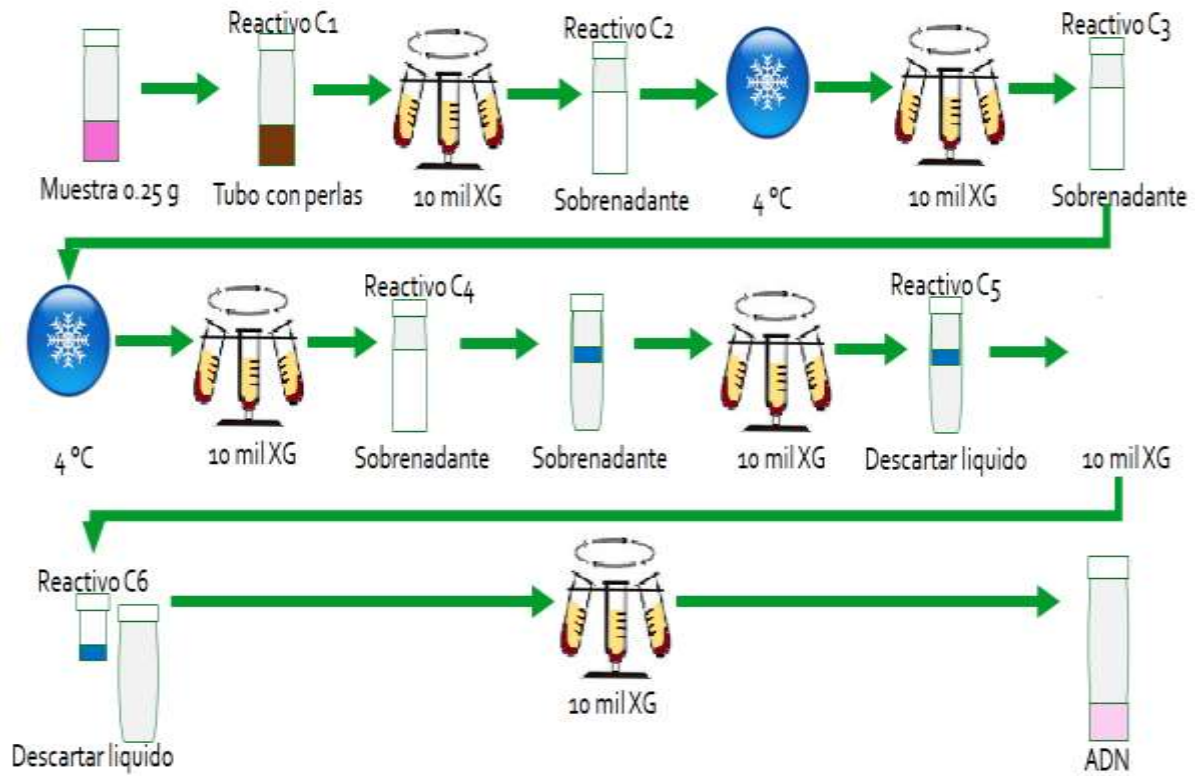


Figura 14. Procedimiento de obtención del ADN en reactores batch a partir de las codigestiones.

3.6 Análisis cinético de las reacciones en batch

3.6.1 Modelo de Gompertz simple

El análisis cinético de las reacciones en la producción de bioH₂ se da a partir de dos modelos principales, el modelo cinético de la ecuación modificada de Gompertz y el modelo logístico, ecuación 9 [18]. Ambos son utilizados para explicar los datos experimentales obtenidos en la evaluación batch a partir de la producción acumulada de bioH₂ [13].

$$H = H_m * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m * e}{H_m} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde:

H = producción de bioH₂ acumulado en mL.

R_m = máxima tasa de producción de bioH₂ en mL H₂ L⁻¹ h⁻¹

λ = tiempo de la fase de latencia en h.

t = tiempo de cultivo en h.

H_m = máxima producción de bioH₂ en mL H₂.

e = constante de Euler de 2.718.

3.6.2 Modelo Gompertz doble

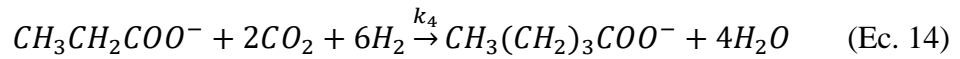
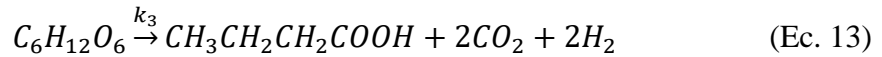
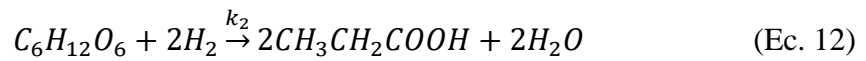
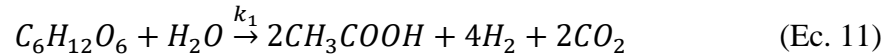
Numerosos trabajos han demostrado la utilidad del modelo Gompertz cuando se trata de una sola etapa de producción de bioH₂. Sin embargo, en este estudio se observó que todas las codigestiones evaluadas presentaron dos etapas de producción de bioH₂ [19]. Por lo tanto, se propuso utilizar el modelo de Gompertz y el modelo Logístico doble, tal como se muestra en la ecuación 10, posteriormente se realizó la comparación entre ambos modelos. Los parámetros del modelo tienen el mismo significado de la ecuación 8 y 9, la diferencia subyace en los subíndices, el subíndice 1 se refiere a los parámetros cinéticos de la primera etapa mientras que los subíndices 2 a los parámetros cinéticos de la segunda etapa del proceso de fermentación.

$$H = H_{m1} * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{m1} * e}{H_{m1}} (\lambda_1 - t) + 1 \right] \right\} \\ + H_{m2} * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{m2} * e}{H_{m2}} (\lambda_2 - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ec. 10})$$

Finalmente, los parámetros cinéticos fueron determinados a partir de la mejor curva de acumulación de bioH₂ utilizando la función Solver en Microsoft® Excel versión 10.

3.7 Cálculos de Equilibrio químico

Es bien sabido que la FO es un proceso que engloba numerosas rutas bioquímicas que se dividen en reacciones anabólicas y catabólicas [20]. A partir de estas reacciones la materia orgánica es transformada en bioH₂ y AGV's que determinan el comportamiento dinámico de las especies en la fermentación [21, 22]. En busca de conocer la dinámica de las reacciones en la FO, se vuelve de utilidad establecer el balance de materia y energía para demostrar el equilibrio de las reacciones y predecir el sentido de la reacción [23]. Para efectos prácticos, en el presente trabajo se propone el uso de 4 de las principales rutas metabólicas de la FO. La ruta acética (Ec. 11), la ruta propiónica (Ec. 12), la ruta butírica (Ec. 13) y la ruta valérica (Ec. 14), fueron los balances de masa propuestos y se determinó en base a la DQO.



Para la determinación de los constantes de equilibrio experimentales se utilizó la ecuación de la constante de equilibrio representada en la ecuación 15 y de esta manera demostrar el comportamiento dinámico de las reacciones en el interior del reactor [24].

$$k = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (\text{Ec. 15})$$

3.7 Referencias

- [1] Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 Análisis de agua - Muestreo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.
- [2] APHA A. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation; 2005.
- [3] Reyna L. M., Cruz A., Molina C. E., Alfaro J. M., Suárez S. I., Robledo A. Effect of Carbon/Nitrogen Ratio, Temperature, and Inoculum Source on Hydrogen Production from Dark Codigestion of Fruit Peels and Sewage Sludge. *Sustainability*; 2019; 11(7): 2139. <https://doi.org/10.3390/su11072139>.
- [4] Norma Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2016 Análisis de agua- Medición de pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 9 de septiembre de 2016.
- [5] NMX-AA-012-SCFI-2001 Análisis de agua - Determinación de oxígeno disuelto en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de marzo de 2001.
- [6] Norma Mexicana NMX-AA-036-SCFI-2001 Análisis de agua - Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de agosto de 2001.
- [7] Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015 Análisis de agua - Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de marzo de 2016.
- [8] Norma mexicana NMX-AA-030/2-SCFI-2011 Análisis de agua - Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba - parte 2 - determinación del índice de la demanda química de oxígeno – Método de tubo sellado a pequeña escala, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de junio de 2013.
- [9] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*; 1951; 193: 263-275.
- [10] DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*; 1956; 28(3): 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- [11] Pecina-Chacón D. E. Evaluación de las variaciones de pH en la fermentación oscura de celulosa para la producción de hidrógeno como fuente alterna de energía. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias (2016). Instituto de ingeniería civil, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
- [12] Gómez-Romero J. Producción de biohidrógeno por co-digestión de lactosuero y residuos sólidos orgánicos en sistemas en lote y continuo. Tesis para obtener grado de doctor en ciencias (2015). Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México, Distrito Federal.
- [13] Gomez-Romero J., Gonzalez-Garcia A., Chairez I., Torres L., García-Peña E. I. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co- digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(24): 12541–12550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>.

- [14] Hussain, C. M., & Keçili, R. (2020a). Separation techniques for environmental analysis. *Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutants*, 163-198. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816934-6.00007-2>
- [15] García-Depraect O., Valdez-Vázquez I., Rene E. R., Gómez-Romero J., López-López A., León-Becerril E. Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark cofermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol*; 2019; 282: 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>.
- [16] González-Pabón, M. J., Cardeña, R., Cortón, E., & Buitrón, G. Hydrogen production in two-chamber MEC using a low-cost and biodegradable poly(vinyl) alcohol/chitosan membrane. *Bioresour. Technol*; 2021; 319, 124168. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124168>.
- [17] Rosero-Chasoy, G., Rodríguez-Jasso, R. M., Aguilar, C. N., Buitrón, G., Chairez, I., & Ruiz, H. A. Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation – an overview. *Bioresour. Technol*; 2021; 321, 124458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124458>.
- [18] Basak, B., Fatima, A., Jeon, B.-H., Ganguly, A., Chatterjee, P. K., & Dey, A. Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. *Energy Sustain. Dev*; 2018; 47: 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.08.004>.
- [19] De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., & Spiga, D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2014; 39(36): 20930-20941. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>.
- [20] Castelló E., Nunes-Ferraz-Jr A. D., Andreani C., Anzola-Rojas M. P., Borzacconi L., Buitrón G., Carrillo-Reyes J., Gomes S. D., Maintinguer S. I., Moreno-Andrade I., Palomo-Briones P., Razo-Flores E., Schiappacasse-Dasati M., Tapia-Venegas E., Valdez-Vázquez I., Vesga-Baron A., Zaiat M., Etchebehere C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew. Sust. Energ. Rev*; 2019; 119, 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- [21] Saady, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy*; 2013; 38, 13172-13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.
- [22] Boboescu I. Z., Ilie M., Gherman D. V., Mirel I., Pap B., Negrea A., Kondorosi É, Bíró T. and Maróti G. Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate. *Biotechnol. Biofuels*; 2014; 7, 139. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0139-1>.
- [23] Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Trably, E., Carrere, H., & Lyberatos, G. Continuous biohydrogen production from a food industry waste: Influence of operational parameters and microbial community analysis. *J. Clean. Prod*; 2018; 174, 1054-1063. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.078>.
- [24] Bose, S. Fundamental concepts. *High Temperature Coatings*, 5-16. (2007). <https://doi.org/10.1016/b978-075068252-7/50003-2>.

CAPÍTULO 4

Resultados y discusión

Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados más relevantes obtenidos de la etapa experimental. En principio se muestra la caracterización fisicoquímica de las aguas residuales de cervecería y de lácteos. Para la evaluación de la codigestión fue necesario formular un diseño de experimentos tipo Plackett Burman considerado como parámetros el tipo de inóculo y la relación C/N (véase anexo 2). A partir de allí, se realizó la evaluación de la codigestión entre ambos sustratos (SIL-SIC) en relaciones C/N=25, 30 y 35 además de las monodigestiones C/N=20 (SIC) y C/N=50 (SIL), por 32 h en micro-reactores empleando dos fuentes de inóculos (IC e IG), como se describe en la parte experimental. Además del correspondiente análisis fisicoquímico de las fuentes de inóculo (IC y IG) en los diferentes tiempos de reacción. En la siguiente etapa se homologó propiedades físicas y químicas de la serie de experimentos con mejores resultados en la tasa producción (modelo de Gompertz), productividad y velocidad de producción de bioH₂ (micro-reactor). Sin embargo, para esta serie de experimentos en reactor de flujos ascendente (UASB) a pH=5.5 (entrada y salida del reactor) empleando lodos IG como fuente de inóculo. A partir de los resultados obtenidos del producto y subproductos de la reacción se realizó un análisis termodinámico para evidenciar la secuencia de las reacciones bioquímicas presentes.

4.1 Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales

4.1.1 Potencial de los cosustratos para la producción de biohidrógeno

En las Tablas 5 y 6 se presenta las características generales de los sustratos empleados durante el desarrollo de este trabajo. En el caso del SIC (Tabla 5) los parámetros que presentaron mayor variación fueron, la DQO y el NK, la DQO de 4 a 14 g L⁻¹ y el NK de 83 a 390 mg L⁻¹, consistentes con lo reportado en la literatura [1]. Es probable que estas variaciones en la cantidad de compuestos biodegradables dependan de la etapa del proceso en que se encontraba la planta al momento de realizarse el muestreo. Por ejemplo, la filtración, descarga o limpieza de equipos y contenedores, etcétera [2]. Por otro lado, el SIL se trata de un subproducto en la fabricación del queso, la caracterización fisicoquímica (Tabla 6) revela un sustrato homogéneo con respecto al tiempo, sin embargo, en este caso la DQO y los CH fueron los parámetros con mayor variación con rangos de 32-53 g L⁻¹ y 80 a 128 g L⁻¹, respectivamente. Lo anterior se podría explicar por la alta concentración del suero que demanda varios lavados para la inocuidad del producto. De allí que los parámetros mantuvieron una tendencia similar entre cada muestreo y rangos semejantes a otros estudios reportados [3, 4].

En codigestión, ambos sustratos se ajustan a un pH de 5.5, además la ventaja que la concentración de CH en el SIC fue más del doble que el SIL mientras que la concentración de NT fue siempre mayor en este último sustrato. Entonces, fue posible favorecer el diseño de las mezclas de codigestiones en el intervalo $20 \geq C/N \leq 40$ para la FO [3, 4]. Otra característica importante es la DQO, donde el SIL supera 10 veces más el contenido de materia orgánica respecto al SIC. Los CH de SIL son aproximadamente 9 veces más que SIC, considerando la relación que existe entre la descarga anual de cada sustrato en México FAO, es posible asegurar que la mezcla de ambos sustratos resulta atractiva para el proceso de FO

[5, 6]. Finalmente, ambos sustratos en codigestión permitieron obtener la concentración de 10 ± 3 g DQO L⁻¹ y la relación C/N = 35 y ajuste del pH 5.0 ± 1 en los microrreactores y reactor UASB.

Tabla 5. Resultados de la caracterización fisicoquímica de aguas residuales (SIC).

Características	Sustrato Industrial de Cervecería				
	30/08/2018	01/10/2020	14/01/2019	13/02/2019	28/05/2019
pH	7.26±0.19	5.12±0.10	6.21±0.06	6.70±0.16	5.84±0.12
NK (g L ⁻¹)	0.184±0.00	0.390±0.00	0.083±0.00	0.260±0.00	0.126±0.00
ST (g L ⁻¹)	6.29±0.08	2.36±0.05	4.61±0.01	7.24±0.42	1.81±0.03
SV (g L ⁻¹)	5.99±0.03	2.16±0.02	4.31±0.01	6.04±0.34	1.59±0.01
DQO (g L ⁻¹)	10.93±0.43	4.83±0.49	8.39±0.54	14.07±0.04	3.84±0.28
CH (g L ⁻¹)	5.85±0.58	0.92±0.07	4.22±0.10	7.62±0.52	1.24±0.34
Alk (gCaCO ₃ L ⁻¹)	0.25±0.03	0.08±0.01	0.08±0.01	0.25±0.03	0.08±0.01
Densidad (g L ⁻¹)	1.01±0.00	1.00±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00	1.01±0.01

Tabla 6. Resultados de la caracterización fisicoquímica del suero de queso (SIL).

Características	Sustrato Industrial de Lactosuero				
	26/11/2018	14/01/2019	13/02/2019	27/05/2019	02/08/2019
pH	6.34±0.18	6.19±0.04	6.41±0.05	6.30±0.01	6.35±0.02
NK (g L ⁻¹)	1.32±0.00	1.55±0.00	1.44±0.00	1.33±0.00	1.514±0.00
ST (g L ⁻¹)	65.49±0.16	67.88±0.34	63.22±1.79	64.57±0.83	64.65±1.83
SV (g L ⁻¹)	60.24±0.12	62.82±0.51	57.87±1.77	59.47±0.78	58.77±1.80
DQO (g L ⁻¹)	80.67±7.85	97.10±7.79	81.40±6.68	128.56±1.86	88.98±7.79
CH (g L ⁻¹)	53.25±0.51	37.87±1.12	48.31±5.78	32.24±0.42	33.19±2.84
Alk (gCaCO ₃ L ⁻¹)	1.19±0.03	1.22±0.04	1.22±0.04	1.27±0.16	1.21±0.04
Densidad (g L ⁻¹)	1.03±0.00	1.02±0.00	1.03±0.00	1.02±0.00	1.03±0.00

4.2 Efecto de la relación C/N en microrreactores batch

4.2.1 Efecto de la relación C/N sobre el pH

La Figura 15 muestra el perfil de desempeño del pH de las diferentes relaciones C/N, correspondientes a la codigestión SIL-SIC ($C/N = 25$, $C/N = 30$ y $C/N = 35$) y los sustratos individuales ($C/N = 50$ y $C/N = 20$), donde se utilizó IG a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 RPM durante 32 h. También se observó que la relación C/N 35 registró un aumento de pH del 5 % en las primeras 4 h de monitoreo, sin embargo, a las 8 h de reacción inicio un descenso del pH hasta 5, mismo que se mantuvo hasta las 32 h por encima de 4.5. Por otro lado, la C/N 30 y C/N 25 mantuvieron una tendencia similar, aunque a las 8 h el pH ya había disminuido a menos de pH = 5 y a las 32 h el pH registró un valor por debajo de pH 4.

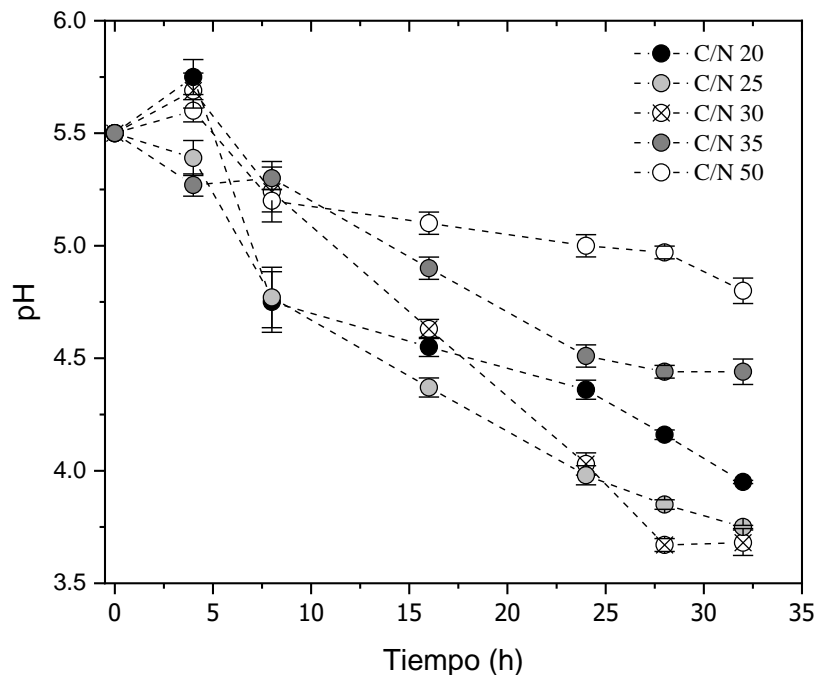


Figura 15. Evolución del pH respecto al tiempo durante la FO a partir de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N a pH inicial 5.5, $T=35^{\circ}\text{C}$ y utilizando inóculo IG.

En el caso de los sustratos puros ($C/N = 20$ y $C/N = 50$) su comportamiento fue similar a las demás codigestiones SIL-SIC. Sin embargo, después de 32 h, los valores de pH se encontraban para la $C/N = 20$ a $\text{pH} = 4$, mientras que la relación $C/N = 50$ los procesos bioquímicos fueron más lentos registrando un pH cercano a 5. Del análisis anterior es evidente que el sustrato con relación $C/N = 50$ presenta la mayor estabilidad seguido por las mezclas de codigestión SIL-SIC ($C/N = 35 > C/N = 30 > C/N = 25$) y finalmente el sustrato $C/N = 20$. Aunque es ampliamente reportado que la acidificación de los microrreactores está asociada con la adaptación de los consorcios microbianos en la etapa acidogénesis de la FO [5, 6]. Esto indica que las variaciones en el pH son el resultado de la producción de AGV's en la FO. Por lo tanto, este tema será abordado a detalle en la sección 4.2.4.

También es importante destacar las variaciones observadas para la $C/N = 35$ después de donde se presentó el aumento del pH después de las 24 h. Es probable que la presencia de bacterias consumidoras de productos ácidos haya incrementado el pH. Algo similar proponen Gadhamshetty *et al.*, [7] quienes demostraron que el aumento del pH fue causado por la presencia de microorganismos consumidores de productos ácidos finales. Contrario a lo observado por Gómez-Romero *et al.*, [8], quien concluyó que las proteínas pueden transformarse en amoníaco libre quien aporta alcalinidad al reactor lo que aumenta el pH.

4.2.2 Efecto de la relación C/N en la remoción de carga orgánica

En la Figura 16 se la evolución de los CH para las codigestiones y monodigestiones (SIL-SIC) con diferentes relaciones C/N. Para la relación $C/N = 35$ presenta la mayor remoción en carbohidratos, es decir, un 97% en el intervalo de estudio. Sin embargo, para la relación $C/N = 25$, se mantuvo las tendencias anteriores, pero registrando un 28% menos de remoción respecto al caso anterior. La fermentación de los sustratos individuales fueron los que menor porcentaje de remoción presentaron. Aunque, el sustrato con $C/N = 50$ presentó el doble de la remoción lograda por respecto a la relación $C/N = 20$. Es evidente que las condiciones fisicoquímicas obtenidas por la codigestión SIL-SIC favorecieron el crecimiento del consorcio microbiano, facilitando el proceso de FO. En el caso de los reactores que solo contenían los sustratos puros, la actividad microbiana fue inhibida. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros estudios donde establecen un intervalo de relación C/N ($20 < C/N < 40$) para favorecer la producción de bioH_2 [9-11].

A partir del análisis bibliográfico Basak *et al.*, [11] reportaron que la DQO presentó remociones de hasta 40% cuando mezcló residuos de vegetales y frutas con residuos de queso Cottage. En contraste, García-Depraect *et al.*, [12] obtuvo un máximo de 27.5% de remoción de DQO y que este porcentaje favorece la producción de bioH_2 cuando se empleó la misma mezcla. Este resultado coincide con lo reportado por Tenca *et al.*, [13] quienes estudiaron la codigestión entre residuos de vegetales y frutas con estiércol de cerdo y encontraron que la mayor producción y tasa de producción se encontraron a una remoción de la DQO entre el 20% y 30%. Esto demuestra que la remoción de la materia orgánica no solo dependerá de la codigestión entre sustratos sino también de la correcta relación de nutrientes que cada uno aporte y que se puede balancear con la relación C/N [2, 14].

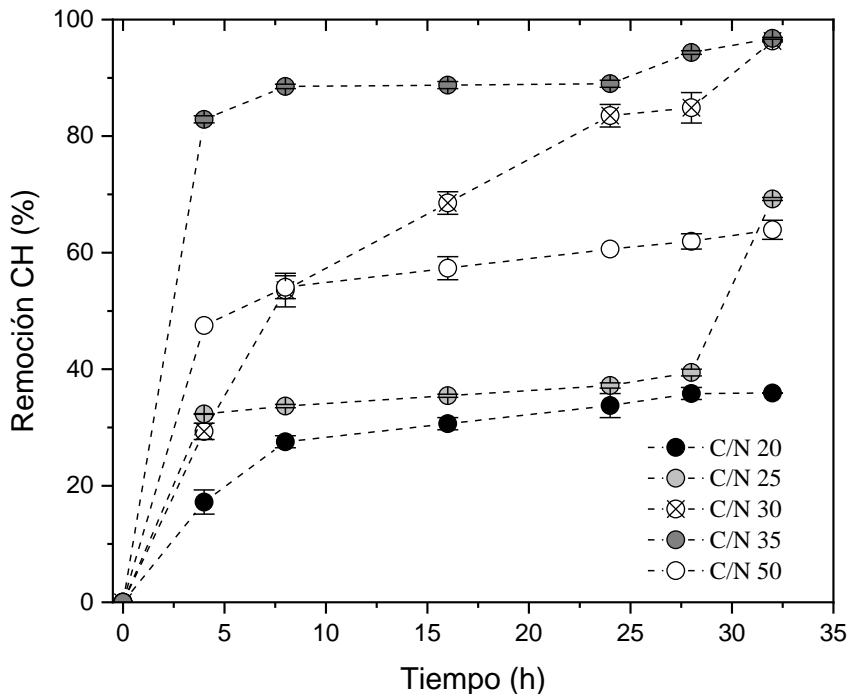


Figura 16. Perfil de remoción de carbohidratos respecto al tiempo durante la FO a partir de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N. pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.

En la Tabla 7 se encuentran los porcentajes de remoción de la carga orgánica representados por la DQO, carbohidratos, ST y SV. La DQO de las codigestiones SIL-SIC fue 24.32% (C/N=35), 51.68% (C/N=30) y 36.16 (C/N=25) lo que implica que el sustrato SIL tiene un mayor contenido de materia difícil de oxidar 9.34% (C/N =20) < 40.33 (C/N = 50). La remoción de los ST mantuvo un comportamiento similar a la remoción de la DQO y carbohidratos.

Tabla 7. Porcentaje promedio de la remoción de carga orgánica durante la FO a partir de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N. pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.

Sustrato	C/N	Inóculo	Porcentaje de remoción			
			CH	DQO	ST	SV
SIL	20	Granular	35.91±8.28	9.34±0.69	28.63±0.13	31.05±0.12
SIC-SIL	25	Granular	69.21±4.04	36.16±1.00	39.00±1.22	44.19±0.00
SIC-SIL	30	Granular	96.33±1.67	51.68±2.11	41.28±0.00	53.61±0.23
SIC-SIL	35	Granular	96.79±0.70	24.32±4.60	50.44±3.21	68.53±3.20
SIC	50	Granular	63.91±1.30	40.33±1.05	23.90±0.10	38.61±0.23

Es decir, la remoción más alta de los ST se obtuvo a una C/N = 35 y, en las primeras 8 horas disminuyó alrededor del 20% de los ST. Para la relación C/N = 25 la transformación de los ST cayó significativamente, alrededor del 22% afectando directamente la producción de

bioH₂. De hecho, Ghimire *et al.*, [15] quien evaluó la influencia del contenido de sólidos en la codigestión entre paja de trigo y residuos de comida, afirma que un alto contenido de sólidos, arriba del 15% puede detener la producción de bioH₂ y promueve la producción de ácido láctico, principal metabolito consumidor de bioH₂ [16,17]. Finalmente, los SV muestran mayores porcentajes de remoción en las codigestiones.

4.2.3 Efecto de la relación C/N en la producción de bioH₂

En la Figura 17 se presenta la acumulación de bioH₂ para los experimentos a diferentes relaciones C/N a 35 °C, 100 RPM y utilizando IG como inóculo. La máxima acumulación de bioH₂ se alcanzó con la relación C/N = 35 con un valor de 220 ± 14 mL H₂ y rendimiento máximo de 60 ± 2 mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹, aunque el 50% de la producción de bioH₂ se registró a las primeras 8 h de montarse el experimento. Posteriormente hubo un periodo de relajación posiblemente por la saturación de bioH₂ en el reactor que se extendió hasta las 24 h cuando se volvió a retirar el biogás. Este periodo de relajación posiblemente se deba al aumento de la P_{H2} que puede inhibir algunas rutas metabólicas y afectar la actividad de los microorganismos productores de bioH₂ [17, 18]. A partir de las 28 h, se registró un aumento en la producción de bioH₂ cercano al 50%.

En la relación C/N 30, las primeras 8 horas la acumulación de bioH₂ era solo un 20% de la acumulación total, sin embargo, la acumulación de bioH₂ continuó aumentando de forma lineal hasta alcanzar un máximo de 121 mL H₂ L⁻¹ y rendimiento máximo de 9 ± 0.6 mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹. El comportamiento del experimento C/N = 25 fue casi idéntico a la relación C/N = 35, aunque las últimas 8 horas la producción de bioH₂ cayó y solo alcanzó un máximo de 175 mL H₂ L⁻¹ y 7 ± 0.5 mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹ de rendimiento. Con respecto a los sustratos individuales (C/N = 20 y C/N = 50) aproximadamente el 50% de la acumulación total se registró en las primeras 8 h y al término del experimento la acumulación fue muy similar para ambos sustratos, alrededor de 90 mL H₂ L⁻¹ y rendimiento máximo de 18 y 13 mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹, respectivamente. La mitad de la producción de bioH₂ en las primeras 8 horas de monitoreo está íntimamente involucrado con la mayor variación del pH, es decir, cuando el pH se mantuvo por encima de pH 4.5 la producción de bioH₂. Es probable que este comportamiento este asociado a la evolución de la actividad microbiana en los microreactores. Finalmente, la selectividad hacia bioH₂ con el IG mantuvo una dependencia con la codigestión empleada, es decir, para el micro-reactor con relación C/N = 35 se presentó un porcentaje de bioH₂ hasta 49 %, mientras que para la C/N = 25 el porcentaje máximo fue de 36 %. Es importante mencionar que además del monitoreo de la fermentación de los sustratos individuales con los inóculos IG e IC, también se evaluaron los sustratos sin inóculo, sin embargo, no se logró observar la producción de bioH₂ (resultados no mostrados).

Respecto al rendimiento de bioH₂ de la C/N = 35 fue de 43.62 mL H₂ g SV⁻¹, este valor resulto un mejor rendimiento comparado con otros estudios, tal como Tena *et al.*, [18] quienes obtuvieron un rendimiento de 43.25 mL H₂ g SV⁻¹ a partir de la codigestión entre lodos depurados y vinazas de la producción de vino. Sin embargo, García-Depraect *et al.*, [12] reportaron un rendimiento de 115 mL H₂ g VS⁻¹ a partir de la codigestión entre vinazas y *nejayote*, lo cual es mayor que lo reportado en este estudio, posiblemente este resultado es consecuencia de la alta biodegradabilidad de las vinazas. No obstante, estos hallazgos

muestran que la codigestión mejora considerablemente la FO por el increment de la producción de bioH₂.

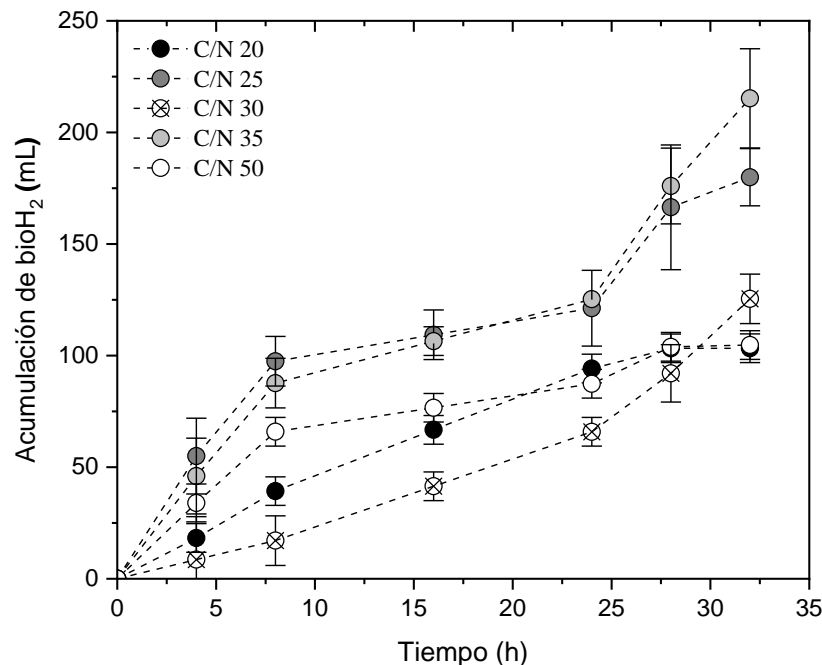


Figura 17. Acumulación de bioH₂ respecto al tiempo durante la FO para la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N. pH inicial 5.5, T=35°C y utilizando inóculo IG.

4.2.4 Efecto de relación C/N en la acumulación de los ácidos orgánicos

En la Figura 18 se muestra la producción de bioH₂ y la acumulación de los principales AGV's durante la FO para las codigestiones SIL-SIC con relaciones C/N =35 y C/N = 25, para ambos casos los metabolitos dominantes son el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico principalmente y en ningún caso se observó la presencia de ácido valérico.

Para la codigestión SIL-SIC con relación C/N = 35 los resultados cromatográficos indicaron durante las 32 h que la producción de ácido acético fue de 227 mg L⁻¹, seguido del ácido propiónico con 168 mg L⁻¹ y solo 104 mg L⁻¹ de ácido butírico (véase Figura 18a). Por otra parte, hay que destacar, que para la codigestión SIL-SIC con relación C/N = 25 (Figura 18b), la ruta predominante fue la del ácido propiónico (ruta conocida por el consumo de bioH₂: Ec. 12) con 121 mg L⁻¹, seguido del ácido acético con 30 mg L⁻¹ y el ácido butírico con 5 mg L⁻¹. Sin embargo, de acuerdo a Jun Yin *et al.*, [19, 20], cuando el coeficiente entre ácido acético/ácido butírico (A/B) es mayor a la unidad, la producción de bioH₂ es favorable. Esto demuestra que para la C/N = 35 la ruta predominante fue la acética y que además se mantuvo la relación A/B por encima de la unidad, indicando una mejor producción de bioH₂.

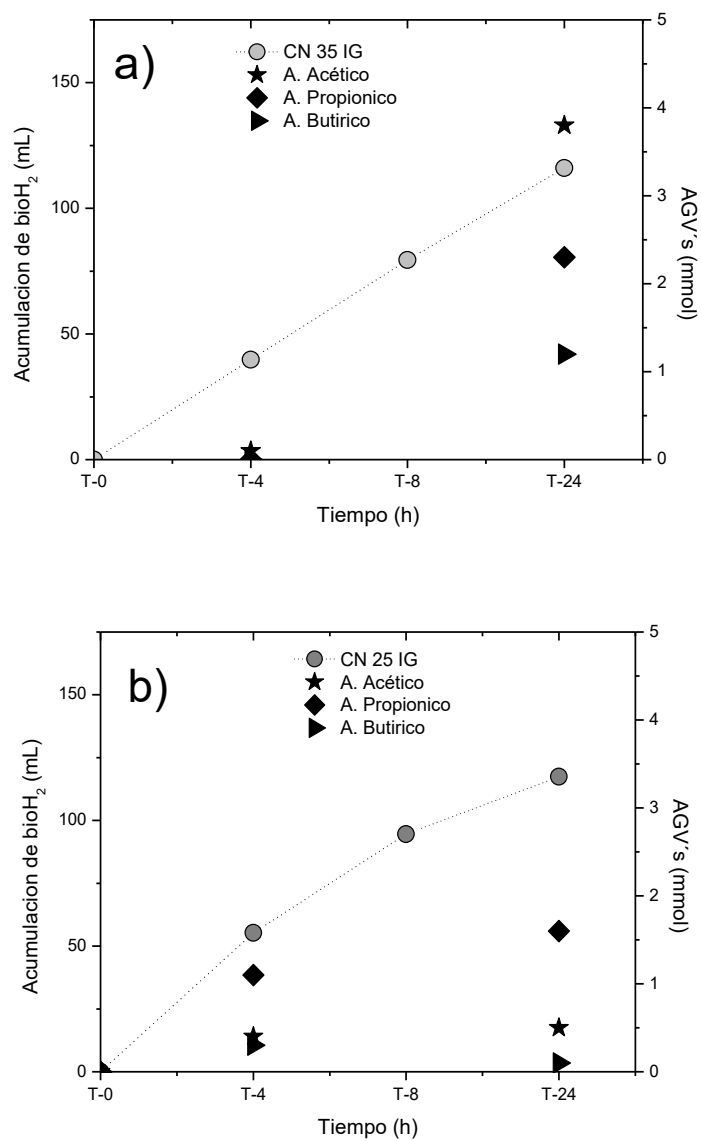


Figura 18. Acumulación de ácidos grasos volátiles respecto al tiempo durante la FO para la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N e IG. a) relación C/N = 35 y b) relación C/N = 25.

4.3 Efecto de inóculo en la codigestión (C/N = 25 y C/N = 35) en microrreactores batch

Como se describió en la etapa experimental, en este trabajo, además de la evaluación de la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N empleando IC en la FO. Además, se compara el desempeño de este inóculo respecto al inóculo granular. A continuación, se presentan los resultados de las codigestiones más prometedoras en la FO (pH inicial 5.5, T=35°C y 100 RPM).

4.3.1 Evolución de los parámetros fisicoquímicos de los microrreactores en FO con IC

Para los microrreactores batch en la FO de la codigestión SIL-SIC con relación C/N=35 e inoculados con IC, los resultados reflejaron un pequeño aumento del pH, de 5,5 a 6 dentro de las primeras 4 h; después de 8 h, mantuvo un pH de 5,5 y posteriormente descendió linealmente hasta alcanzar un valor de pH inferior a 4. Para la codigestión SIL-SIC con relación C/N = 25, el comportamiento es similar. Cabe destacar que en ningún experimento con la C/N se observó un pH superior a 4 al final de las 32 h de experimentación, como se muestra en la Figura 19.

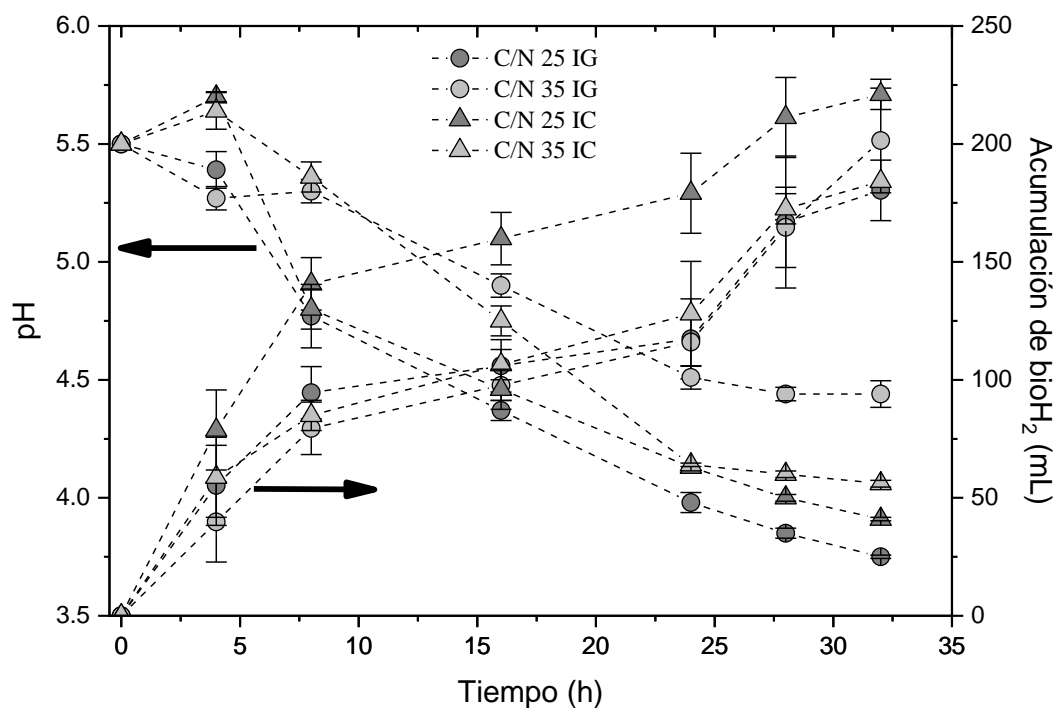


Figura 19. Efecto del inóculo de composta e inóculo granular en la codigestión SIL-SIC con diferentes relaciones C/N a través del tiempo. pH inicial 5.5, T=35°C.

La remoción de la materia orgánica al utilizar el IC para la relación C/N = 35 demostró un comportamiento similar al de los experimentos con la IG; es decir, la remoción de los carbohidratos con el IC fue del 91%, mientras que con la IG fue del 96%; la remoción de la DQO con el IC alcanzó el 18%, y con la IG fue del 24%. Este hallazgo también fue muy

similar a la remoción del SV con IC que alcanzó el 50%, y con la IG, alcanzó el 68%. Estos valores se pueden resumir con la afirmación de que la IG eliminó un 30% más de materia orgánica que la IC. En el anexo 1 se presentan las gráficas de los resultados aquí descritos.

La remoción de la materia orgánica al utilizar la IC para la relación C/N = 35 evidenció un comportamiento similar al de los experimentos con la IG; es decir, la remoción de los carbohidratos con la IC fue del 91%, mientras que con la IG fue del 96%; la remoción de la DQO con la IC alcanzó el 18%, y con la IG fue del 24%. Este hallazgo también fue muy similar a la remoción del VS con IC que alcanzó el 50%, y con la IG, alcanzó el 68%. Estos valores demuestran que el IG eliminó un 30% más de materia orgánica que el IC.

Los resultados demostraron que la producción de bioH₂ es afectada por el tipo de inóculo utilizado (véase figura 19). El C/N = 35 con el IC mostró una tendencia similar (~200 mL de bioH₂), pero produjo un 9% menos de bioH₂ que el mismo experimento realizado con el IG. Sin embargo, el reactor con la C/N = 25 acumuló 220 mL de bioH₂ en presencia de IC después de 32 h, destacando el aumento de la producción de biogás, con una IC superior al 20% con respecto al mismo biorreactor en el que se cultivó el IG, con la ventaja de que el 67% de la producción total de gas se registró durante las primeras 8 h. El mejor rendimiento con la IC se asocia a la dispersión de los microorganismos en la codigestión.

Para la IC, las comunidades microbianas alcanzaron selectividades en intervalos de 43-21% y 39-16% para los biorreactores C/N = 35 y C/N = 25, respectivamente. Estos resultados son ligeramente superiores a los de IG, y su fuerza podría atribuirse a las condiciones intrínsecas del inóculo. Para el caso de los AGV's con IC, la acumulación de ácido acético no superó los 54 mg L⁻¹ con una C/N = 35. Sin embargo, para la relación C/N = 25, la acumulación de ácido acético superó 180 mg L⁻¹, aunque también hubo presencia de ácido propiónico (311 mg L⁻¹), demostrando que la ruta del ácido propiónico fue la dominante y se vio reflejado en el rendimiento de bioH₂.

4.3.2 Evaluación de la relación C/N y su efecto sobre el rendimiento

En la Figura 20 se presenta los resultados del rendimiento en la producción de bioH₂ (mL H₂ g DQO_{rem}⁻¹) para los reactores de la codigestión empleando los dos tipos de inóculo. Aquí se remarca que los reactores con la relación C/N = 35 fueron los que alcanzaron un valor mayor de 60, estos valores son al menos 6 veces superior a las otras dos mezclas de codigestión (C/N = 30 y C/N = 25). Los resultados anteriores coinciden con los datos obtenidos en el diagrama de Pareto donde la relación C/N es una variable de mayor significancia.

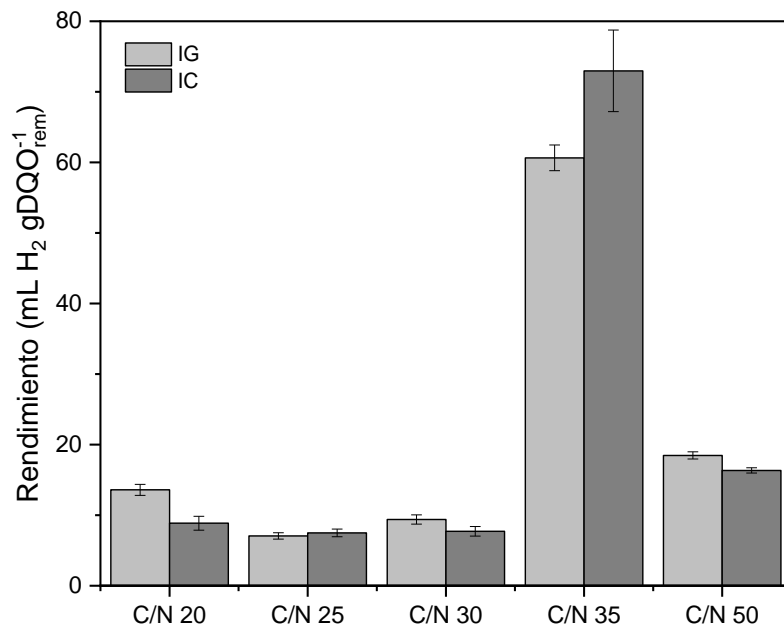


Figura 20. Comparativo del rendimiento de bioH₂ entre el IG e IC durante la codigestión SIL-SIC en las diferentes relaciones C/N a microreactores batch, pH inicial 5.5, T=35°C.

4.4 Modelo cinético de los microrreactores en lote con IG e IC

4.4.1 Modelo Cinético de Gompertz

En la Figura 21 se presenta el comportamiento cinético de la serie de experimentos con el mayor rendimiento de producción de bioH₂ (codigestión SIL-SIC con relación C/N=35 e IG). Los símbolos circulares muestran el comportamiento experimental y la línea punteada muestra la tendencia de la ecuación modificada de Gompertz simple. El modelo cinético de Gompertz fue utilizado para explicar los datos obtenidos experimentalmente y se reportan en la tabla 8. Para el caso de la codigestión SIL-SIC con relación C/N = 35 y utilizando IG, la estimación teórica de la producción fue de 253.08 mL H₂ mientras que el experimental alcanzó una producción de 215.28 mL bioH₂, además registró una velocidad de producción de 16.77 mL bioH₂. Estos valores fueron superiores a la codigestión SIL-SIC con relación C/N=25, que reportó una producción de 179.93 mL bioH₂ y una velocidad de producción de 12.07 mL bioH₂.

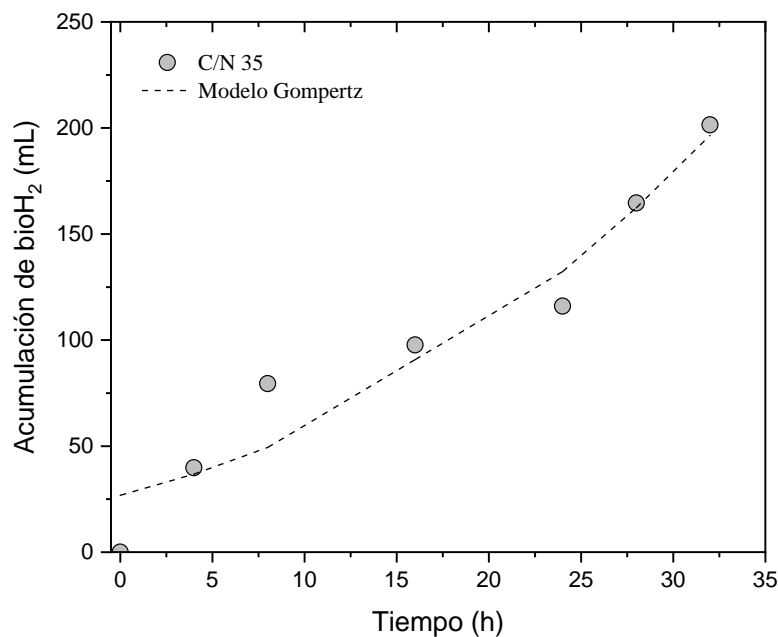


Figura 21. Cinética de la ecuación modificada de Gompertz para la codigestión SIL-SIC con relaciones C/N=35 e IG en microrreactor batch. pH inicial 5.5, T=35°C.

También es importante resaltar que el experimento tuvo un periodo de aclimatación demasiado corto, puesto que la variable h nos indica el tiempo en el cual los microorganismos se adaptaran a degradar determinado tipo de materia orgánica y en este experimento la fase lag fue a $\lambda = 0.28$ h.

Los datos obtenidos para la serie C/N = 35 e IG, fueron validadas con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.91$. Para la relación C/N = 35 e IC mostrado en la Tabla 8, se obtuvo un mayor resultado al estimado, es decir, la producción máxima teórica fue de 166.40 mL bioH₂ mientras que la producción experimental fue de 193.28 mL bioH₂. También se calculó una λ menor a 1 hora y el coeficiente de correlación fue de 0.93. Los valores calculados para la relación C/N = 25 con IG fue 15% menor que su homólogo, la C/N = 35. Para la C/N = 25 e IC el rendimiento con respecto a la C/N = 35 e IC fue mejor. Cabe mencionar que en todos los experimentos el coeficiente de correlación supero el valor de $R^2 = 0.9$ y la fase lag se presentó antes de 1 h. La fase lag en todos los casos de codigestión fueron mas cortos que lo reportado por Basak *et al.*, [11], quienes evaluaron la codigestión entre residuos de frutas y vegetales con suero de queso a diferentes pretratamientos del inóculo. Además, la relación C/N 35 e IG presentó un mayor porcentaje de bioH₂ que el experimento que utilizó tratamiento térmico del inóculo.

Tabla 8. Parámetros cinéticos del proceso de FO a partir de la ecuación modificada de Gompertz con la herramienta Solver®. Codigestión SIL-SIC, pH inicial 5.5, T=35°C.

Inóculo	C/N	H _{Max} Exp. (mL)	H _{Max} (mL)	R _{Max} (mL)	λ (h)	R ²	% bioH ₂
Granular	25	179.93	157.08	12.07	>1	0.91	37
Composta	25	224.88	203.90	20.56	0.47	0.97	40
Granular	35	215.28	253.01	16.77	0.28	0.93	49
Composta	35	193.28	166.40	10.64	>1	0.93	40

4.4.1 Modelo doble de Gompertz

En esta sección se analizarán las gráficas de la evolución de FO (*t vs acumulación de biogás*) en las codigestiones SIL-SIC con relación C/N (35 y 25) empleando los IG e IC (véase figura 22). Para este modelo modificado de Gompertz doble (ecuación 10), y que considera la acumulación de biogás en dos etapas que pueden explicarse en función de las características del sustrato tal como lo reporta De Gioannis *et al.*, [16] sin embargo, es probable que la disminución de presión al interior del reactor produzca una reactivación de las bacterias productoras de bioH₂ [21].

A partir de la herramienta de Excel® Solver se logró obtener la información presentada en la Tabla 9. Los resultados demostraron que para ambos inóculos y codigestiones, más del 50% de la acumulación de bioH₂ total se dio en la primera etapa, tal como se observa en la Figura 22. Para la codigestión SIL-SIC con relación C/N = 35 e IG se obtuvo la máxima predicción de 243.70 mL de bioH₂, lo que concordó con el modelo de Gompertz simple. De la misma forma, se observó que la fase *lag* coincidió con el modelo de Gompertz simple (Tabla 8), es decir, menor a 1h en cuanto a la primera fase del experimento. Sin embargo, la fase lag de la segunda etapa duró de 22 a 23 h antes que se presentará nuevamente la acumulación de bioH₂. En cuanto a la velocidad máxima, en todos los experimentos la R_{Max} fue mayor que en la segunda etapa, y solo coincidió la R_{Max} de la codigestión SIL-SIC con relación CN 35 e IG entre ambos modelos. Finalmente, se comprobó el modelo de modificado de Gompertz doble explicó ampliamente los datos experimentales. De hecho, la R² mantuvo un valor superior al 0.99, en contraste con el modelo de Gompertz simple que presentó una R² de 0.91 a 0.97.

Esto corrobora la utilidad del modelo modificado de Gompertz doble para la explicación de los datos obtenidos en el presente estudio.

Tabla 9. Parámetros cinéticos en la codigestión SIL-SIC con relación C/N=25 y C/N=25 empleando los inóculos IG o IC empleando la ecuación modificada de Gompertz doble.

	Ecuación modificada de Gompertz doble							
	Inóculo granular				Inóculo Composta			
	C/N 25		C/N 35		C/N 25		C/N 35	
	1 ^{er} etapa	2 ^{da} etapa	1 ^{er} etapa	2 ^{da} etapa	1 ^{er} etapa	2 ^{da} etapa	1 ^{er} etapa	2 ^{da} etapa
H _{Max} (mL)	109.17	73.15	106.86	136.84	162.32	65.06	111.35	84.36
H _{Tot} (mL)	182.32		243.70		227.38		195.72	
R _{Max} (mL h ⁻¹)	18.78	13.44	15.06	13.54	26.24	10.05	15.37	14.44
λ (h)	1.08	23.18	1.00	22.86	1.01	21.90	0.35	22.17
R ²	0.9999		0.9999		0.9998		0.9971	

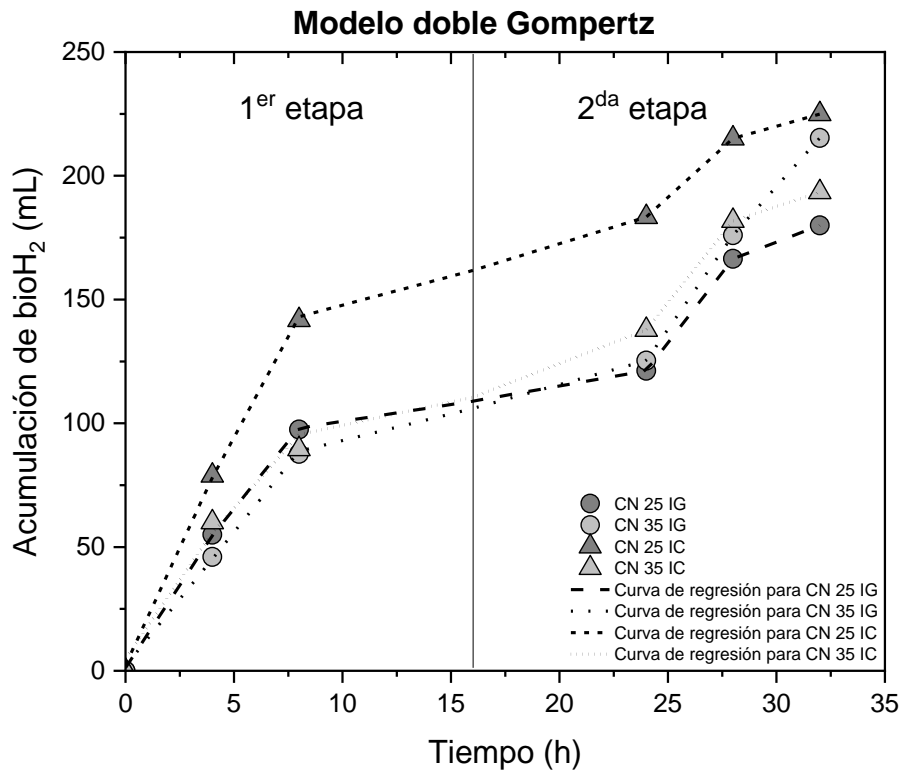


Figura 22. Validación del modelo doble de Gompertz de la codigestión SIL-SIC a diferentes relaciones C/N y la fuente de inóculo. (Símbolos: datos experimentales; Líneas: datos obtenidos de la curva regresión).

4.5 Análisis microbiológico de los inóculos durante la FO

Como parte de este trabajo se realizó el estudio en los cambios de las comunidades microbianas durante la producción de bioH₂ para la codigestión SIL-SIC con relaciones C/N = 35 y C/N = 25, con los diferentes inóculos (IC e IG) a los tiempos 0, 4, 8 y 24 horas, con el fin de conocer la evolución de las especies presentes en la producción de bioH₂.

4.5.1 Inóculo granular

La Figura 23 muestra las especies predominantes para la codigestión SIL-SIC con relación C/N = 35 a diferentes tiempos (0, 4, 8, 24 y 32 h) empleando IG. A las 0 h, donde predomina la clase *Bacillus* (30%) seguida de *Clostridia* (20%), y otras especies no identificadas. A las 4 h y 8h, la población de *Bacillus* aumentó al 42% y al 98% respectivamente. En las primeras horas (4 h), la población de *Bacillus* estaba constituida por un 13% de *Lactobacillus lactis* (*L. lactis*), un 15% de *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*), un 5% de *L. lactis*, un 28% de *Enterobacteriaceae*, y un 22% de la familia Acetobacteraceae, mientras que después de 8 h, el 16,6% eran *Lactobacillus*, el 24% *L. mesenteroides*, y el 46% *L. lactis*. Después de 24 h, las especies predominantes fueron *Lactobacillus casei* 13%, *Lactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) 9%, *Lactobacillus dextrinicus* 6%, *L. lactis* 22,5%, y otros *Bacillus*, 31%.

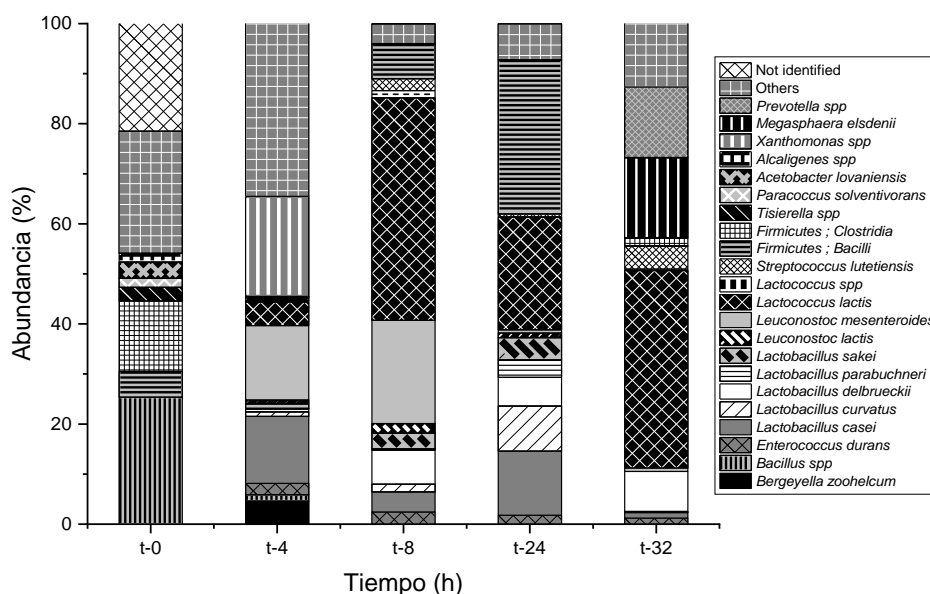


Figura 23. Estructura de la comunidad de microbacterias de las codigestiones del sustrato SIL-SIC con la relación C/N = 35 en presencia de inóculo granular en diferentes tiempos (t) (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.

Es evidente que la sinergia de las comunidades de microbacterias productoras de bioH₂, como *Clostridia*, estuvo presente durante las primeras 8 h, cuando hay una mayor disponibilidad de CH solubles derivados del sustrato de SIL. Posteriormente, la atenuación de la producción de bioH₂ se vinculó al crecimiento de poblaciones microbianas de tipo *Bacillus* a un pH

inferior a 5. Según Xianbo Su, el género *Bacillus* puede producir un biosurfactante péptido graso, que aumenta la estabilidad térmica de la misma celulosa que promueve la degradación de la lignocelulosa [22]. El producto hidrolizado resultante es el sustrato de los diferentes grupos microbianos presentes.

Posteriormente, a las 32 h se analizó la población microbiana en la relación C/N = 35 con IG. En la figura 23 se puede observar la especie *Megasphaera elsdenii*, del género *Megasphaera*, conocida por su capacidad de producción de bioH₂ [21]. Fue posible detectar la especie *Prevotella spp*, que se ha reportado por su capacidad de consumir los subproductos de la fermentación de lactato y acetato [22], pero este fenómeno mejor dilucidado con el aumento del pH (Figura 16) debido al probable consumo de ácido por parte de esta especie. Teniendo en cuenta estos hallazgos, cabe mencionar que, para el orden no clasificado de la familia de los *Bacilos*, existe una disminución en la producción de bioH₂ (Figura 18).

Para el reactor con la relación C/N = 25 (Figura 24), la evolución microbiana mantuvo la misma tendencia, considerando que las especies predominantes fueron *Leuconostoc mesenteroides* con 45, 27 y 32%, y *L. lactis* con 12, 45 y 48% durante 4, 8 y 24 h, respectivamente. Se informó de que esta última especie era nativa de los sustratos sólidos capaces de hidrolizar la biomasa; sin embargo, cuando se la sometió a tratamiento térmico, fue capaz de producir bioH₂ [23].

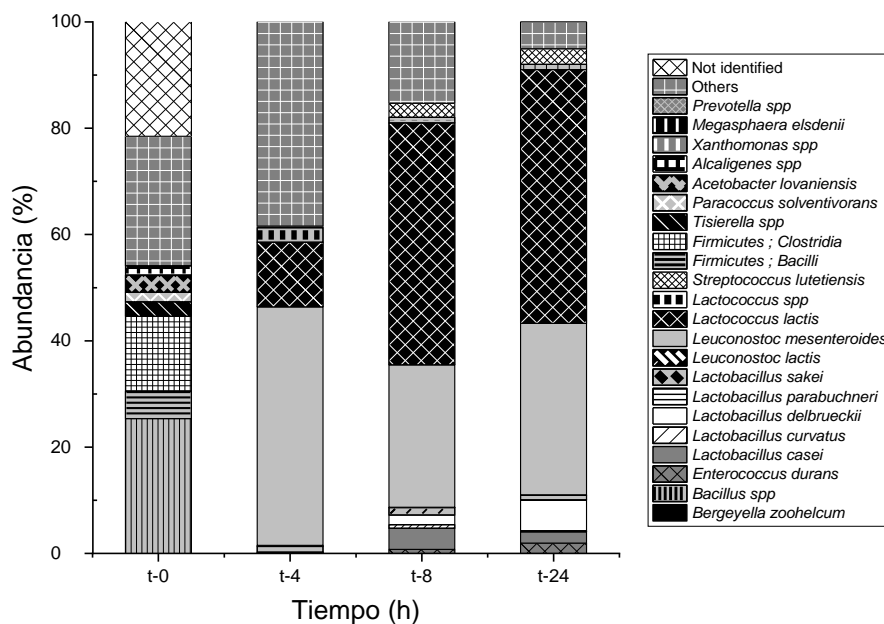


Figura 24. Porcentaje de Abundancia de comunidades de microbacterías en la relación C/N = 25 en presencia de IG en diferentes tiempos (t) (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.

Análisis filogenético de la codigestión SIL-SIC con relación C/N 35 e IG

El análisis filogenético de la codigestión SIL-SIC con relación C/N 35 empleando el IG, demuestra la agrupación de las especies en 4 grupos. El primer grupo corresponde a la especie *Lactococcus lactis* que, junto a especies del reino *Bacilli* son los grupos con mayor distancia de los grupos 3 y 4. Sin embargo, está claro que los grupos más alejados son también los que mayor presencia y abundancia muestran, tal como se observa en la Figura 24. El tercer grupo concentra especies con menor abundancia que el grupo anterior, pero es destacable la similitud con el último grupo, el cual concentra la mayoría de las especies y además están presentes antes de las 24 h de monitoreo. En general el grupo 4 demuestra la presencia de las principales especies productoras de bioH₂ después de 24 h, tales como *Prevotella sp* y *Megasphaera elsdenii*, esto coincide con el aumento en la producción de bioH₂ mostrado en la Figura 19.

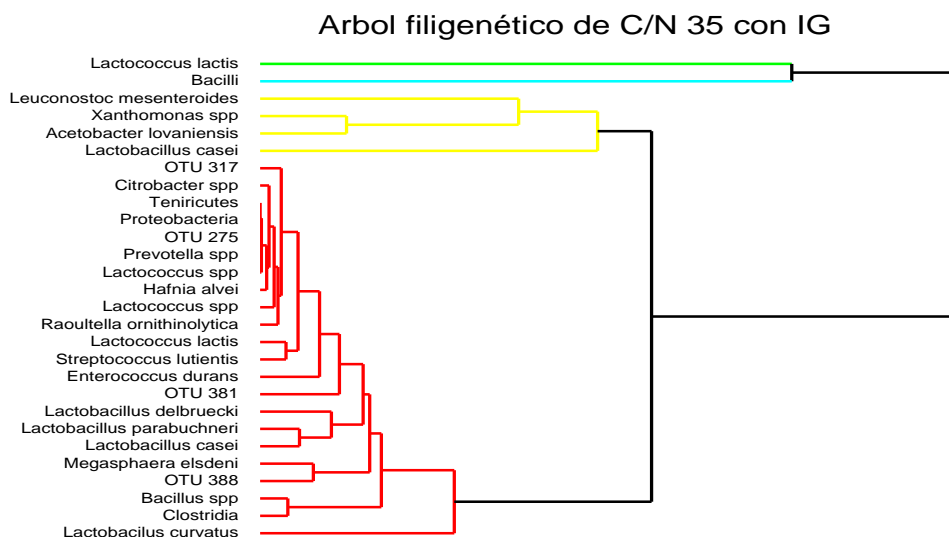


Figura 25. Análisis filogenético de la codigestión SIL-SIC con la relación C/N 35 e IG.

4.5.2 Inóculo de composta

En cuanto al IC, se observó inicialmente que el 14% de las especies de vanguardia pertenecían a los *Teniricutes*, el 9% a las *Proteobacterias*, y el resto no se pudo clasificar (véase la Figura 26). Sin embargo, una vez cultivado, para este inóculo en el reactor con la relación C/N = 35, las siguientes especies predominaron a las 4 h: *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *Lactococcus spp.* y *Citrobacter spp.*, entre otras bacterias, con los siguientes porcentajes: 24, 4, 10, 13 y 16%. Después de 8 h, *L. lactis* había alcanzado el 42%, y *Citrobacter spp.* y otras bacterias alcanzaron el 17% cada una. Después de 24 h de funcionamiento del reactor, el 58% correspondía a la especie *L. casei*, el 25% a *L. delbrueckii*, y el 10% a *L. parabuchneri*. Es evidente que las poblaciones microbianas del abono no proliferaron una vez iniciada la FO, porque en épocas posteriores, las poblaciones identificadas se asocian con el suero de mantequilla [24].

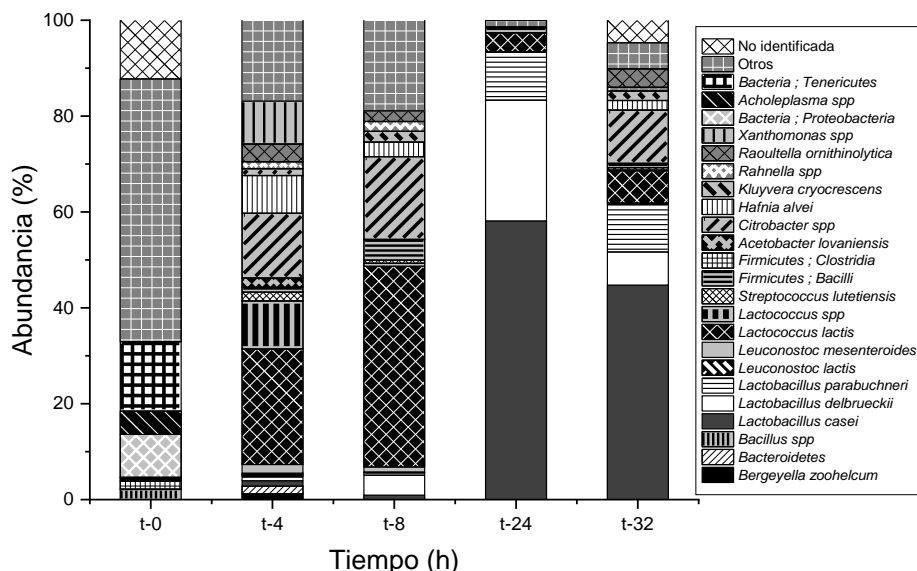


Figura 26. Estructura de la comunidad microbiana en la codigestión SIL-SIC con C/N = 35 utilizando inóculo de composta a diferentes tiempos (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.

Para la relación C/N = 35, se evaluó también el tiempo 32 h y el uso del inóculo de CI. Los resultados anotados en la Figura 27, mostraron la reactivación de las especies de *Citrobacter spp* y las especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *Hafnia alvei*, *Kluyvera cryocrescens*, *Rahnella spp* y *Raoultella ornithinolytica*, que no estaban presentes cuando se registró la disminución de la producción de bioH₂ a las 24 h.

Sin embargo, la presencia de *Citrobacter spp* corroboró la presencia de bioH₂ según se informa en la literatura [25]. Este comportamiento se puede detectar mejor a las 24 h cuando en ambas codigestiones (C/N = 25 y C/N = 35), no hay indicios de esta especie, pero hubo una disminución en la producción de bioH₂ (ver Figura 19).

No obstante, el reactor de referencia no produjo biogás, lo que nos lleva a suponer que la producción de bioH₂ se debe a la sinergia de la mezcla de la codigestión con el inóculo. En la relación C/N = 25 (véase la Figura 27), las especies predominantes fueron *Leuconostoc mesenteroides*, *L. lactis* y otras bacterias en porcentajes superiores al 20%. Después de 24 h, las especies que demostraron mayor presencia fueron *L. casei*, *L. delbrueckii* y *Lactococcus lactis* con 42, 15 y 31%, respectivamente.

Inicialmente, el 14 % pertenecía al filo de *Tenericutes*, 9 % a las *Proteobacteria* y otro 51 % no pudieron ser clasificadas utilizando el IC. Para la relación C/N = 35, las primeras 4 h dominaron las especies *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *Lactococcus sp*, *Citrobacter sp* y otras bacterias con 24, 4, 10, 13 y 16%, respectivamente. Después de 8 h los *Lactococcus lactis*

habían aumentado a 42%, *Citrobacter sp* y otras bacterias con 17 % cada uno. Cuando se cumplieron las 24 h, el 58% correspondía a las especies *L. casei*, 25 % para la especie *L. delbruecki* y 10% de *L. parabuchneri*.

En la relación C/N = 25 las especies predominantes fueron las *Leuconostoc mesenteroides*, *L. lactis* y otras bacterias con una presencia mayor que el 20%. Después de 24 h las especies que mayor presencia demostraron fue *L. casei*, *L. delbruecki* y *Lactococcus lactis* con 42, 15 y 31%, respectivamente.

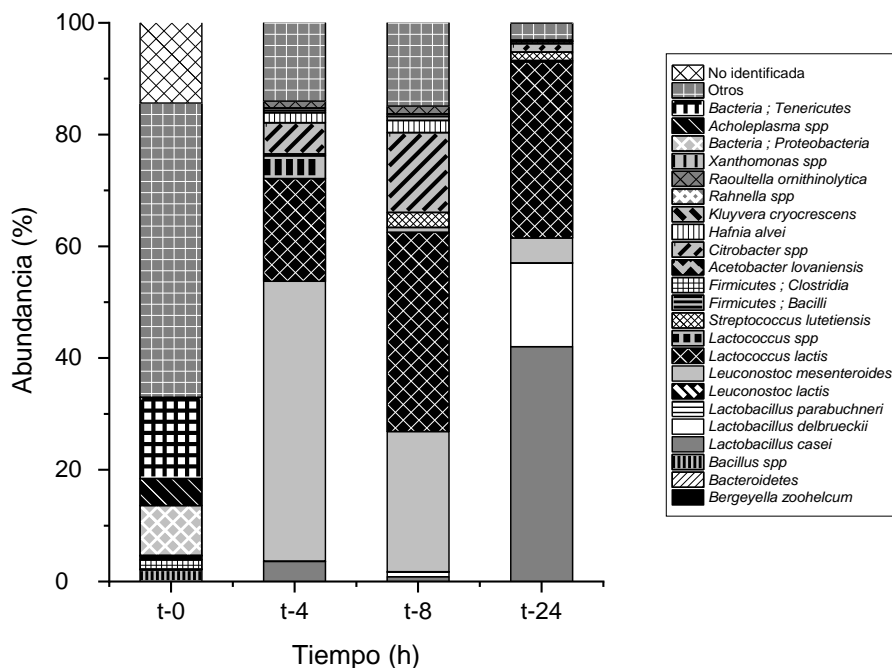


Figura 27. Estructura de la comunidad de microbacterias en la relación C/N = 25 en presencia de inóculo granular en diferentes tiempos (t) (t = 0, 4, 8, 24 y 32 h). pH=5.5, Temperatura (T) = 35°C.

Es importante destacar que para ambos inóculos se encontró la presencia de *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*. Estas especies se pueden atribuir a la presencia de microorganismos propios de los cosustratos, principalmente SIL. Además, alrededor del 15% de las bacterias no identificadas, atribuidas a la naturaleza del IC, se mantuvieron las primeras 10 h. La presencia de la especie *Leuconostoc mesenteroides* se encontró en todos los sistemas analizados a excepción de la relación C/N = 35 e IC. Cuando la especie *Lactococcus lactis* aumentó, la producción de bioH₂ también, por el contrario, cuando la especie *Leuconostoc mesenteroides* aumentó la producción de bioH₂ cayó.

Análisis filogenético de la C/N 35 e inóculo de composta

De la misma forma que se realizó el análisis filogenético con el IG se realizó, fue estudiado el IC. Las especies también se agruparon en 4 comunidades. El primer grupo, tal como con el IG, se trata de la especie *Lactococcus lactis* que ha demostrado su presencia en todos los experimentos realizado, con más presencia en unos que otros. El segundo grupo tiene una mayor similitud con el grupo 4 de la Figura 28, pero con la adición de especies como *Leuconostoc mesenteroides* y *Acetobacter lovaniensis* del grupo 2 de la misma figura. Por último, es necesario resaltar la participación de la especie *Citrobacter sp* y *Lactobacillus casei*, del grupo 3 y 4 respectivamente, quienes tienen una fuerte presencia a lo largo de los experimentos. Además, las observaciones demostraron que su presencia aseguró una creciente producción de bioH₂.

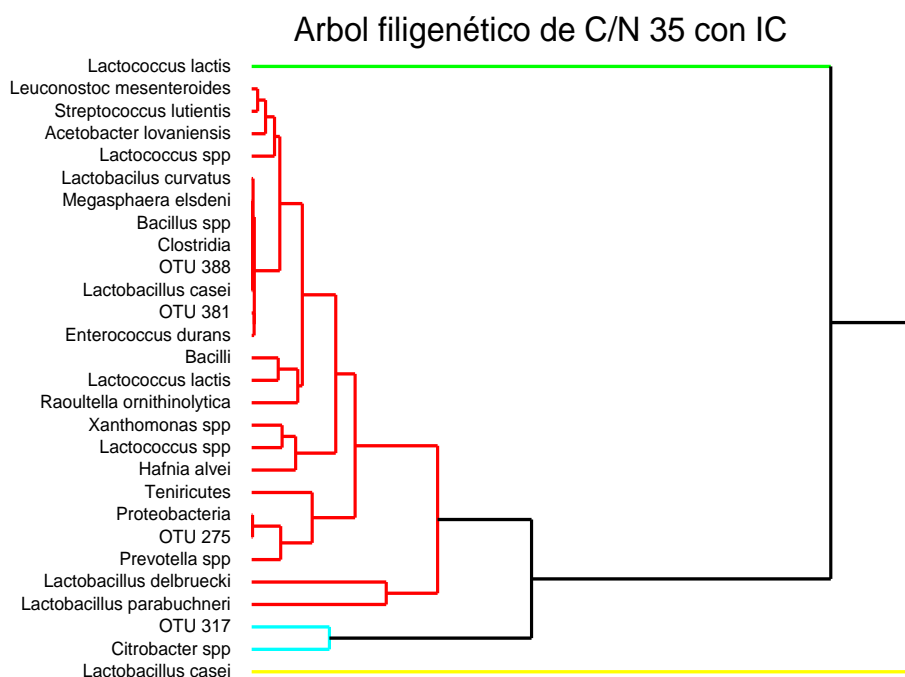


Figura 28. Análisis filogenético de la codigestión SIL-SIC con la relación C/N 35 e IC.

Agrupación de muestras a partir de las OTUs

Así como se demostró la agrupación de las especies en las diferentes relaciones C/N y su participación en la producción de bioH₂ en este apartado, Figura 29 se presentan las similitudes entre los diferentes experimentos. En primer lugar, es importante notar la diferencia entre los inóculos iniciales (grupo 5 y 6), se comportan como grupos distantes a las demás observaciones. Además, el grupo 2 y 3 muestran una distancia similar, colocando la muestra con C/N = 35 a 4 y 24 h como experimentos aislados. El grupo 2, por su parte, agrupa experimentos con similar inóculo (IC) con relación C/N = 35 y C/N = 25 en periodos mayores a 24, no obstante, a las 24 h ambas relaciones son semejantes. Por último, el grupo

4 muestra los experimentos más representativos e incluyen las especies con mayor predominancia.

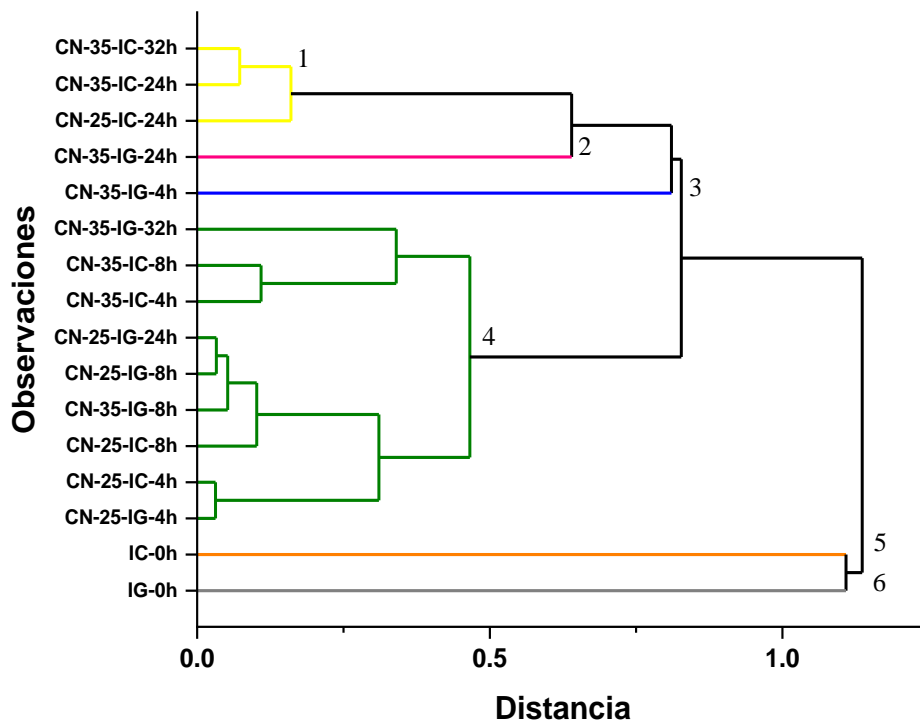


Figura 29. Análisis clúster para la agrupación de muestras.

4.6 Operación del Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente

A partir de los resultados obtenidos en los microrreactores batch y considerando las condiciones más adecuadas de la codigestión SIL-SIC, fuero una relación C/N=35, T=35°C, inóculo granular con la variante que ahora el pH se mantendrá constante. En la primera parte se muestran los resultados del reactor UASB con un TRH = 3 h, mientras que en la segunda sección se presenta un comparativo de la evolución de la FO a los diferentes TRH (3, 9 y 12 h). Finalmente se presenta un análisis termodinámico a partir del producto y subproductos de reacción.

4.6.1 Reactor UASB con TRH = 3 h

En la Figura 30 se presentan los resultados de la FO de la codigestión SIL-SIC a un TRH = 3 ± 0.2 h, pH = 5.5 ± 1 , C/N = 35 y temperatura 35 °C e IG. La codigestión SIL-SIC bajo las condiciones antes mencionadas fue exitosa por 20 ciclos a pH constante. Sin embargo, se observó la acidificación lenta del reactor del ciclo 3 hasta el ciclo 11 posteriormente se presentó un aumento del pH hasta 6 (hasta ciclo 14) por la adición de una solución NaOH durante la operación. La falta de un control automatizado del pH al interior del reactor conlleva a una disminución de este parámetro (pH~4.8) en el reactor hasta el ciclo 20. Sabiendo que las condiciones de operación FO son sensible al pH, la evolución de la producción de biogás se mantuvo en promedio de 30 mL por ciclo alcanzando 500 mL en 20 ciclos como se muestra en el eje y (izquierdo) de la figura 30. No obstante, se observó un ligero cambio de pendiente del ciclo 9 al ciclo 15 asociado a la sinergia que representa el ajuste del pH y que reactiva los microorganismos productores de bioH₂.

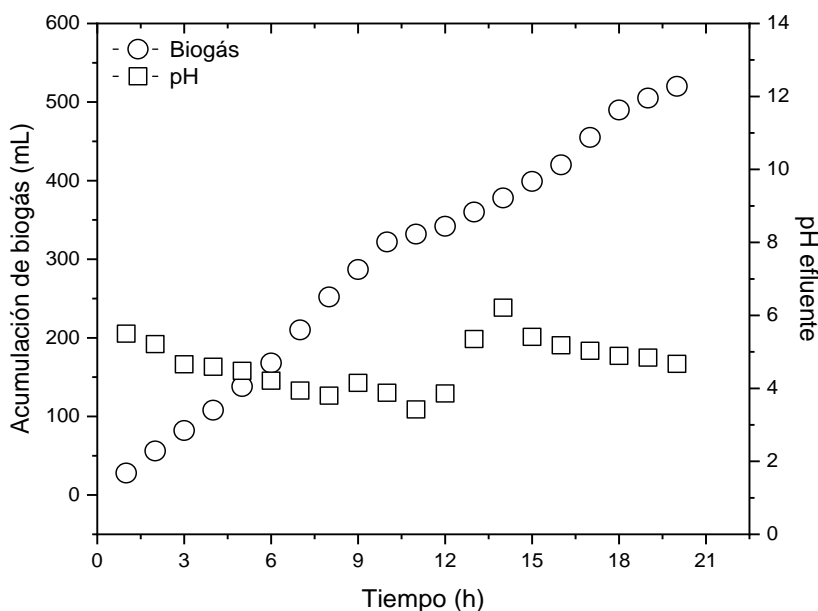


Figura 30. Registro de pH y acumulación de biogás de La codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h, pH constante de 5.0 ± 1 , temperatura de 35 °C.

Haciendo una analogía del seguimiento temporal del análisis microbiológico de la codigestión SIL-SIC en el microrreactor batch ($C/N = 35$, $T = 35^\circ$ y sin control del pH) a 4 h, respecto a la operación del reactor UASB ($TRH=3$). En el primer caso las especies dominantes fueron *Lactococcus lactis* (5%), *Leucobostoc mensenteroides* (15%), *Xanthomonas sp* (20%) y *Lactobacillus casei* (13%), pero el género *Xanthomonas sp.*, es quien esta asociado como la probable responsable de la producción de bioH_2 en más del 50% de la experimentación [26] y que consideramos que predomina en la mayoría de los ciclos del reactor UASB. Por otra parte, el crecimiento de las BAL también explica la fuente influencia de este género en la acidificación del medio como consecuencia de la producción de ácido láctico. Finalmente, después del ciclo 18 se observó nuevamente el descenso del pH, probablemente por el crecimiento de las BAL y otras bacterias de la clase *Bacilli* como lo reportado en estudios previos y que son conocidos por producir metabolitos como el ácido láctico y a su vez la acidificación del medio [8,11].

En la Figura 31 se presentan los resultados de la composición del biogás (BioH_2 , CO_2 y CH_4 en menor porcentaje) para los ciclos de la codigestión SIL-SIC para el $TRH=3$. En los primeros 4 ciclos el porcentaje de bioH_2 fue equimolar (50%) con el CO_2 como subproducto, posteriormente disminuyo hasta 20% como consecuencia de la acidificación del reactor (entre el ciclo 5 a 9).

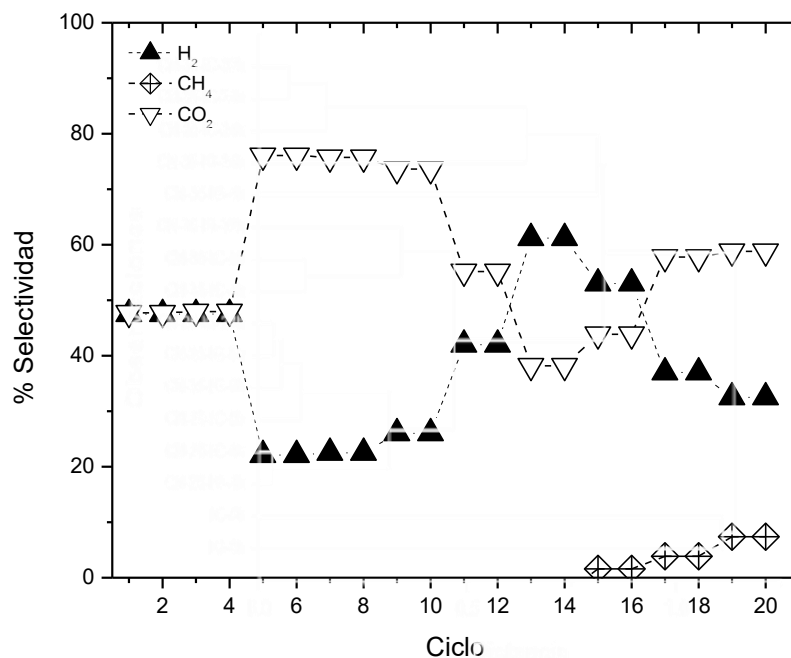


Figura 31. Cuantificación de gases permanentes en la codigestión SIL-SIC ($C/N=35$) empleando IG en un reactor UASB con $TRH = 3 \pm 0.2$ h, pH constante de 5.0 ± 1 , $T= 35^\circ\text{C}$.

Como se mencionó previamente, la sinergia del $\text{pH} > 5.0$ entre el ciclo 10 y 15 provocó un aumento importante en el contenido de bioH_2 (60%), indicando el dominio de la etapa acidogénica y acompañada de una disminución del CO_2 . Finalmente, la producción de bioH_2 vuelve a disminuir a 30% a partir del 15^{vo} ciclo como resultado de la evolución de la FO hacia las rutas metabólicas metanogénicas conllevando a la producción de CH_4 , como evidencia de la presencia de bacterias metanogénicas [27].

Los resultados la remoción de CH en la codigestión SIL-SIC durante la FO en el reactor UASB se presentan en la figura 32a. Durante los primeros 3 ciclos el porcentaje de remoción fue de 40%. Luego en los ciclos 11 y 12 se observó una disminución del porcentaje de remoción hasta 20%, Sin embargo, el ajuste de pH en el proceso de FO, ocasionó un aumento del porcentaje de remoción entre los ciclos 13 al 16, resultado de la actividad microbiana en el reactor mencionada en el párrafo del pH y que además coinciden con la máxima producción de bioH_2 . En la misma figura, también se presenta el porcentaje de remoción de la DQO, destacando una correlación directa con los CH hasta el ciclo 15 cuando ambos parámetros se comportaron completamente opuestos (Figura 32a), probablemente por la presencia de bacterias metanogénicas quienes se caracterizan por el uso de AGV's para la generación de CH_4 .

Como parte de los análisis fisicoquímicos realizados al efluente, en la figura 32 b se presentan los resultados de SST del afluente del reactor UASB con el sustrato SIL-SIC con el objetivo de estimar el lavado de biomasa del reactor. Durante los primeros ciclos de operación (hasta ciclo 10), se observó 40% de retención de los SST, pero en el siguiente ciclo se observó una ligera disminución en la retención, y después de 15 ciclos de operación se observó nula retención de la biomasa que se asocia con la ausencia de bacterias productora de bioH_2 como resultados de la acidificación del medio y el comienzo la proliferación de bacterias metanogénicas y las BAL [27], las primeras asociadas con la producción de CH_4 . Finalmente, para los SSV se corroboró la misma tendencia que los SST.

El análisis de los AGV's se realizó por cromatografía de gases con el detector de ionización de flama para la operación del reactor UASB en la codigestión SIL-SIC. De acuerdo, con el análisis bibliográfico los metabolitos más abundantes son: el etanol, el ácido acético, el ácido fórmico, el ácido propiónico, el ácido butírico, el ácido isobutírico, ácido valérico, el isovalérico, el ácido caproico y el caprílico [6]. En este trabajo se identificaron 4 ácidos orgánicos destacando el ácido acético y ácido butírico quienes están directamente asociados con la actividad de las bacterias productoras de bioH_2 .

En la figura 33 se presenta la evolución de los metabolitos a partir del ciclo 10, destacando el incremento de la concentración del ácido acético y ácido butírico hasta el ciclo 14 donde tuvieron condiciones adecuadas para la producción de BioH_2 (reacciones fosfoclasticas). Es evidente, que la ruta predominante fue producción del ácido acético con valores cercanos a los 300 mg L^{-1} , y que concuerda con el porcentaje máximo de bioH_2 y la máxima remoción de CH. Los metabolitos, ácido propiónico (100 mg L^{-1}) y ácido valérico (200 mg L^{-1}) también se estuvieron presentes en el proceso FO y siguieron una tendencia creciente en este intervalo de estudio, pero en menor concentración.

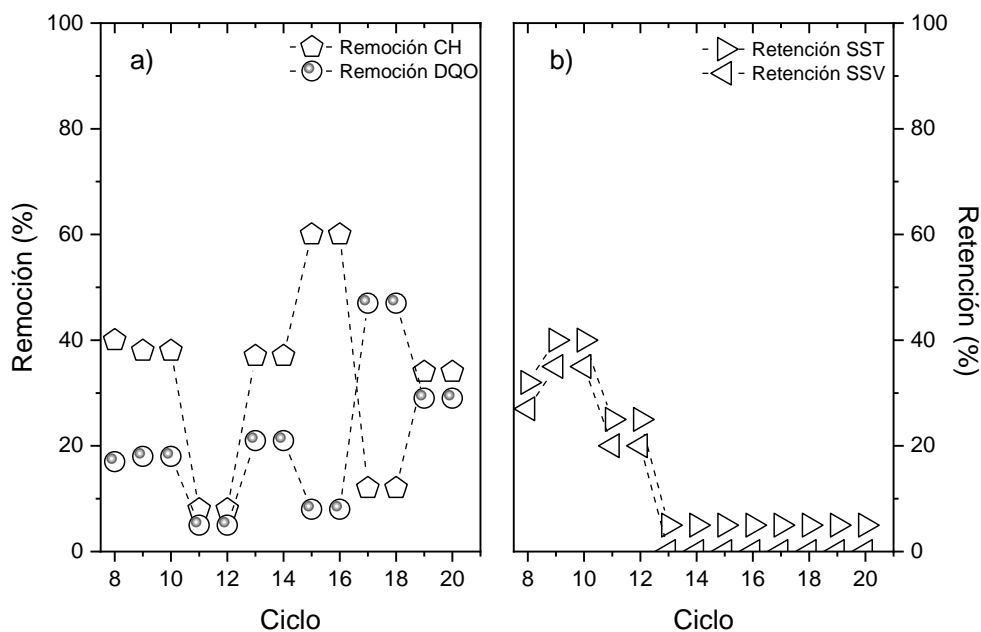


Figura 32. Degradación de la materia orgánica de la codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h, (a) Remoción de CH y DQO y (b) Retención de SST y SSV. pH constante de 5.0 ± 1 , T= 35 °C.

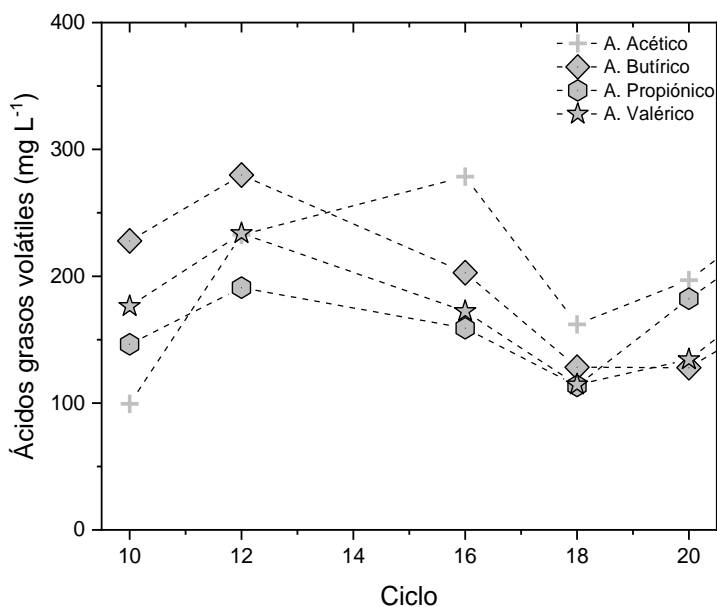


Figura 33. Acumulación de ácidos grasos volátiles durante la codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB con TRH = 3 ± 0.2 h. pH constante de 5.0 ± 1 , temperatura de 35 °C.

Habría que remarcar que el bioH_2 desprendido del proceso oxidativo es utilizado por las bacterias de distintas maneras, los clostridios transfieren los electrones liberados a protones que se separan como hidrógeno molecular, otras bacterias transfieren los protones al CO_2 produciendo ácido fórmico y otras más los utilizan para hidrogenar ácidos grasos [6, 21]. Además, hay bacterias, como las propionibacterias que al oxidar el ácido pirúvico hasta acético no liberan hidrógeno, sino que este es utilizado para formar ácido propiónico. A partir del ciclo 18 se registró una caída general en la acumulación de AGV's asociada con la baja del pH, la remoción de CH_4 y producción de bioH_2 . Esto se puede explicar porque el porcentaje de metano comenzó a producirse a partir del ciclo 15 y se asocia con la proliferación de bacterias metanogénicas que utilizan bioH_2 para producir CH_4 [27].

4.7 Efecto del tiempo de retención hidráulica en la producción de biohidrógeno

A continuación, es presentado el efecto del TRH en la producción continua de bioH₂ durante la codigestión SIL-SIC en el reactor UASB. Para el caso de TRH= 9 h se observó un comportamiento más estable del pH ($\text{pH } 5.5 \pm 0.7$) durante todo el experimento. Este comportamiento fue muy similar para el reactor con TRH = 12 h, quien mantuvo un pH promedio de 5.7 ± 0.8 , pero con una menor capacidad amortiguadora ya que se logró observar un ligero incremento de pH en los ciclos 3 y 6, sin embargo, para los ciclos posteriores (hasta ciclo 20) la acidificación del reactor muestra un mejor control (véase Figura 34). Al comparar estos resultados con el TRH = 3 h (ya descrito en la sección anterior), en este último experimento presentó un mayor intervalo de variación del pH (± 2) a lo largo de los 20 ciclos. A partir del resultado anterior se podría suponer que a mayor TRH los procesos oxidativos promovidos por las bacterias permiten transferir los electrones liberados a protones mismos que se recombinan formando hidrógeno molecular y los subproductos que acidifican lentamente el biorreactor.

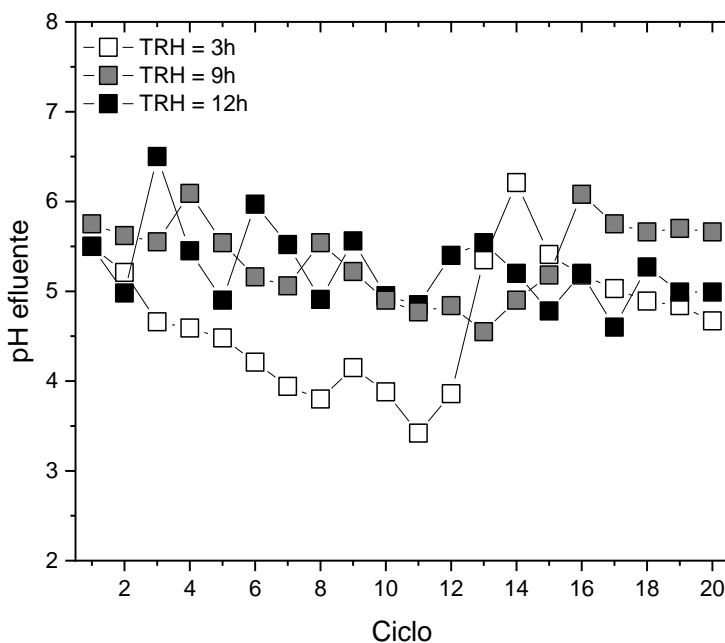


Figura 34. Comparación de la evolución del pH de la codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB empleando IG a los TRH's de 3, 9 y 12 h. T=35°C y pH constante de 5.5.

En la Figura 35 se muestra la producción promedio de biogás acumulada en función del ciclo de operación por cada TRH. En el caso del TRH = 9 h, fue posible una producción promedio de 330 ± 30 mL de biogás por ciclo con una VCO de $25 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, el TRH = 12 h presentó una producción de 70 ± 20 mL de biogás por ciclo y una VCO de $20 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y para el TRH = 3 ($100 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) la producción fue de 30 ± 9 mL de biogás. A partir de lo anterior, es evidente que la producción de biogás en el TRH = 9 y 12 h fueron 11 y 2.5

mayor que el volumen producido por el TRH = 3 h, respectivamente. El aumento en la producción de biogás se atribuye a un mejor control del pH en sinergia con la baja VCO [28]. Por ejemplo, Santos *et al.*, reportó que los valores de VCO mayores a $60 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ provocan una disminución en la eficiencia en la remoción de la materia orgánica y una baja producción de biogás. Por otro lado, los valores menores a $10 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ también significan una baja producción de biogás [29]. Esto es consistente con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

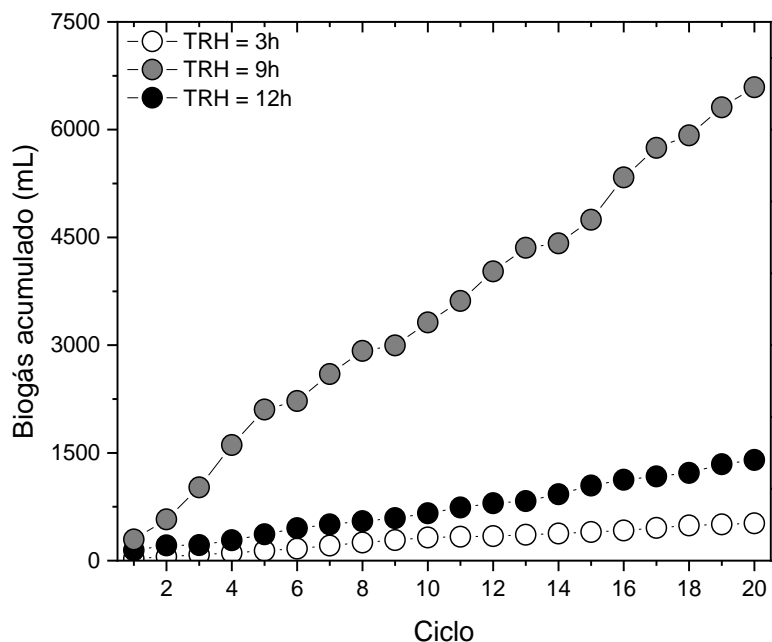


Figura 35. Efecto del TRH en la producción de biogás durante codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB empleando IG con TRH de 3, 9 y 12 h. $T=35^{\circ}\text{C}$ y pH constante de 5.5.

En la Figura 36 se presentan los análisis de la composición de biogás para los diferentes TRH's durante la codigestión SIL-SIC en estudio. Para TRH = 9 h, la producción de bioH_2 incrementó lentamente durante la operación continua del reactor UASB, y presentando tres mesetas la primera del ciclo 1 al 3 (~10%), la segunda del ciclo 4 al 7 (20%) y la tercera del ciclo 11 al 18 donde alcanzó el mayor porcentaje de bioH_2 (60%) a pesar de que el reactor mostro una ligera disminución del pH. Posteriormente inicio su descenso hasta el ciclo 20. Para el caso del TRH = 12 h se observó una producción estable de bioH_2 entre los primeros 9 ciclos (entre 30 a 40%). Sin embargo, entre los ciclos 10 al 13 se observó una disminución y posterior recuperación para disminuir el porcentaje de producción del bioH_2 por debajo de 20%. Para los TRH's 9 y 12 h, el porcentaje de bioH_2 en continuo en los diferentes ciclos fue más estable respecto al experimento con TRH = 3 h a pesar de la constante acidificación del reactor, pero en todos los casos la mayor producción de biogás se obtuvo después de 10 ciclos. Esto coincide con lo reportado por Azbar *et al.*, [30] quienes utilizaron suero de queso y obtuvieron en promedio hasta 45% de bioH_2 y además, demostró que la producción de

bioH₂ disminuyó conforme el TRH se redujo. En este mismo sentido, Ramos *et al.*, [31] evaluaron la codigestión entre suero de queso y glucosa en un reactor FBR, encontrando que a TRH cortos el porcentaje de bioH₂ disminuía a causa de altos valores de la VCO (200 g DQO L⁻¹ d⁻¹). Además del efecto sobre el porcentaje de bioH₂ del TRH, el rendimiento tuvo una tendencia similar.

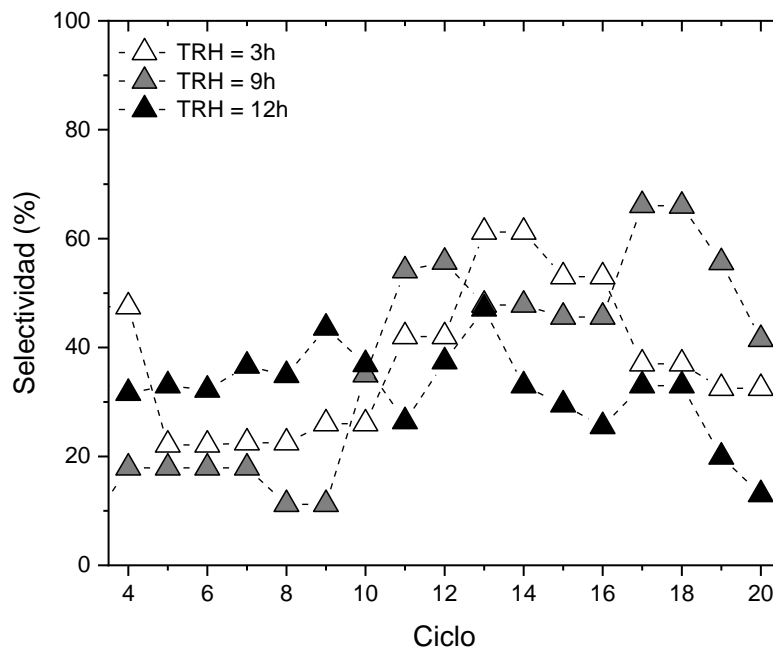


Figura 36. Efecto de la composición del biogás durante codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB a diferentes TRH's (3, 9 y 12 h). T=35°C y pH constante de 5.5.

Haciendo una analogía de los resultados del análisis microbiológico para la codigestión SIL-SIC entre los microrreactores batch a tiempo de 8 h y los experimentos en el reactor UASB TRH=9 (reactor UASB) posiblemente las especies predominantes como *Lactobacillus casei* (4%), *Lactobacillus delbrueckii* (7%), *Leucobostoc mensenteroides* (20%), *Lactococcus lactis* (44%) y *Bacilli* (7%), sean las que proliferan durante la operación del reactor en los diferentes ciclos, atribuyendo la probable sinergia entre los sustratos y la especie *Lactococcus Lactis* como la productoras de bioH₂. Este mismo caso aplica para el TRH=12 donde el análisis microbiológico en sistema batch a 24 h, revela que especies como *Lactobacillus casei* (13%) y el género *Bacilli* (31%), así como la disminución de especies como *Lactococcus lactis* (22%).

Los cálculos del rendimiento en el codigestión SIL-SIC se calculó partir de la producción de bioH₂, la DQO y el TRH. Para los 3 experimentos el rendimiento máximo fue de 1.01, 22.15 y 0.57 mmol H₂ g DQO⁻¹ (Figura 37) y un promedio de 0.42, 6.22 y 0.24 mmol H₂ g DQO⁻¹ para sus correspondientes TRH = 12, 9 y 3 h. Santos *et al.*, [29,32] demostraron que el rendimiento en la producción de bioH₂ se ve disminuidos conforme se evalúan TRH cortos. Para la tasa de producción volumétrica de bioH₂ (VHPR), tanto el TRH = 3 h como

el TRH = 12 h mantuvieron una VHPR menor al $0.05 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que la máxima VHPR la presentó el TRH = 9 con valores mayores a $0.35 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ como se muestra en la Figura 37.

Para la tasa de producción volumétrica de bioH_2 (VHPR), tanto el TRH = 3 h como el TRH = 12 h mantuvieron una VHPR menor al $0.05 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que la máxima VHPR la presentó el TRH = 9 con valores mayores a $0.35 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ como se muestra en la Figura 37.

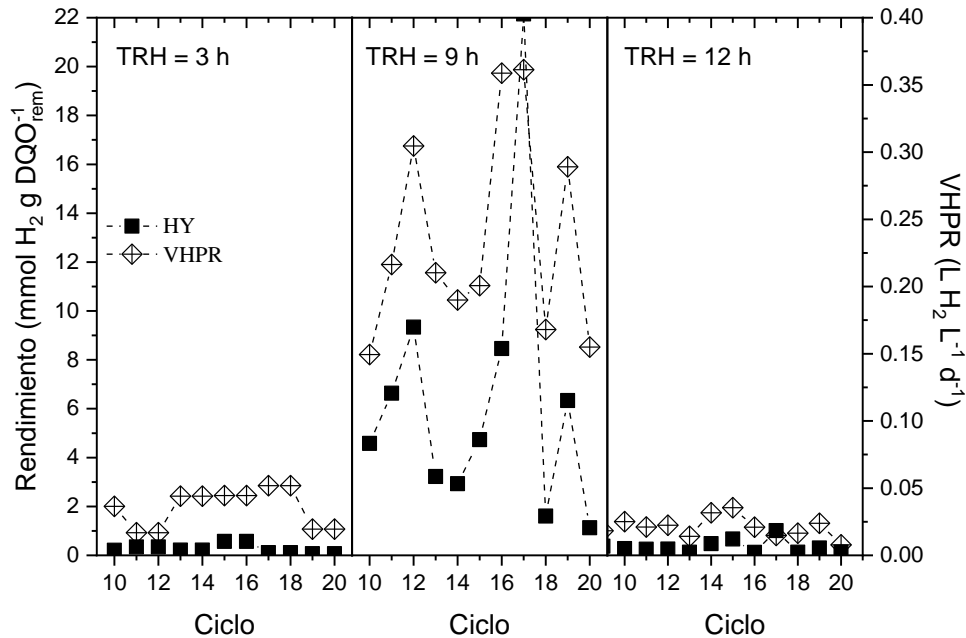


Figura 37. Efecto de la tasa de producción y rendimiento de bioH_2 durante la codigestión SIL-SIC empleando IG en un reactor UASB a diferentes TRH's (3, 9 y 12 h). $T=35^\circ\text{C}$ y pH constante de 5.5.

El efecto del TRH fue observado también para la remoción de la materia orgánica. En la Figura 38a se presenta las remociones de la DQO y CH para el TRH = 9 h, con valores máximos del 70 y 40 %, respectivamente. Para el TRH = 12 h, las remociones fueron en promedio del 90% y para la DQO del 40% (véase Figura 38c). Habrá que destacar que conforme el TRH aumentó, también la remoción de la materia orgánica lo hizo y a su vez fue más estable. Sin embargo, la remoción de la DQO fue la que mayor variación presentó. No obstante, se mantuvo la correlación entre los CH y la DQO siendo que, a mayor remoción de la DQO mayor remoción de los CH y a medida que el TRH aumenta, también aumenta la remoción de la materia orgánica. Este coincide con lo publicado por Santos *et al.*, [29] quien reportó que en medida que el TRH aumenta existe una correlación entre la conversión de los CH y la DQO, donde los primeros presentan un mayor porcentaje de remoción respecto a la DQO. Por lo tanto, fue el TRH = 9 h quien mantuvo la misma tendencia de remoción entre la DQO y los CH causado por la baja remoción de la DQO y alta conversión de los CH [31].

Los SST y SSV fueron monitoreados para representar el lavado de biomasa del reactor [33, 34]. El TRH = 9 h demostró una mayor estabilidad en la retención de sólidos, como se observa en la Figura 38b. Después del ciclo 14, presentó un descenso en la retención y fue hasta después del ciclo 18 que se observa una recuperación que también causó el aumento de la remoción de los CH y la DQO (Figura 38a). Para el TRH = 12 h, los SS tuvieron una mayor variación, la retención de SS tuvo dos descensos, el primero antes del ciclo 14 y el segundo después del ciclo 18. No obstante, ambos TRH (9 y 12 h) demostraron una mayor retención de SS que el TRH = 3 h. Esta diferencia permitió que el TRH = 9 y 12 tuvieran remociones de los CH y la DQO por encima del 40% y 20%, mientras que el TRH = 3 h tuvo en promedio 30 y 15 %, respectivamente.

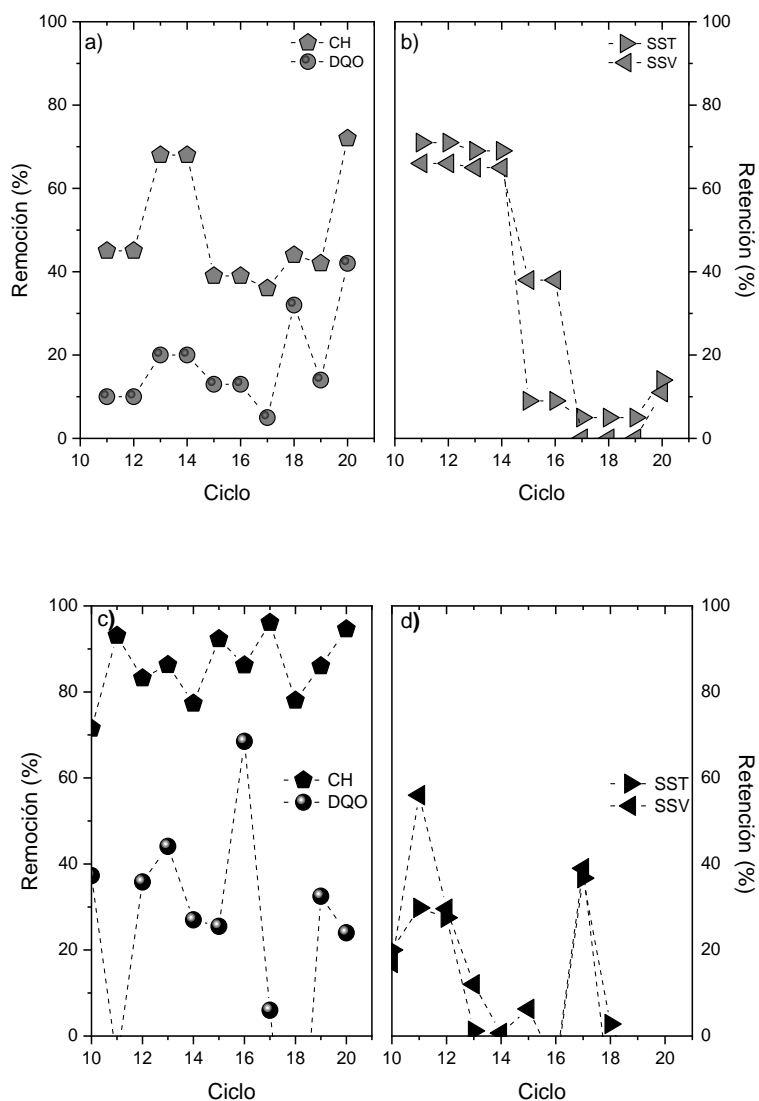


Figura 38. Degradación de la materia orgánica durante la codigestión SIL-SIC (C/N=35) empleando IG en un reactor UASB a diferentes TRH's (3, 9 y 12 h). (a) Remoción de CH y DQO y (b) Retención de SST y SSV y, reactor con TRH = 12 ± 0.4 h (c) Remoción de CH y DQO.

En la Tabla 10 se muestra la evolución de los AGV's para el TRH = 3, 9 y 12 h para los ciclos 10 al 20. Para el caso del TRH = 12 h, la acumulación de ácido acético alcanzó una acumulación entre 90 y 140 mg L⁻¹ de ácido acético entre los ciclos 10 al 18, en paralelo, el ácido valérico resultó con concentraciones de 300 a 500 mg L⁻¹ en el mismo intervalo de estudio. Esto demuestra que la ruta predominante para el TRH = 12 h fue la del ácido valérico. En el caso del TRH = 9 h entre el ciclo 10 y 14 la acumulación de ácido acético fue > 590 mg L⁻¹, seguido por el ácido propiónico (~550 mg L⁻¹), el ácido valérico (540 mg L⁻¹) y finalmente el ácido butírico (450 mg L⁻¹). Con lo anterior se demuestra, que entre los ciclos 10 al 18, existe un predominio de microorganismos que favorecen la ruta acetogénica y en consecuencia la selectividad hacia bioH₂ a pesar de la acidificación del reactor ya descrita más arriba.

En el caso del TRH = 3 h, mantuvo tendencias similares al TRH = 9 h, aunque con concentraciones menores probablemente por la menor presencia de especies como *Lactobacillus lactis*.

Por otro lado, el aumento del rendimiento de bioH₂ estuvo asociado la mayor acumulación de AGV's posiblemente por la mayor actividad microbiana. Es decir, para el TRH = 9 h se observó la máxima acumulación de metabolitos y se reflejó en el máximo rendimiento comparado con el TRH = 12 y 3 h. Además, el TRH = 9 h mantuvo una relación A/B mayor a 1, contrario a lo observado con el TRH = 3 y 12 h, esto se reflejó con el mejor rendimiento y tasa de producción de bioH₂ [20].

Finalmente, los AGV's mantuvieron una correlación directa con los sólidos suspendidos para el TRH = 9 h, probablemente por el lavado de la biomasa. Es decir, mientras la retención de sólidos por encima del 20% la concentración de metabolitos se mantuvo arriba de los 200 mg L⁻¹. Cuando la retención de sólidos cayó por debajo del 10% también causó la disminución de los AGV's acumulados, para el ciclo 20 cuando la retención de sólidos superó el 10% se logró observar una pequeña recuperación en los metabolitos acumulados. Para el TRH = 12 h, también se observó la disminución en la acumulación de los AGV's al mismo tiempo que el porcentaje de retención de sólidos cayó, un efecto similar se observó para el TRH = 3 h. Esto puede indicar la correlación directa que existe entre los SS y la actividad microbiana presente en del medio fermentativo y puede ser un parámetro de control para evitar el lavado de la biomasa [33, 34].

Tabla 10. Resultados de los AGV's en relación al TRH.

Ciclo	A. Acético (mg L ⁻¹)	A. Propiónico (mg L ⁻¹)	A. Butírico (mg L ⁻¹)	A. Valérico (mg L ⁻¹)
TRH = 3 h				
10	99	146	227	176
12	232	191	279	233
16	278	159	202	172
18	162	113	128	114
20	196	182	127	134
TRH = 9 h				
10	590	550	440	540
12	596	555	446	542
14	519	462	410	497
16	262	206	282	320
18	119	109	148	157
20	189	175	165	175
TRH = 12 h				
5	201	50	89	727
10	138	117	124	539
12	130	125	123	521
14	122	128	122	503
16	90	134	107	304
18	89	142	114	382
20	58	168	124	344

4.8 Análisis termodinámico

En la Tabla 11 se presentan las constantes de equilibrio (K_{eq}) teóricas y experimentales para las 4 principales reacciones catabólicas de la fermentación oscura [21]. Las K_{eq} teóricas son reportadas a condiciones de temperatura y presión normal, cuanto $K_{eq} > 1$ representa desplazamiento hacia el equilibrio de manera espontánea [35]. Por otro lado, las constantes de equilibrio experimentales fueron tomadas de los datos obtenidos en el presente trabajo.

En general, el TRH = 9 h demostró una mayor inclinación hacia las rutas productoras de bioH₂, como la acética y butírica. Estas fueron las rutas con mayor desplazamiento positivo con valores de K_{eq} mayores a 1×10^3 . En el caso del TRH = 12 las K_{eq} fueron menores a 1 para ácido acético (< 1) y ácido butírico (0.1), en contraste con las rutas propiónicas y valéricas que fueron mayores a mayores que las constantes de equilibrio del TRH = 3 h. Además, fue notorio el predominio y espontaneidad para el TRH = 3 h de las rutas consumidoras de bioH₂ como la propiónica y valérica, siendo la última ruta mayor que los K_{eq} teóricas. En base a lo anterior es posible predecir los cambios dinámicos de las especies y el sentido de la reacción.

Tabla 11. Efecto del TRH en las constantes de equilibrio.

Constante de equilibrio teórica						
TRH	Ciclo	Cte. K	k_1 (mmol ⁵)	k_2 (mmol ⁴)	k_3 (mmol ¹)	k_4 (mmol ⁴)
NA	NA	K_T	1.3402×10^{36}	9.9931×10^{48}	3.5089×10^{44}	1.3526×10^{25}
Constante de equilibrio experimental						
	10	K_{3-10}	1.1134×10^{-2}	5.3590×10^0	7.6015×10^{-2}	3.1206×10^2
3h	16	K_{3-16}	1.6099×10^{-2}	2.6768×10^0	8.3279×10^{-3}	2.3267×10^2
	20	K_{3-20}	4.7584×10^{-4}	3.2287×10^1	1.6170×10^{-3}	2.3386×10^4
9h	14	K_{9-12}	5.4347×10^6	1.0357×10^{-1}	3.2019×10^3	1.5860×10^{-7}
	18	K_{9-18}	2.6753×10^3	1.3506×10^{-2}	4.3312×10^1	2.2954×10^{-5}
	20	K_{9-20}	2.2699×10^4	2.4926×10^{-2}	1.8984×10^2	9.3928×10^{-6}
12h	5	K_{12-05}	6.4511×10^0	3.1090×10^{-2}	4.9106×10^{-1}	2.8358×10^0
	14	K_{12-12}	3.4300×10^{-1}	2.9648×10^{-1}	1.7391×10^{-1}	1.8024×10^0
	18	K_{12-16}	5.8644×10^{-1}	3.7857×10^{-1}	4.3303×10^{-1}	1.7445×10^0
	20	K_{12-20}	3.1667×10^{-3}	3.8042×10^0	4.6228×10^{-2}	6.7698×10^2

En este sentido, en la Tabla 12 se presenta la energía libre de Gibbs, para cada una de las K calculadas anteriormente, la cual denota la espontaneidad de la reacción [21,36]. Para el caso del TRH = 12 h se logró observar que la ruta valérica mantuvo una ΔG negativa, demostrando que fue la ruta con mayor espontaneidad. Para el caso del TRH = 9 h, se logró observar que las rutas de espontaneidad fueron la ruta acética y la butírica con $\Delta G \leq -10$ kJ. Esto se vio reflejado en el rendimiento y tasa de producción de bioH₂ obtenida en dicho TRH. Finalmente, el TRH = 3 h presentó ΔG con espontaneidad de dos de las principales rutas de consumo de bioH₂ (ruta propiónica y valérica), dando como resultado un bajo rendimiento de bioH₂.

Tabla 12. Efecto del TRH en la energía libre de Gibbs.

Energía libre de Gibbs teórica						
TRH	Ciclo	Energía libre	Ruta Acética	Ruta Propiónica	Ruta Butírica	Ruta Valérica
NA	NA	ΔG_T (kJ)	-206.00	-279.40	-254.00	-143.30
Energía libre de Gibbs experimental (kJ)						
	10	ΔG_{3-10}	11.13	-4.15	6.38	-14.24
3h	16	ΔG_{3-16}	10.22	-2.43	11.85	-13.51
	20	ΔG_{3-20}	18.94	-8.60	15.91	-24.91
9h	14	ΔG_{9-12}	-38.40	5.61	-19.98	38.77
	18	ΔG_{9-18}	-19.54	10.65	-9.33	26.45
	20	ΔG_{9-20}	-24.83	9.14	-12.94	28.66
12h	5	ΔG_{12-05}	-4.61	8.59	1.76	-2.58
	14	ΔG_{12-12}	2.64	3.01	4.33	-1.45
	18	ΔG_{12-16}	1.32	2.40	2.07	-1.37
	20	ΔG_{12-20}	2.84	-3.30	7.61	-16.14

4.7 Referencias

- [1] Arantes, M. K., Alves, H. J., Sequinel, R., & da Silva, E. A. Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017; 42: 26243-26256. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.206>.
- [2] Arantes M. K., Sequinel R., Alves H. J., Machado B., Fiorini A., da Silva E. A. Improvement of biohydrogen production from brewery wastewater: Evaluation of inocula, support and reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2020; 45: 5216-5226. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.208>.
- [3] Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., & Kim, S.-H. Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2016; 41: 21670-21677. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.047>.
- [4] Valta K., Damala P., Angeli E., Antonopoulou G., Malamis D., Haralambous K. J. Current Treatment Technologies of Cheese Whey and Wastewater by Greek Cheese Manufacturing Units and Potential Valorisation Opportunities. *Waste Biomass Valor.* 2017; 8, 1649-1663. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9862-8>.
- [5] Łukajtis R., Holowacz I., Kucharska K., Glinka M., Rybarczyk P., Przyjazny A., Kamiński M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2018; 91: 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.
- [6] Nikhil, G. N., Sarkar, O., & Venkata Mohan, S. Biohydrogen Production: An Outlook of Fermentative Processes and Integration Strategies. *Optimization and Applicability of Bioprocesses*, 2017; 249-265. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6863-8_12.
- [7] Gadhamshettya V., Johnsonb D. C., Nirmalakhandanc N., Smith G. B., Deng S. Feasibility of biohydrogen production at low temperatures in unbuffered reactors. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2009; 34(3): 1233-1243. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.037>.
- [8] Gomez-Romero J., Gonzalez-Garcia A., Chairez I., Torres L., García-Peña E. I. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2014; 39(24): 12541–12550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>.
- [9] Reyna L. M., Cruz A., Molina C. E., Alfaro J. M., Suárez S. I., Robledo A. Effect of Carbon/Nitrogen Ratio, Temperature, and Inoculum Source on Hydrogen Production from Dark Codigestion of Fruit Peels and Sewage Sludge. *Sustainability*. 2019; 11(7): 2139. <https://doi.org/10.3390/su11072139>.
- [10] García-Depraect O., Valdez-Vázquez I., Rene E. R., Gómez-Romero J., López-López A., León-Becerril E. Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark cofermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 2019; 282: 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>.
- [11] Basak B., Fatima A., Jeon B. H., Ganguly A., Chatterjee P. K., and Dey A. Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. *Energy Sustain. Dev.* 2018; 47: 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.08.004>.
- [12] 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; 42(9): 5820-5831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.204>
- [13] Tenca A., Schievano A., Perazzolo F., Adani F., Oberti R. Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: Maximizing stable production without pH control. *Bioresour. Technol.* 2011; 102(18): 5976-5987. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.102>.
- [14] Qin Y., Li L., Wu J., Xiao B., Hojo T., Kubota K., Cheng J., Li Y.Y. Co-production of biohydrogen and biomethane from food waste and paper waste via recirculated two-phase anaerobic digestion process: Bioenergy yields and metabolic distribution. *Bioresour. Technol.* 2019; 276: 325-334. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.004>.
- [15] Ghimire, A., Trably, E., Frunzo, L., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., Esposito, G., ... Escudé, R. Effect of total solids content on biohydrogen production and lactic acid accumulation during dark fermentation of organic waste biomass. *Bioresour. Technol.* 2018; 248, 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.062>.
- [16] De Gioannis G., Friargou M., Massi E., Muntoni A., Poletti A., Pomi R., Spiga D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2014; 39(36): 20930-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>.
- [17] Asunis F., De Gioannis G., Isipato M., Muntoni A., Poletti A., Pomi R., Rossi A., Spiga D. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Bioresour. Technol.* 2019; 289: 121722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121722>.
- [18] Tena, M., Luque, B., Perez, M., & Solera, R. Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2020; 45(32): 15977-15984. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.075>.
- [19] García-Depraect O., Díaz-Cruces Víctor F., Rene E. R., León-Becerril E. Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing reactor subjected to substrate- and pH-induced perturbations. *Bioresour. Technol.* 2020; 295: 122182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122182>
- [20] Yin J., Xiaoqin Y., Wang K., Shen D. Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2016; 41(46): 201713-201720. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.094>
- [21] Castelló E., Nunes-Ferraz-Jr A. D., Andreani C., Anzola-Rojas M. P., Borzacconi L., Buitrón G., Carrillo-Reyes J., Gomes S. D., Maintinguer S. I., Moreno-Andrade I., Palomo-Briones P., Razo-Flores E., Schiappacasse-Dasati M., Tapia-Venegas E., Valdez-Vázquez I., Vesga-Baron A., Zaiat M., Etchebehere C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2020; 119: 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- [22] Su X., Zhao W., Xia D. The diversity of hydrogen producing bacteria and methanogens within an in situ coal seam. *Biotechnol Biofuels*. 2018; 11(245): 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1237-2>.
- [23] Kim D. H., Kim S. H., Shin H. S. Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme Microb. Technol.* 2009; 45(3): 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.013>.
- [24] Narvhus J. A. Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (second edition). 2003; pages 3465-3472. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>.

- [25] Patel S. K.S., Kumar P., Mehariya S., Purohit H. J., Lee J. K., Kalia V. C. Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2014; 39: 14663-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.084>.
- [26] Tapia-Venegas E., Cabrol L., Brandhoff B., Hamelin J., Trably E., Steyer JP, Ruiz-Filippi G. Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 8295-8208. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6832-6>.
- [27] Gomez-Romero, J., Gonzalez-Garcia, R. A., Chairez, I., Torres, L., & García-Peña, E. I. Continuous two-staged co-digestion process for biohydrogen production from agro-industrial wastes. *International Journal of Energy Research*, 2015; 40(2): 257-272. <https://doi.org/10.1002/er.3466>
- [28] Intanoo, P., Rangsanvigit, P., Malakul, P., & Chavadej, S. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresour. Technol*. 2014; 173: 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.039>.
- [29] Santos, S. C., Ferreira Rosa, P. R., Sakamoto, I. K., Amâncio Varesche, M. B., & Silva, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014; 39: 9000-9011. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.241>.
- [30] Azbar, N., Dokgöz, F. T., Keskin, T., Eltem, R., Korkmaz, K. S., Gezgin, Y., ... Tutuk, F. Comparative Evaluation of Bio-Hydrogen Production From Cheese Whey Wastewater Under Thermophilic and Mesophilic Anaerobic Conditions. *International Journal of Green Energy*. 2009; 6: 192-200. <https://doi.org/10.1080/15435070902785027>.
- [31] Ramos, L. R., & Silva, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2018; 43(29): 13081-13089. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.070>.
- [32] Prabakar, D., Suvetha K, S., Manimudi, V. T., Mathimani, T., Kumar, G., Rene, E. R., & Pugazhendhi, A. Pretreatment technologies for industrial effluents: Critical review on bioenergy production and environmental concerns. *J. Environ. Manage*. 2018; 218: 165-180. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.136>.
- [33] Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Trably, E., Carrere, H., Lyberatos, G. Continuous biohydrogen production from a food industry waste: influence of operational parameters and microbial community analysis, *J. Cleaner Prod*. 2018; 174: 1054-1063.
- [34] Castello E., García C. y Santos, Iglesias T., Paolino G., Wenzel J., Borzacconi L., Etchebehere C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2009; 34: 5674–5682. <https://doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>.
- [35] Saady, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2013; 38: 13172-13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.
- [36] Esquivel-Elizondo S. V. (2012). Producción biológica de hidrógeno bajo diferentes condiciones de presión parcial de este gas. Tesis para obtener grado de maestro en ciencias. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México, Distrito Federal.

CAPÍTULO 5

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Se evaluó el desempeño de dos diferentes fuentes de inóculo, el IC y el IG en la codigestión entre SIL y SIC. La codigestión propuesta demostró tener una mejor capacidad amortiguadora. Además, el proceso de codigestión SIL-SIC mostró una mejora en el rendimiento de biohidrógeno más que en los sustratos individuales con ambos inóculos (IC e IG).

La relación C/N óptima fue de 35 con un rendimiento máximo de $72 \pm 5.2 \text{ mL H}_2 \text{ DQO}_{\text{rem}}^{-1}$ y porcentaje mayor al 40% de biohidrógeno. En cuanto a la remoción de la materia orgánica, se presentaron remociones máximas del 97% y 40% para los CH y DQO, respectivamente. El porcentaje de biohidrógeno se mantuvo arriba del 40% y los AGV's demostraron que la ruta que predominó fue la del ácido acético.

Para el análisis cinético de las reacciones, el modelo de Gompertz doble demostró ser mejor aproximación que el modelo simple ya que logró explicar los datos experimentales con un factor de correlación de 0.99.

Las especies *citrobacter spp.*, *Kluyvera cryocrescens* y *Rahnella spp.*, que proliferaron con IC, pueden producir biohidrógeno a partir de los productos ácidos finales de la FO. Asimismo, se encontró que el género *Prevotella spp.* realizó un proceso similar cuando se utilizó IG.

Se demostró que la implementación de una codigestión SIL-SIC logró aumentar el potencial de producción de bioH₂. Debido al efecto sinérgico entre ambas fuentes de materia orgánica y óptima relación C/N que mejoró la capacidad amortiguadora del sistema. Se observó que el rendimiento el aumento del TRH. Además, los sólidos suspendidos demuestran una correlación directa entre la actividad de los microorganismos productores de bioH₂ por el posible lavado de biomasa y la acumulación de los AGV's.

También fue posible el control del pH en un reactor continuo de flujo ascendente, siendo el TRH = 9h el que presentó una mayor selectividad hacia bioH₂ y un rendimiento de 2.18 mg L^{-1} y no se observó la presencia de CH₄. Asimismo, la producción de biogás para el TRH = 9h fue 10 veces mayor en relación a cada ciclo para el TRH = 3h y 4 veces más que el TRH = 12 h.

Por último, se demostró que la determinación de la constante de equilibrio experimental puede aportar información valiosa necesaria para el seguimiento de las reacciones bioquímicas. Además, la energía libre de Gibbs puede sugerir las rutas predominantes en la fermentación oscura.

5.1 Recomendaciones

Es necesario que realice un análisis microbiológico con la finalidad de conocer qué tipo de microorganismos estuvieron involucrados en la máxima producción de bioH₂, tal cual, se realizó en los experimentos en sistema batch.

En trabajos a futuro, una aportación importante sería el uso de un sistema de retención de biomasa, ya sea lechos fijos, biomembranas u otros y compararse con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Es indispensable la evaluación TRH intermedios y mayores a los estudiados en este trabajo para conocer más ampliamente el comportamiento del sistema de fermentación propuesto.

ANEXOS

Anexo 1

Anexo 1

Aumento del rendimiento del bioH₂ a partir del suero de queso en codigestión con aguas residuales de cervecería en microrreactor batch

Cruz-Méndez A. ⁽¹⁾, Reyna-Gómez L. M. ⁽¹⁾, Suárez-Vázquez S. I. ⁽¹⁾, Cruz-López A. ^{*(1)}

⁽¹⁾ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Civil, Departamento de Ingeniería Ambiental, Av. Universidad S/N, Cd. Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, N. L.

*Autor para correspondencia: cruzlopeza2015@gmail.com

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de la codigestión de suero de queso y agua residual de la industria de cervecería en micro-reactores batch, empleando inóculo de lixiviado de compostaje de flores de ornato (IC). Los resultados de la caracterización fisicoquímica de sustratos individuales permitió diseñar las mezclas de codigestión con relaciones C/N=25 y 35 además de los micro-reactores con suero de queso (C/N= 20) y de agua residual de la industria de cervecería (C/N= 50) todos con relación sustrato/inóculo 10:1. Los resultados de la fermentación oscura muestran que el proceso de producción de bioH₂ tuvo lugar en el rango de pH=6.0 a 4.5 en las codigestiones y el consumo de carbohidratos fue de 90% en las primeras horas y después disminuyó hasta 50%. La DQO, ST y SV mostraron la misma tendencia. La producción de biogás fue 225 ± 6.4 mL (C/N=25) y 193 ± 0.0 mL (C/N=35). Pero para esta última relación, la selectividad de bioH₂ fue de 35% y los subproductos de la reacción fueron bióxido de carbono, ácido acético y ácido butírico (t < 8 h) generando una tasa de producción de bioH₂ fue de 72 ± 5.7 mL H₂ gDQO_{rem}⁻¹. Finalmente, para validar los datos experimentales se utilizó en modelo cinético modificado de Gompertz doble con un ajuste de R²=0.99.

Palabras claves: Digestión Anaerobia, consorcio mixto, modelo de Gompertz, valorización de residuos

Introducción

El uso ilimitado de combustibles fósiles relacionados con la contaminación ambiental ha revelado la identidad de la energía renovable derivada de la biomasa como futura aportadora de energía (Alexandropoulou *et al.*, 2018). Entre los biocombustibles, el bio-hidrógeno (bioH₂) se considera como combustible libre de carbono, no contaminante y con un contenido energético de 122 kJ g⁻¹ (Castello *et al.*, 2020). Sumado a que la producción de bioH₂ biológico consume menos energía y es más respetuoso del medio ambiente comparado con otras rutas en desarrollo (Villa-Montoya *et al.*, 2020).

La producción de bioH₂ vía fermentación oscura (FO) se perfila como una solución potencial para la generación de energía comparado con otros métodos biológicos (Singh *et al.*, 2020). Sin embargo, la eficiencia general de conversión del proceso de producción no es prometedor y actualmente se estudian diversas alternativas para hacer más eficiente la extracción de energía vía FO, destacando la valorización de lodos y aguas residuales de tipo industrial (Reyna *et al.*, 2019). De acuerdo con las actividades económicas de cada región del planeta, se han diseñado codigestiones que prometen mejorar sustancialmente la producción de bioH₂ a través del control de variables de operación como la relación carbón nitrógeno (C/N), el pH, el tiempo de retención hidráulica del biorreactor (Xing *et al.*, 2020). En México, las codigestiones reportadas a partir de aguas de aguas residuales son; vinazas y *nejayote* (García-Depraect *et al.*, 2019), suero de queso con jugo de frutas (Gómez-Romero *et al.*, 2014), y más recientemente lodos de agua de tratamiento con cascara de frutas (Reyna *et al.*, 2019).

En este trabajo se presentan la codigestión de aguas residuales de cervecería y suero de queso (C/N=35 y 25), para mejorar el rendimiento de bioH₂ respecto a los sustratos individuales (C/N=20 y 50) empleando un consorcio microbiano proveniente del lixiviado del compostaje de flores de ornato.

Materiales y métodos

Sustrato e inóculo

Se utilizaron dos residuos de la industria alimenticia. El primer residuo corresponde al sustrato industrial cervecería (SIC) y el segundo residuo a partir del proceso de fabricación de queso, sustrato industrial de lactosuero (SIL). Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de ambos sustratos como pH, carbohidratos (CH), Demanda Química de Oxígeno (DQO), proteínas, nitrógeno total, sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) empleando espectrómetro UV-vis Perkin Elmer ® “lambda 365” y la metodología de la norma NOM-004-SEMARNAT. Los micro-reactores se prepararon en frascos de 120 mL con volumen de trabajo de 90 mL y relación volumen de sustrato inóculo 10% w/v, a pH=6, T=35°C. Posteriormente la muestra se almacenó a 0°C. El inóculo fue obtenido a partir de un proceso de composta. Para inhibir la actividad de los microorganismos metanogénicos, el inóculo fue tratado térmicamente. El tratamiento del inóculo de lixiviados de compostaje de flores de ornato consistió en calentar a baño maría, a 100°C, durante 40 minutos y posteriormente fue enfriado a temperatura ambiente (Reyna *et al.*, 2019).

Métodos analíticos de las reacciones

Para la cuantificación de la composición del biogás durante la codigestión, ésta se realizó en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies®, modelo 7820 A, acondicionado con dos detectores y sus correspondientes columnas capilares. El primer analizador es un detector de conductividad térmica (TCD) y el segundo con

un detector de ionización de flama (FID). Los gases permanentes se analizaron por TCD en una columna SUPELCO, empleando Argón como gas de arrastre, temperatura del horno a 40 °C, temperatura del inyector a 230°C y temperatura del analizador a 230°C. Por otra parte, los subproductos líquidos (ácidos grasos volátiles, AGV's) se analizaron con el detector FID, en una columna INOWAX, empleando Argón como gas de transporte. Para el horno se implementaría una rampa de calentamiento de 70°C a 180°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C.m⁻¹, temperatura del inyector a 250°C y temperatura del analizador a 250°C.

Evaluación del sistema de reacción. La preparación de los micro-reactores consistió en la preparación del medio de fermentación (SIC-SIL) en base a la relación C/N 20, 25, 30, 35 y 50, siendo C/N 20 y 50 la relación C/N de los sustratos individuales. Cada micro-reactor batch consistió en botellas serológicas de vidrio de 124 mL de capacidad, con un volumen de trabajo de 90 mL. La mezcla de sustrato fue inoculada a un 10 % w/v y una solución con micronutrientes. Las reacciones se llevaron a cabo en una incubadora "MaxQ 400" de *Thermo Scientific*. La temperatura y la agitación fue establecida a 35°C y 100 RPM, respectivamente y pH inicial de 5.5 ± 3 (Reyna *et al.*, 2019).

Análisis cinético de las reacciones. Numerosos trabajos han demostrado la utilidad del modelo Gompertz cuando se trata de una sola etapa de producción de bioH₂ (Gómez-Romero *et al.*, 2014; Reyna *et al.*, 2019). Sin embargo, en este estudio se observó que todas las codigestiones evaluadas presentaron dos etapas de producción la primera para t < 8 h y la segunda para t > 24 (De Gioannis *et al.*, 2014). Por lo tanto, se propuso utilizar la ecuación modificada de Gompertz doble, tal como se muestra en la ecuación 1.

$$H = H_{m1} * \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{m1} * e}{H_{m1}}(\lambda_1 - t) + 1\right]\right\} + H_{m2} * \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{m2} * e}{H_{m2}}(\lambda_2 - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

H = Producción de bioH₂ acumulado (mL).

R_m = Máxima tasa de producción de bioH₂ por etapa (mL H₂ L⁻¹ h⁻¹).

λ = Tiempo de la fase de latencia por etapa (h).

t = Tiempo de cultivo (h).

H_m = Máxima producción de bioH₂ por etapa (mL H₂).

e = Constante de Euler (2.718).

Para los parámetros del modelo el subíndice 1 se refiere a los parámetros cinéticos de la primera etapa, mientras que los subíndices 2 a los parámetros cinéticos de la segunda etapa del proceso de fermentación.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos de la codigestión C/N=25, indican que el pH inicial registró un descenso hasta $\text{pH} > 5$ en las primeras 8 horas de la reacción y continuo descendió hasta $\text{pH} \leq 4.5$ a las 32 h, como se muestra en la figura 1. Para las demás relaciones C/N el perfil de pH mantuvieron la misma tendencia disminuyendo a valores de $\text{pH} = 4$.

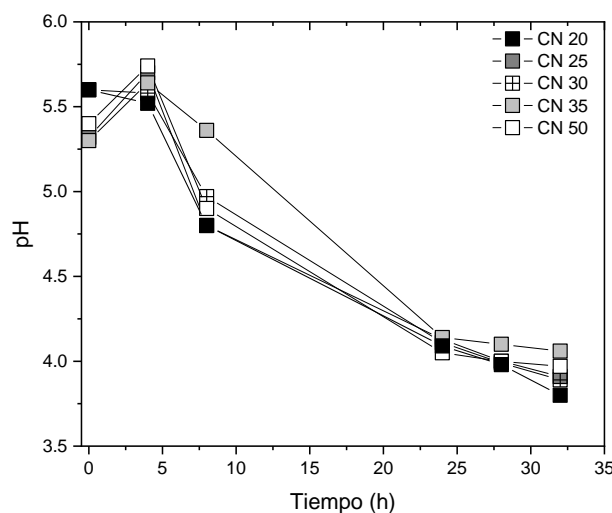


Figura 1. Evolución del pH de la codigestión SIC-SIL empleando las diferentes relaciones C/N utilizando inóculo de lixiviados de composta.

Durante el periodo de tiempo de 32 h, la mayor remoción de CH fue de 92 % para la relación C/N=35, observándose un mayor porcentaje de degradación a tiempos menores a 8 h (véase figura 2). En contraste, la relación C/N=20 solo alcanzó el 30% de la remoción. Por último, la relación C/N=25 logró un ascenso inusual en las últimas 4 h de incubación. En el caso de la DQO, este parámetro presentó aproximadamente un 20% de degradación en correspondencia al mismo porcentaje de remoción de los ST. Mientras que el porcentaje de remoción de SV fue del 50% al final de la reacción. Para el caso de los micro-reactores con relación C/N=25, se observó la misma tendencia en el $\text{pH} \leq 5$, CH ($\approx 60\%$) y SV ($< 45\%$) las primeras 8 h para tiempos mayores no se observaron variaciones importantes. Por otra parte, la DQO y ST revelan un incremento en el porcentaje de remoción del 42 y 38% respectivamente, estos porcentajes son dos veces mayor a la remoción observada en la relación C/N=35 y se atribuye a un mayor crecimiento de la biomasa (Basak *et al.*, 2018). De la caracterización fisicoquímica de la relación C/N=50, solo habrá que destacar una disminución del $\text{pH} \leq 5$ desde las primeras horas (4 h), aunque, la remoción de CH fue la segunda más alta (75%) y la remoción de DQO, ST y SV se mantuvo sin cambios importantes respecto a las codigestiones. Finalmente, para la relación C/N=20, fue la que menor porcentaje de remoción

presentó para CH (35%), DQO (14%), ST ($\approx 20\%$) y SV (30 %) en correlación con la disminución del $\text{pH} \leq 5$ después de las 4 h de la reacción.

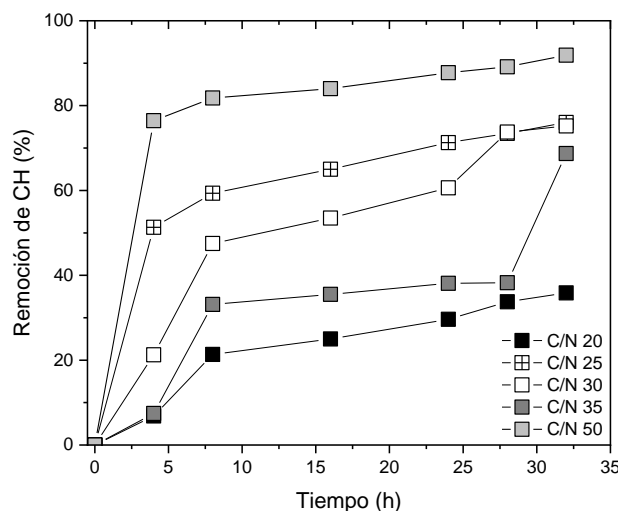


Figura 2. Perfil de remoción de carbohidratos de la codigestión SIC-SIL empleando las diferentes relaciones C/N y como inóculo lodos de lixiviados de composta.

La producción de bioH_2 en los micro-reactores mostrada en la tabla 1, fueron de 225 ± 6.4 , 193 ± 0.0 , 101 ± 6.4 , 93 ± 6.4 y 80 ± 6.4 mL para las relaciones C/N 25, 35, 20, 50 y 30 respectivamente, siendo las codigestiones 200% mejor que los sustratos individuales. La máxima acumulación de bioH_2 se alcanzó con la relación C/N 35 con un valor de 215 ± 16.9 mL H_2 L^{-1} . Aunque el 50% de la producción de bioH_2 se registró a las primeras 8 h de montarse el experimento. Posteriormente hubo un periodo de relajación posiblemente por la saturación de bioH_2 producido durante la noche. A las 24 h de iniciado el experimento se volvió a retirar el biogás. A partir de las 28 horas se registró un aumento en la producción de bioH_2 cercano al 50%. De acuerdo con algunos estudios, nuestra máxima producción de bioH_2 fue 28% a lo reportado por De Gioannis (De Gioannis *et al.*, 2014), quien obtuvo una producción de 171 mL H_2 gCOT^{-1} utilizando solo residuos de queso. Por otro lado, García-Depraect (García-Depraect *et al.*, 2019), reporta una producción de 239 mL gDQO^{-1} en la codigestión entre vinazas y *nejayote*, que es 8% mayor a lo reportado en este estudio.

El valor promedio de mayor selectividad hacia bioH_2 en las codigestiones fue 29 y 31% para la relación C/N=25 y 35 respectivamente. En cuanto a los AGV's, los resultados muestran que a tiempos cortos la mayor presencia de metabolitos como el Ácido acético y ácido butírico conocidos subproductos de la fermentación oscura (De Gioannis *et al.*, 2014).

Tabla 1. Acumulación de biogás en el proceso fermentativo de codigestión SIL-SIC empleando las diferentes relaciones C/N y como inóculo lodos de lixiviados de composta.

Tiempo (h)	Producción de biogás (mL)				
	Relación C/N				
	20	25	30	35	50
0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
4	36±6.4	79±16.9	14±16.9	60±16.9	35±6.4
8	50±11.1	142±11.1	34±11.1	90±6.4	48±6.4
24	96±16.9	183±16.9	54±11.1	138±22.2	78±6.4
28	100±6.4	215±16.9	66±0.0	182±6.4	88±6.4
32	101±6.4	225±6.4	80±6.4	193±0.0	93±6.4

A diferencia de la máxima producción de bioH₂, la mayor tasa de producción en relación a la DQO removida fue de 72±5.7 mL H₂ gDQO_{rem}⁻¹ para la relación C/N=35 debido a una mayor estabilidad en el pH (véase Figura 3). Para las otras relaciones C/N, aunque se observaron altos niveles de remoción de la CH (véase Figura 2), posiblemente la generación de subproductos consumidores de H₂ debido a las múltiples rutas metabólicas podría explicar la baja producción (Gómez-Romero *et al.*, 2014).

Los resultados demostraron que para todas las codigestiones, más del 50% de la acumulación de bioH₂ total se dio en la primera etapa, tal como se muestra en la figura 4. Para la relación C/N=25 se obtuvo la máxima predicción de bioH₂. La primera etapa de fermentación demostró que la fase de latencia tuvo una duración menor a 1 h. Sin embargo, la fase *lag* de la segunda etapa duró de 22 a 23 h antes que se presentará nuevamente la acumulación de bioH₂. En cuanto a la velocidad máxima, en todos los experimentos la R_{Max} fue mayor que en la segunda etapa. Finalmente, se comprobó el modelo de modificado de Gompertz doble explicó ampliamente los datos experimentales. De hecho, la R² mantuvo un valor superior al 0.99 similar a los valores obtenidos por De Gioannis (De Gioannis *et al.*, 2014). En contraste con el modelo de Gompertz simple que presentó una R² de 0.91 a 0.97. Esto corrobora la utilidad del modelo modificado de Gompertz doble para la explicación de los datos obtenidos en el presente estudio.

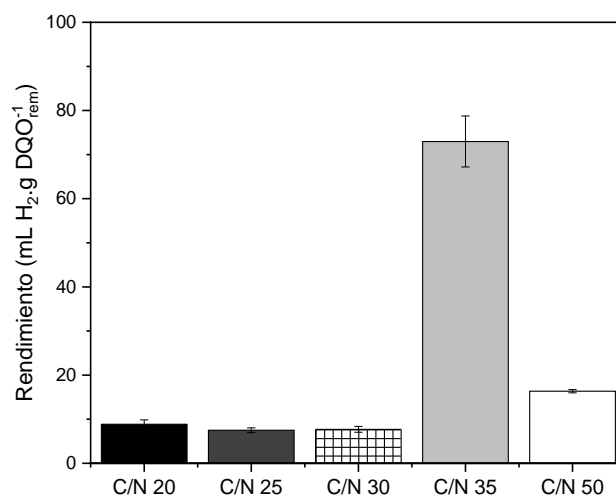


Figura 3. Rendimiento en el proceso fermentativo de la codigestión SIC-SIL y sustratos individuales empleando las diferentes relaciones C/N y como inóculo lodos de lixiviados de composta.

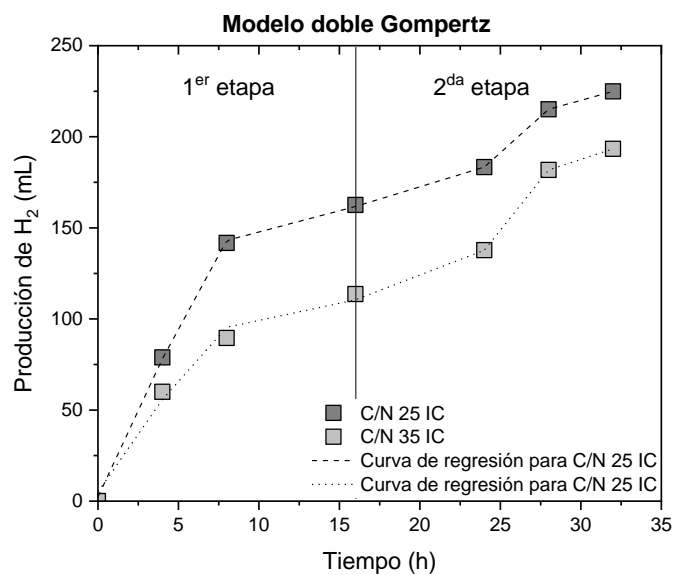


Figura 4. Modelo cinético de Gompertz doble para la producción de bioH₂ con las relaciones C/N 25 y C/N 35.

Conclusión

Se encontró que es posible mejorar la producción y tasa de producción de bioH₂ a partir de la codigestión entre sustrato de origen industrial SIC-SIL. De acuerdo con las diferentes condiciones experimentales estudiadas se observó la producción de bioH₂ a pH ≥ 5 empleando un consorcio microbiano mixto.

Cuando la relación fue C/N=35 la tasa de producción de bioH₂ de la codigestión aumento más del doble con respecto a las demás relaciones C/N.

La ecuación modificada de Gompertz doble demostró un mejor ajuste al experimento con relación C/N=25, aunque los demás experimentos también son validados por el mismo modelo cinético. Además, la fase de adaptación se presentó a tiempo menor a 1 h.

Es necesario continuar estudiando este proceso como alternativa para la extracción de energía y valorización de aguas residuales y de residuos sólidos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al fondo CONACyT-SENER-Sustentabilidad Energética por el apoyo financiero a través del Proyecto 249908 y a la Facultad de Ingeniería Civil, especialmente al Departamento de Ingeniería Ambiental, por las facilidades brindadas para la instalación de la infraestructura científica para el estudio de la generación de bioenergía. Cruz-Méndez A. agradece al CONACyT por la beca 717875.

Referencias

- Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Trably, E., Carrere, H., Lyberatos, G. (2018). Continuous biohydrogen production from a food industry waste: influence of operational parameters and microbial community analysis, *J. Cleaner Prod.*, 174 , 1054-1063.
- Basak, B., Fatima, A., Jeon, B.-H., Ganguly, A., Chatterjee, P. K., & Dey, A. (2018). Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. *Energy for Sustainable Development*. 47: 39-52.
- Castelló E., Nunes-Ferraz-Jr A. D., Andreani C., Anzola-Rojas M. P., Borzacconi L., Buitrón G., Carrillo-Reyes J., Gomes S. D., Maintinguer S. I., Moreno-Andrade I., Palomo-Briones P., Razo-Flores E., Schiappacasse-Dasati M., Tapia-Venegas E., Valdez-Vázquez I., Vesga-Baron A., Zaiat M., Etchebere C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 119:109602.
- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletti, A., Pomi, R., & Spiga, D. (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy*. 39(36): 20930-20941.

- Gomez-Romero J., Gonzalez-Garcia A., Chairez I., Torres L., García-Peña E. I. (2014). Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy*. 39(24): 12541–12550.
- García-Depraect O., Valdez-Vázquez I., Rene E. R., Gómez-Romero J., López-López A., León-Becerril E. (2019). Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark cofermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 282: 236-244.
- Reyna L. M., Cruz A., Molina C. E., Alfaro J. M., Suárez S. I., Robledo A. (2019). Effect of Carbon/Nitrogen Ratio, Temperature, and Inoculum Source on Hydrogen Production from Dark Codigestion of Fruit Peels and Sewage Sludge. *Sustainability*. 11(7): 2139.
- Singh, V., Yadav, S., Sen, R., & Das, D. (2020). Concomitant hydrogen and butanol production via co-digestion of organic wastewater and nitrogenous residues *Int. J. Hydrogen Energy*.
- Villa-Montoya, A. C., da Silva Mazareli, R. C., Delforno, T. P., Centurion, V. B., de Oliveira, V. M., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2020). Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community. *Int. J. Hydrogen Energy*. 45(7): 4205-4222.
- Xing, B.-S., Han, Y., Cao, S., & Wang, X. C. (2020). Effects of long-term acclimatization on the optimum substrate mixture ratio and substrate to inoculum ratio in anaerobic codigestion of food waste and cow manure. *Bioresource Technology*. 123994.

Anexo 2

Anexo 2

Diseño de experimentos Placked Burman

La variable de interés a evaluar a partir del diseño de experimentos fue seleccionada de acuerdo a la caracterización físicoquímica. Donde, la relación C/N y el tipo de inóculo a utilizar fueron las variables seleccionadas como de mayor significancia para el presente trabajo. La Tabla 3 contiene información acerca de las condiciones del diseño de experimentos para las dos variables de interés. El diseño de experimentos realizado en Minitab 17® nos indica el planteamiento de los experimentos.

Tabla 1. Diseño de experimentos Placked Burman.

Ronda	Relación	Sustrato		Inóculo	
	C/N	SIL	SIC	Granular	Composta
II	20	100%	0%	☉	☉
I	25	30%	70%	☉☉☉	☉☉☉
II	30	10.5%	89.5%	☉☉☉	☉☉☉
I	35	3%	97%	☉☉☉	☉☉☉
II	50	0%	100%	☉	☉

☉ Réplicas

La Figura 1 muestra el diagrama de Pareto de efectos estandarizados el cual es determinado a través del análisis de varianza entre los factores a estudiar en la codigestion entre SIC y SIL. En el eje de las ordenadas se observa la barra con termino A que representa el factor de relación C/N mientras que la barra de termino B el factor inóculo y ambas están en función de la producción de hidrógeno sobre la DQO removida. En el eje de las abscisas está trazada una línea perpendicular con valor igual a 2.23 que representa la línea de referencia para indicar que un factor es significativo. En el caso de la relación C/N es evidente el valor es altamente significativo mayor a 20, sin embargo, el factor inóculo se encuentra en los límites de la línea de referencia, es decir, está en la transición de considerarse un factor significativo. De acuerdo a lo presentado en la figura la relación C/N tiene un alto valor de significancia, esto comprueba la importancia de la relación C/N sobre la producción de bioH₂.

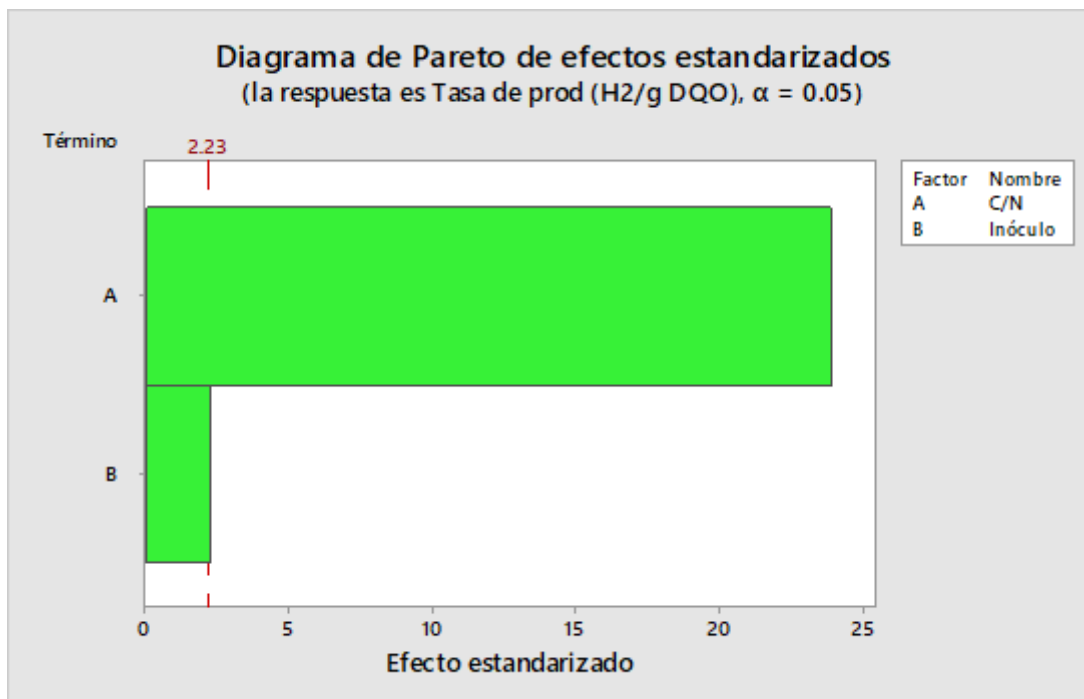


Figura 1. Diagrama de Pareto para producción de H₂